Untersuchungen zur Rolle der Tight Junction Proteine Claudin-1 und Claudin-4 in der Barrierefunktion der humanen Haut

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg

> vorgelegt von Sophia Bergmann aus Düsseldorf

Hamburg 2018

Gutachter

Prof. Dr. Johanna M. Brandner Prof. Dr. Thorsten Burmester

Vorsitz der Prüfungskommission: Prof. Dr. Jörg Ganzhorn

Datum der Disputation: 02.11.2018

INHALTSVERZEICHNIS

In	Inhaltsverzeichnisiii				
A	bkürzur	gs- und Symbolverzeichnis vii			
1	Einle	eitung			
	1.1	Die humane Haut und ihre Funktionen12			
	1.2	Struktur der humanen Haut			
	1.3	Tight Junction Proteine und ihre Funktionen16			
	1.4	Epidermale Barriere			
	1.4.1	Mikrobielle Barriere			
	1.4.2	Stratum Corneum-Barriere19			
	1.4.3	Tight Junction-Barriere20			
	1.4.4	Chemische Barriere21			
	1.4.5	Immunologische Barriere21			
	1.5	Claudine22			
	1.5.1	Struktur der Claudine22			
	1.5.2	Claudine in der Barrierefunktion von Endothelien und Epithelien24			
	1.6	Claudin-1 in der Haut25			
	1.7	Claudin-4 in der Haut27			
	1.8	Interaktion zwischen Tight Junctions und anderen Komponenten der epidermalen			
	Barrier	28			
	1.9	Epidermale Testsysteme			
	1.10	Knockdown vs. Targeting			
	1.11	Ziele der Arbeit			
	1.12	Flussdiagramm der Doktorarbeit35			
2	Mat	erial & Methoden			
	2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien			
	2.2	Chemikalien und Materialien			
	2.3	Software			
	2.4	Antikörper42			
	2.5	Zellkultur43			
	2.5.1	Anzucht von Keratinozyten43			
	2.5.2	Kultivierung und Passagieren von Keratinozyten44			
	2.5.3	Zellzählung44			

	2.5.4	Kryokonservierung45
	2.5.5	6 Rekultivierung
	2.5.6	Anlegen von rekonstruierter humaner Epidermis45
	2.6	Bakterien
	2.6.1	Kultivierung46
	2.6.2	2 Inokulation von rekonstruierter humaner Epidermis46
	2.7	Molekularbiologische Verfahren46
	2.7.1	RNA-Interferenz
	2.7.2	2 RNA-Isolation
	2.7.3	cDNA-Synthese
	2.7.4	quantitative <i>real-time</i> -Polymerasekettenreaktion48
	2.8	Proteinbiochemische Verfahren
	2.8.1	Proteinisolation
	2.8.2	2 Proteinbestimmung
	2.8.3	Gelelektrophorese nach Laemmli51
	2.8.4	Western Blot
	2.8.5	5 Proteindetektion
	2.9	Histologische Verfahren
	2.9.1	Einbetten von RHE-Modellen in Paraffin54
	2.9.2	2 Herstellung von Paraffinschnitten55
	2.9.3	Hämalaun Eosin Färbung55
	2.9.4	Immunfluoreszenzfärbungen
	2.10	cCPE-Behandlung
	2.11	Barriere-Assays
	2.11	1 Biotinylierungs-Assay58
	2.11	.2 Lanthan-Assay
	2.11	.3 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands
	2.11	.4 Impedanzmessung
	2.11	.5 Lucifer Yellow-Assay
	2.12	Messung der interzellulären Lipidlamellenlänge im Stratum Corneum62
	2.13	Statistik
3	Erge	bnisse
	3.1	Charakterisierung rekonstruierter humaner Epidermis nach Poumay und Pierre Fabre . 64
	3.1.1	Rekonstruierte humane Epidermis nach Poumay64
	3.1.2	2 Rekonstruierte humane Epidemris nach Pierre Fabre67

	3.1.3	Definition der Barrierereife	68
	3.2	Knockdown von Claudin 1 in RHE	69
	3.2.1	Einfluss des Knockdowns auf die Morphologie der RHE	74
	3.2.2	Einfluss des Knockdowns auf die Proliferation	76
	3.2.3	Einfluss des Knockdowns auf die Expression anderer TJ-assoziierter Proteine	76
	3.3	Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf die epidermale Barriere während der	
	Entwick	klung/Regeneration (Tag 4)	79
	3.3.1	Analyse der allgemeinen Barrierefunktion	79
	3.3.2	Analyse der innen-nach-außen Tight Junction-Barriere	80
	3.3	3.2.1 Analyse der TJ-Barriere für den Ionentracer Lanthan	
	3.3	Analyse der TJ-Barriere für Tracermoleküle verschiedener Größe	81
	3.3.3	Analyse der außen-nach-innen Barriere	84
	3.4	Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf die epidermale Barriere in reifer RHE (Tag	8)85
	3.4.1	Analyse der allgemeinen Barrierefunktion	85
	3.4.2	Analyse der innen-nach-außen TJ-Barriere	86
	3.4.3	Analyse der außen-nach-innen Barriere	89
	3.5	Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf das Stratum Corneum	90
	3.6	Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf die Entzündungsreaktion	94
	3.7	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die	
	3.7 Barrier	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion	97
	3.7 Barrier 3.8	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE	97 101
	3.7Barrier3.83.8.1	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion	97 101 101
	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine	97 101 101
	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie	97 101 101 101
	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion	97 101 101 101 103 106
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion	97 101 101 103 106 108
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion ussion	97 101 101 103 106 108
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 4.11 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion ussion Claudin-1 zeigt einen dosis-abhängigen Einfluss auf die epidermale Barrierefunkti	97 101 101 103 106 108 108
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 4.1.1 4.1.2 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion Ussion Claudin-1 zeigt einen dosis-abhängigen Einfluss auf die epidermale Barrierefunkti Claudin-1 beeinflusst die Tight Junction-Barriere	97 101 101 103 106 108 109 12
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion Ussion Claudin-1 zeigt einen dosis-abhängigen Einfluss auf die epidermale Barrierefunkti Claudin-1 beeinflusst die Tight Junction-Barriere Claudin-1 hat Einfluss auf die epidermale Gesamtbarriere Claudin-4 Verlust beeinträchtigt die Barrierefunktion in RHE	97 101 101 103 103 106 108 109 119
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion Ussion Claudin-1 zeigt einen dosis-abhängigen Einfluss auf die epidermale Barrierefunkti Claudin-1 beeinflusst die Tight Junction-Barriere Claudin-1 hat Einfluss auf die epidermale Gesamtbarriere Claudin-4 Verlust beeinträchtigt die Barrierefunktion in RHE Unterschied zwischen den Effekten nach Knockdown und Targeting	97 101 101 103 103 106 108 109 119 119
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion	97 101 101 103 103 106 108 109 119 119 121 nd
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4 begüns 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion Ussion Claudin-1 zeigt einen dosis-abhängigen Einfluss auf die epidermale Barrierefunktion Claudin-1 beeinflusst die Tight Junction-Barriere Claudin-1 hat Einfluss auf die epidermale Gesamtbarriere Unterschied zwischen den Effekten nach Knockdown und Targeting Claudin-1 Verlust induziert eine Keratinozyten-autonome Entzündungsreaktion u tigt die Inflammation bei bakterieller Kolonisation	97 101 101 103 103 106 108 109 119 121 nd 123
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 4.1.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4 begüns 4.5 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion Ussion Claudin-1 zeigt einen dosis-abhängigen Einfluss auf die epidermale Barrierefunkti Claudin-1 beeinflusst die Tight Junction-Barriere Claudin-1 hat Einfluss auf die epidermale Gesamtbarriere Claudin-4 Verlust beeinträchtigt die Barrierefunktion in RHE Unterschied zwischen den Effekten nach Knockdown und Targeting Claudin-1 Verlust induziert eine Keratinozyten-autonome Entzündungsreaktion u tigt die Inflammation bei bakterieller Kolonisation	97 101 101 103 103 106 108 109 112 119 121 nd 123 123
4	 3.7 Barrier 3.8 3.8.1 3.8.2 3.9 3.10 Disk 4.1 4.1.2 4.2 4.3 4.4 begüns 4.5 	Einfluss von Infektion mit Staphylokokken und Claudin-1 Knockdown auf die efunktion Knockdown von Claudin 4 in RHE Claudin-4 Knockdown beeinflusst die Barrierefunktion Einfluss auf andere Barriere-assoziierte Proteine Analyse der Barrierefunktion mittels Impedanzspektroskopie Einfluss verschiedener c-CPE Mutanten auf die Barrierefunktion Ussion Claudin-1 zeigt einen dosis-abhängigen Einfluss auf die epidermale Barrierefunkti Claudin-1 beeinflusst die Tight Junction-Barriere Claudin-1 hat Einfluss auf die epidermale Gesamtbarriere Unterschied zwischen den Effekten nach Knockdown und Targeting Claudin-1 Verlust induziert eine Keratinozyten-autonome Entzündungsreaktion u tigt die Inflammation bei bakterieller Kolonisation	97 101 101 101 103 103 108 109 112 119 121 nd 123 127

Abstract	132
Publikationen	
Abbildungsverzeichnis	135
Tabellenverzeichnis	137
Literaturverzeichnis	138
Danksagung	155
Eidesstattliche Versicherung	156

ABKÜRZUNGS- UND SYMBOLVERZEICHNIS

∞	unendlich	CE	cornified cell envelope
&	und	CER	Ceramid
%	Prozent	CHOL	Cholesterol
°C	Grad Celsius	СК	(Cyto)Keratin
<	kleiner als	Cl	Chlorid-Ion
>	größer als	Cldn	Claudin
~	ungefähr	CLR	C-Typ Lektin Rezeptor
≙	entspricht	cm	Zentimeter
А	Ampère	cm ²	Quadratzentimeter
Å	Ångström	CO_2	Kohlendioxid
A. dest.	Aqua destillata	СРЕ	Clostridium perfringens
Abb.	Abbildung		Enterotoxin
AD	Atopische Dermatitis	CT	cycle of threshold
ALI	Luft-Medium Grenze (von	Da	Dalton
	engl. Air-Liquid-Interface)	DAPI	4',6-Diamidin-2-
AMP	Antimikrobielles Peptid		phenylindol
ANOVA	Varianzanalyse (von engl.	DMSO	Dimethylsulfoxid
	analysis of variance)	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AS	Aminosäuren		(von engl.
BSA	Rinder-Serumalbumin		deoxyribonucleic acid)
	(von engl. bovine serum	dt.	deutsch
	albumin)	ECM	extrazelluläre Matrix (von
bzw.	beziehungsweise		engl. extracellular matrix)
С	Kapazität (von engl.	EDTA	Ethylendiamintetra-
	<i>capacity</i>)		essigsäure
c-terminal	Carboxy-terminal	EGTA	Ethylenglycol-
ca.	circa		bis(aminoethylether)-
Ca ²⁺	Calcium-Ion		tetraessigsäure
cCPE	c-terminale Domäne von	EM	Elektronenmikroskopie
	Clostridium perfringens	engl.	englisch
	Enterotoxin	ESD	extreme studentized
cDNA	komplementäre DNA (von		deviate
	engl. complementary)	et al.	und andere (von lat. et alii)

EtOH	Ethanol	kDa	Kilodalton
EZS	Extrazelluläre Schleife	KGF	Keratinozyten-
FCS	Fetales Kälberserum (von		Wachstumsfaktor (von
	engl. fetal calf serum)		engl. keratinocyte growth
FFA	Freie Fettsäuren (von engl.		factor)
	free fatty acids)	KO	Knockout
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	kΩ	Kilo-Ohm
Flg	Filaggrin	La ³⁺	Lanthan-Ion
g	Erdbeschleunigung	LB	Lamellar Body
	(9,81 m/s ²)	Lor	Loricrin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-	LPS	Lipopolysaccharide
	phosphat-Dehydrogenase	LSID	cCPE-
h	Stunde		L254A/S256A/I258A/D28
НаСаТ	Human adult low calcium		4A
	high temperature-	LY	Lucifer yellow
	Keratinozyten	М	Mol
hBD	humanes β -Defensin	m ²	Quadratmeter
HE	Hämalaun-Eosin	mA	Milli-Ampère
HKGS	Wachstumssupplement für	MAGUK	Membran-assoziierte
	humane Keratinozyten		Guanylat-Kinase
	(von engl. human	MDCK	canine Nierenepithelzellen
	keratinocytes growth		(von engl. Madin-Darby
	supplement)		canine kidney epithelial
Hz	Hertz		cells)
IF	Immunfluoreszenz	mg	Milligram
IgE	Immunglobulin E	Mg^{2+}	Magnesium-Ion
IL	Interleukin	min	Minute
Inv	Involucrin	ml	Milliliter
IQR	Interquartilsabstand (von	mm	Millimeter
	engl. interquartile range)	mM	Millimol
IV	Ichthyosis vulgaris	mm ²	Quadratmillimeter
JAM	junctional adhesion	mRNA	messenger RNA
	molecule	MUPP	multi-PDZ Domäne
KD	Knockdown		Protein

Ν	normal	$\mathbf{P}_{\mathbf{APP}}$	scheinbarer
N-terminal	Amino-terminal		Permeabilitätskoeffizient
Na ⁺	Natrium-Ion		(von engl. apparent
ng	Nanogramm		permeability coefficient)
NHEKs	normale humane	PBS	Phosphat-gepufferte
	epidermale Keratinozyten		Salzlösung (von engl.
NISCH	Neonatale Ichthyose-		phosphate buffered saline)
	Sklerosierende-Cholangitis	PCR	Polymerasekettenreaktion
nm	Nanometer		(von engl. polymerase
nM	Nanomol		chain reaction)
nm ²	Quadratnanometer	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
NMF	Natürlicher	PF	Pierre Fabre
	Feuchtigkeitsfaktor (von	pН	"Stärke des Wasserstoffs"
	engl. natural moisturizing		(von lat. potentia
	factor)		hydrogenii)
NOD	Nukleotid-bindende	PIM	Protease-Inhibitor-Mix
	Oligomerisierungs-	PRR	Mustererkennungsrezeptor
	Domäne		(von engl. pattern
Ocln	Occludin		recognition receptor)
OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen	qPCR	quantitative real-time PCR
	bei 600 nm Wellenlänge	R^2	Bestimmtheitsmaß
р	Wahrscheinlichkeitswert	R ^{api}	Widerstand der apikalen
	(von engl. probability		Zellmembran
	value)	R ^{bas}	Widerstand der basalen
Р	Poumay		Zellmembran
PAGE	Polyacrylamidgelelektroph	R ^{epi}	epidermaler Widerstand
	orese (von engl.	R ^{trans}	transzellulärer Widerstand
	polyacrylamide gel	RHE	rekonstruierte humane
	electrophoresis)		Epidermis
PAMP	Pathogen-assoziierte	RHS	rekonstruierte humane
	molekulare Muster (von		Haut (von engl.
	engl. pathogen-associated		reconstructed human skin)
	molecular patterns)	RNA	Ribonukleinsäure (von
			engl. ribonucleic acid)

R _p	Korrelationskoeffizient	SSP	Stratum spinosum
	nach Pearson	SSS	cCPE-
R ^{para}	parazellulärer Widerstand		S305P/S307R/S313H
R _s	Korrelationskoeffizient	Т	Tag
	nach Spearman	TAMP	TJ-assoziiertes Marvel
R ^{SC}	Widerstand des Stratum		Protein
	corneums	TBS	TRIS-gepufferte
R^{sub}	subepithelialer Widerstand		Salzlösung (von engl.
RT	Raumtemperatur		TRIS-buffered saline)
s, sek	Sekunde	TBST	TRIS-gepufferte
<i>S</i> .	Staphylococcus		Salzlösung mit Tween
SB	Stratum basale	TEC	TRIS-EDTA-Citrat
SC	Stratum corneum	TEM	Transelektronenmikros-
SCC	Plattenepithelkarzinom		kopie
	(von engl. squamous cell	TEMED	Tetramethylethan-1,2-
	carcinoma)		diamin
SD	Standardabweichung (von	TER	Transepithelialer
	engl. standard deviation)		elektrischer Widerstand
SDS	Natriumdodecylsulfat (von		(von engl. transepithelial
	engl. sodium dodecyl		electrical resistance)
	sulfate)	TEWL	Transepidermaler
SEM	Standardfehler (von engl.		Wasserverlust (von engl.
	standard error of the		transepidermal water loss)
	mean)	TGM	Transglutaminase
SG	Stratum granulosum	Th2	T Helferzellen Typ 2
shRNA	small hairpin RNA	TJ	Tight Junction
siRNA	small interfering RNA	TLR	Toll-like Rezeptor
SNP	Einzelnukleotid-	TNF	Tumornekrosefaktor
	Polymorphismus (von	TRIS	Tris(hydroxymethyl)amino
	engl. single nucleotide		methan
	polymorphism)	U/min	Umdrehungen pro Minute
SPRR	kleines Prolin-reiches	u.a.	unter anderem
	Protein (von engl. small	UV	Ultraviolett
	proline-rich protein)	ü.N.	über Nacht

V	Volt	ZO	Zonula occludens
vgl.	vergleiche	α	Alpha
W	Watt	β	Beta
WB	Western Blot	β- ME	Beta-Mercaptoethanol
WT	Wildtyp	μg	Mikrogramm
-X	-fach	μl	Mikroliter
YALA	cCPE-Y306A/L315A	μm	Mikrometer
Ζ	Impedanz	Ω	Ohm
z. B.	zum Beispiel	Δ	delta
z. T.	zum Teil	3D	dreidimensional

1 EINLEITUNG

1.1 DIE HUMANE HAUT UND IHRE FUNKTIONEN

Die Möglichkeit, mit seiner Umwelt zu interagieren und dabei die innere Homöostase aufrecht zu halten, ist für den menschlichen Körper überlebenswichtig. Die Haut übernimmt dabei eine zentrale Rolle, da sie eine Barriere zwischen dem Organismus und der Umwelt bildet, um vor dem Eintritt körperfremder Substanzen und schädigenden Einflüssen von außen (z.B. Bakterien, Allergene, UV-Strahlung oder Umweltgifte) zu schützen und gleichzeitig den Verlust von Wasser und Elektrolyten aus dem Körperinneren zu verhindern (Baroni *et al.*, 2012, Madison, 2003, Menon und Kligman, 2009). Neben der Abgrenzung des Körpers nach innen und außen ist die humane Haut auch in die Thermoregulation, in die Sinneswahrnehmung sowie in die Speicherung und Synthese von Vitamin D₃ involviert (Bikle und Pillai, 1993, Holick *et al.*, 1980, Moll, 2016). Auch eine Funktion als Sekretionsorgan wird in der Literatur diskutiert (Genuis *et al.*, 2011, Heidermanns *et al.*, 1956). In Abhängigkeit von Alter und Lokalisation am Körper kann die Hautdicke variieren, aber mit einer Fläche von ca. 1,5 bis 2 m² und einem Anteil von 16 % an der Gesamtkörpermasse ist sie eines der größten humanen Organe (Fenner und Clark, 2016, Haake *et al.*, 2001, Schallreuter und Wood, 1995).

1.2 STRUKTUR DER HUMANEN HAUT

Der Aufbau der humanen Haut kann von innen nach außen in die 3 Schichten Subkutis, Dermis und Epidermis unterteilt werden (Abbildung 1-1). Die unterste Schicht ist die Subkutis (Fettgewebe), deren Hauptbestandteil Adipozyten sind. Die Aufgaben des Fettgewebes liegen zum einen in der thermischen Isolierung und in der Speicherung von Fett als Energiereserve. Zum anderen fungiert es auch als endokrines Organ und ist es über die Sekretion von Hormonen



Abbildung 1-1: Schematischer Querschnitt humaner Haut. Die Haut besteht aus den drei Bestandteilen Subkutis, Dermis und Epidermis. Das Schema zeigt die Lage der einzelnen Schichten sowie verschiedene Hautanhangsgebilde.

(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Encyclopaedia Britannica, Inc., copyright 2013; genehmigte Verwendung). und Proteinen in die Immunabwehr und den Stoffwechsel involviert (Frühbeck *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2015). Außerdem verbindet die Subkutis die Haut mit den darunterliegenden Muskeln und Knochen und absorbiert mechanische Stöße (Fenner und Clark, 2016).

Die zweite Hautschicht (Dermis) ist von Blutgefäßen durchzogen, die für die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff auf der einen und den Abtransport von Abfallprodukten der dermalen und epidermalen Zellen auf der anderen Seite wichtig sind (Fenner und Clark, 2016, Schallreuter und Wood, 1995). Der Hauptzelltyp der Dermis ist der Fibroblast. Die Aufgabe der Fibroblasten ist es, Proteine der extrazellulären Matrix zu synthetisieren, vor allem Kollagen und verschiedene Glykane (Fritsch, 2009). Die extrazelluläre Matrix sorgt für mechanische Stabilität und Dehnbarkeit der Haut während elastische Fasern, die ebenfalls in der Dermis gebildet werden, wichtig sind für die Elastizität und Flexibilität (Moll, 2016). Darüber hinaus ist die Dermis durch die Anwesenheit von Makrophagen, Lymphozyten (T und B-Zellen) sowie Mastzellen in die Immunantwort der Haut involviert. In der Dermis sind auch verschiedene Hautanhangsgebilde lokalisiert. So befinden sich Schweißdrüsen, Haarfollikel und Talgdrüsen in der mittleren Hautschicht. Die Schweißdrüsen und Haarfollikel erstrecken sich vom subkutanen Gewebe über die Dermis bis in die Epidermis (Fenner und Clark, 2016, Haake et al., 2001, Wysocki, 1995). Im Übergangsbereich der Dermis zur Epidermis, dem Stratum papillare, befinden sich außerdem Mechanorezeptoren (Meissner- und Pacini-Körperchen), deren Stimulation je nach Intensität zu Juckreiz oder Entzündungen führen kann (Fenner und Clark, 2016, Moll, 2016). Durch die Basalmembran wird die Dermis von der Epidermis abgetrennt (Moll, 2016).

Bei der Epidermis, der äußersten Hautschicht, handelt es sich um ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, das zu 90 % aus Keratinozyten besteht. Aufrechterhalten wird das Epithel durch Proliferation der Keratinozyten in der untersten Zellschicht, dem *Stratum basale* (SB). Hier befinden sich auch Melanozyten, die in den UV-Schutz involviert sind, und die als Mechanorezeptoren fungierenden Merkelzellen (Fenner und Clark, 2016, Moll, 2016). Die stetige Erneuerung der Epidermis beruht darauf, dass kontinuierlich Keratinozyten aus dem palisadenartig angeordneten SB nach außen hin abgegeben werden. Auf ihrem ca. 28tägigen Weg durch die vier epidermalen Schichten durchlaufen sie mehrere Differenzierungsstadien (Haake *et al.*, 2001). Während dieser Differenzierung verändert sich das Expressionsmuster der Intermediärfilamente und Strukturproteine der Epidermis (vgl. Abbildung 1-2).



Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Aufbaus humaner Epidermis (A) und Lokalisation von Differenzierungsmarkern und Tight Junction Proteinen in humaner Epidermis (B). Die Epidermis besteht aus verschiedenen Zellschichten, innerhalb derer ein komplexer Differenzierungsprozess der Keratinozyten für eine konstante Erneuerung der Haut sorgt. Das Schema zeigt die vier Epidermisschichten Stratum basale (SB), Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum (SC). Die basalen proliferierenden Zellen stehen über Hemidesmosomen und Integrin-basierte Adhäsion mit der Dermis in Kontakt. Beide epidermalen Elemente gehen dafür über die Basalmembran hinweg Verbindungen mit der extrazellulären Matrix (ECM, von engl. extracellular matrix) ein. Während der Differenzierung der Keratinozyten entsteht in jeder der epidermalen Schichten eine einzigartige Architektur, die jeweils spezifische Elemente des Zytoskeletts und charakteristische Zell-Zell-Verbindungen (Adhärenskontakte, Tight Junctions, Desmosomen und Gap Junctions) enthält. Die Veränderungen der Zusammensetzung und Organisation der epidermalen Struktur ermöglichen die Morphogenese und die Unterstützung der spezifischen Funktionen der einzelnen Epidermisschichten von der regenerativen Kapazität im SB, bis zum Zusammenbau der Zellhülle und der terminalen Differenzierung der Zellen im SC. Die unterschiedliche Expression von Differenzierungsmarkern und Tight Junction (TJ)-assoziierten Proteinen ist dabei essentiell für die fortschreitende Entwicklung und die Etablierung der epidermalen Hautbarriere. (verändert nach Simpson et al., 2011; genehmigte Verwendung)

Zu Beginn werden Keratin 5 und 14 in den undifferenzierten Keratinozyten gebildet, die die Verankerung zur Basalmembran via Hemidesmosomen und den benachbarten Zellen via Desmosomen in der dermal-epidermalen Grenzschicht sicherstellen (Moll *et al.*, 2008, Simpson *et al.*, 2011). Im *Stratum spinosum* (SSP), der zweiten epidermalen Schicht, finden sich zahlreiche Desmosomen, die die Zell-Zell-Verbindungen aufrechterhalten und mit interzellulären Keratinfilamenten verbinden. Durch diese Verbindungen verleihen sie den Zellen in der Histologie ein spindelförmiges Aussehen. In den suprabasalen Schichten der Epidermis werden Keratin 1 und 10 exprimiert, die die beginnende Differenzierung anzeigen und ein robusteres Netzwerk aus Filamenten ausbilden. So entsteht ein sehr belastbares System,

das ein Reißen der Epidermis durch Scherkräfte verhindert (Fenner und Clark, 2016, Moll et al., 2008, Simpson et al., 2011). Die Langerhans-Zellen, die Teil des Immunsystems der Haut sind, liegen ebenso in der Spindelzellschicht (Fenner und Clark, 2016). Charakteristisch für das sich anschließende Stratum granulosum (SG) sind die Keratohyalingranula, die neben Keratinen auch Pro-Filaggrin (Flg, von engl. *filament aggregating protein*), Involucrin (Inv) und Loricrin (Lor) enthalten (Candi et al., 2005, Houben et al., 2007, Pappas, 2014). Im SG werden im Cytoplasma der Keratinozyten auch vermehrt Lamellar bodies (LBs) gebildet, in denen die Vorläufermoleküle der epidermalen Lipide als scheibenförmig angeordnete Doppellipidmembranen vorliegen (Downing, 1992, Elias und Menon, 1991, Landmann, 1986, Madison et al., 1988, Pappas, 2014). Außerdem enthalten sie verschiedene Enzyme, antimikrobielle Peptide und Proteine, die an der apikalen Seite der obersten Zellschicht im SG abgegeben werden und in die weitere Prozessierung von Lipiden und die Desquamation involviert sind (Elias und Menon, 1991, Menon et al., 2018, Raymond et al., 2008). Wichtig Differenzierung ist ein Calciumgradient innerhalb für die fortschreitende der Epidermisschichten, der von innen nach außen zunimmt und im SG die höchste extrazelluläre Calciumkonzentration erreicht (Bikle et al., 2012, Menon et al., 1985). Der Übergang der Zellen ins Stratum corneum (SC) schließlich ist gekennzeichnet durch die finale Differenzierung der Zellen bei der der Zellkern und die Zellorganellen vollständig degenerieren und die Keratinozyten durch Flg-vermittelte Aggregation von Keratinfilamenten im Cytoplasma abflachen (Eckhart et al., 2013, Fenner und Clark, 2016, Proksch et al., 2008). Im Zuge der terminalen Differenzierung wird die Zellmembran der Keratinozyten durch eine stabilere Hülle ersetzt, den "cornified cell envelope" (CE, dt. etwa verhornte Zellhülle). Dieser besteht aus zwei Teilen: einer Proteinhülle und einer Lipidhülle. Für die Entstehung der Proteinhülle werden Strukturproteine wie Inv, Lor und small proline-rich proteins (SPRRs) (späte Differenzierungsmarker) durch Transglutaminasen an der Plasmamembran quervernetzt (Candi et al., 2005, Eckhart et al., 2013, Kalinin et al., 2002). Ein weiteres mit der späten Differenzierung der Keratinozyten verbundenes Protein ist Repetin, für das eine Quervernetzung mit Lor und SPRRs nachgewiesen werden konnte und das damit ebenfalls in die Entstehung der CEs eingebunden ist (Huber et al., 2005). Parallel zur Bildung der Proteinhülle werden Lipide der LBs zur Lipidhülle umgewandelt, die die Plasmamembran ersetzt und über Esterverbindungen mit Inv, Periplakin oder Envoplakin der CE-Proteinhülle verbunden wird (Candi et al., 2005, Eckhart et al., 2013, Marekov und Steinert, 1998, Proksch et al., 2008). Die so entstandenen Korneozyten werden in der aus den LBs abgegebenen lipidreichen extrazellulären Matrix eingebettet (Eckhart et al., 2013, Proksch et al., 2008). Innerhalb des SC kommt es zu proteolytischen Prozessen, die in der Desquamation der Korneozyten kulminieren. Durch diesen präzise regulierten Mechanismus wird den Keratinozyten der unteren Epidermisschichten signalisiert, zu differenzieren, um die Homoöstase in der Epidermis aufrechtzuhalten (Candi *et al.*, 2005).

Alle lebenden Epidermisschichten sind von Nervenfasern durchzogen, die in engem Kontakt mit den Keratinozyten stehen (Hilliges *et al.*, 1995). Darüber hinaus sind epitheliale Zellen über verschiedene Kontakte miteinander verbunden. Die Adhäsionskontakte (Desmosomen und Adhärenskontakte) sorgen für mechanischen Zusammenhalt der Zellen durch eine Verankerung der Zellen im Zytoskelett. Der zweite Typ von Zell-Zell-Kontakten, die *Gap junctions* ermöglichen einen Austausch an Stoffen und Signalen, während die Tight Junctions hauptsächlich die parazelluläre Passage von Molekülen regulieren (Moll, 2016, Simpson *et al.*, 2011)(vgl. Kapitel 1.3 und 1.4.3).

1.3 TIGHT JUNCTION PROTEINE UND IHRE FUNKTIONEN

Tight Junctions (TJs) sind Zell-Zell-Verbindungen über die Endothel- und Epithelzellen in direktem Kontakt miteinander stehen. Elektronenmikroskopische Bilder zeigen die im apikalen Bereich der lateralen Membran lokalisierten Kontakte benachbarter Zellen als nahezu ohne interzelluläre Zwischenräume aneinander liegende Region, sogenannte Kissing points (Farquhar und Palade, 1963, Gonzalez-Mariscal et al., 2003, Tsukita et al., 2001). TJs werden aus Transmembranproteinen und assoziierten zytoplasmatischen Plaqueproteinen aufgebaut (Abbildung 1-3). Zu den integralen Membranbestandteilen der TJs zählen die Proteine aus der Familie der TJ-assoziierten Marvel Proteine (TAMPs), zu denen u.a. Occludin und Tricellulin gehören, die Familie der Claudine und die der Junctional Adhesion Molecules (JAMs). Die zytoplasmatischen Plaqueproteine inkludieren die MAGUK (Membran-assoziierte Guanylat Kinase)-Proteine der Zonula occludens (ZO-1/2/3), MAGUK-invertierte Proteine (MAGI), das multi-PDZ Domäne Protein 1 (MUPP1) sowie Cingulin, Symplekin und einige andere assoziierte Proteine. Insgesamt geht man aktuell von ca. 40 Proteinen aus, aus denen TJs aufgebaut sind (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). TJs bilden eine Barriere für den parazellulären Transport und sind in der Lage, bidirektional Moleküle größen- und ionenspezifisch zu selektieren und ihre Passage zu kontrollieren (Barrierefunktion) (Anderson, 2001). Bezüglich der Barrierefunktion von TJs wird zwischen dem leak pathway, der die Passage größerer Moleküle (Durchmesser >4 Å) in geringen Mengen ermöglicht, und dem *pore pathway*, der die Passage kleiner Ionen und Moleküle (<4 Å) erlaubt, unterschieden (Lingaraju et al., 2015, Shen et al., 2011, Van Itallie et al., 2008). Gleichzeitig sorgen TJs in Kooperation mit assoziierten Polaritätskomplexen für die Aufrechterhaltung der Polarität von Zellen, in dem sie die



Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten von Tight Junctions. Zonula occludens-1 (ZO-1) und/oder ZO-2 sind entscheidend für die Zusammenlagerung von Claudinen und Occludin, was zur Bildung von Tight Junction (TJ)-Strängen führt. Weitere integrale Membranbestandteile der TJs sind die Junctional Adhesion molecules (z.B. JAM-1). Die zytoplasmatischen Plaqueproteine (ZO-1, -2, -3, MAGI, MUPP1 sowie Cingulin) können eine direkte Verbindung zum Aktin-Zytoskelett (Actin) herstellen. (verändert nach (Niessen, 2007)), genehmigte Verwendung)

Membran in einen apikalen und einen basolateralen Teil trennen (Zaunfunktion) (Anderson et al., 2004, Schneeberger und Lynch, 2004). Occludin, das erste identifizierte Membranprotein des TJ-Komplexes, wird in humaner Epidermis anders als viele andere TJ-Proteine ausschließlich im SG exprimiert und wurde so zum idealen TJ Marker (Brandner et al., 2002, Furuse et al., 1993, Pummi et al., 2001). Auch die Expression von Cingulin ist auf das SG begrenzt, während Claudin-4 (Cldn-4) und ZO-1 zusätzlich zum SG auch in den oberen Lagen des SS zu detektieren sind. Dies gilt auch für das schwach exprimierte Cldn-3. Cldn-7 wird in allen lebenden Epidermisschichten exprimiert, allerdings nur sehr schwach im SB. Cldn-1, MUPP1 und JAM-A hingegen sind in allen lebenden Zellschichten der Epidermis lokalisiert (vgl. Abbildung 1-2) (Brandner, 2009, Brandner et al., 2002, Brandner et al., 2006). Die Bedeutung von TJs für die epidermale Barriere wurde bereits eindrucksvoll belegt und wird im nächsten Kapitel eingehend beleuchtet (vgl. Kap. 1.4.3). Das Vorkommen von TJ-assoziierten Proteinen in anderen epithelialen Bereichen als dem SG spricht für TJ-unabhängige Funktionen wie Zell-Adhäsion, Signaltransduktion, Apoptose, Proliferation, Wundheilung, Differenzierung und Vesikeltransport oder Desquamation (Igawa et al., 2011, Kirschner und Brandner, 2012, Kohler und Zahraoui, 2005, Matter et al., 2005, Rachow et al., 2013, Sugawara et al., 2013, Volksdorf et al., 2017). Über die TJ-Plaqueproteine sind TJs außerdem mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden wie z.B. durch die Bindung zwischen ZO-Proteinen und Claudinen (vgl. Kapitel 1.5) (Guillemot et al., 2008).

1.4 EPIDERMALE BARRIERE

In der humanen Epidermis liegt ein komplexes Barrieresystem, das den Eintritt von körperfremden Substanzen und den Verlust körpereigener Stoffe reguliert. Für eine lange Zeit wurde allein dem *Stratum corneum* die Barrierefunktion der Epidermis zugesprochen.

Sicherlich spielen die Lipid-Korneozyt-Elemente der Epidermis eine wichtige Rolle für die Barriere (Downing, 1992, Lampe *et al.*, 1983, van Smeden *et al.*, 2014). Allerdings konnte in den letzten Jahren auch ein weiteres mechanisches System bestätigt werden, welches zur Hautbarriere beiträgt und dessen Existenz schon lange vermutet wurde (Hashimoto, 1971, Rothman und Flesch, 1944). Diese zweite physikalische Barriere wird im SG durch Tight Junctions gebildet (Brandner *et al.*, 2002, Brandner *et al.*, 2006, Furuse *et al.*, 2002, Morita *et al.*, 1998, Pummi *et al.*, 2001, Yoshida *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird die Barrierefunktion der Haut auch durch das Mikrobiom, chemische Prozesse und immunologische Antworten ausgeübt (Bäsler *et al.*, 2016). Im Folgenden werden die einzelnen Barrieren anhand ihrer Lage in der Epidermis von außen nach innen genauer beschrieben.

1.4.1 MIKROBIELLE BARRIERE

Die humane Haut ist dicht besiedelt von einer großen Anzahl verschiedener residenter Organismen. Hierzu zählen neben aeroben und fakultativ-anaeroben Bakterien auch Viren, Pilze und Milben (Sanford und Gallo, 2013). Im Laufe des Lebens kommt der menschliche Körper auch mit transienten Mikroben in Kontakt, die Bakterien, Mykobakterien, Viren und Pilze einschließen. Etliche dieser Organismen sind apathogen und leben symbiotisch mit dem Wirt zusammen, ohne ihn zu beeinflussen. Andere transiente, aber auch manche der residenten Mikroben, können zu schwerwiegenden Hautinfektionen führen, wenn sie pathogen sind oder Hautbarriere und/oder Immunsystem gestört sind (Fyhrquist et al., 2016, Sanford und Gallo, 2013). Ein prominentes Beispiel für eine bakterielle Hautinfektion ist die Impetigo contagiosa, der eine Infektion mit Staphylococcus aureus (S. aureus) oder Streptococcus pyogenes zugrunde liegt (Rassner, 2009). Andere infektiöse Mikroorganismen sind Candida albicans als Beispiel für eine Pilzinfektion oder Herpes Simplex und humane Papillomaviren, die Virusinfektionen auslösen können. Bei einem gesunden Menschen sorgt das residente Mikrobiom durch Konkurrenz um Lebensraum und Nahrung sowie Ausschüttung bakterizid wirkender Substanzen für einen Schutz vor Besiedlung durch pathogene Organismen (Byrd et al., 2018, Pasparakis et al., 2014). Außerdem werden das adaptive Immunsystem angepasst und die angeborene Immunantwort verbessert (Sanford und Gallo, 2013). Im Falle einer chronischen entzündlichen Hauterkrankung kann sich die Zusammensetzung des Mikrobioms zugunsten der pathogenen Organismen ändern. Die Diversität der Mikroben ist beispielsweise bei Atopischer Dermatitis (AD), Psoriasis und Akne verändert (Weyrich et al., 2015). So erhöht sich bei AD der Anteil an *Staphylococcus spp.* auf der Haut von Patienten (Kong *et al.*, 2012).

1.4.2 STRATUM CORNEUM-BARRIERE

Das SC, auch Hornschicht genannt, besteht je nach Lokalisation aus ca. 10 bis 20 Zellschichten der Keratin-gefüllten Korneozyten (Ya-Xian *et al.*, 1999). Der extrazelluläre Raum im SC ist gefüllt von aus LBs abgegebenen Lipiden. Diese Matrix aus Ceramiden (CER), Cholesterol (CHOL) und freien Fettsäuren (FFA, von engl. *free fatty acids*) in Kombination mit den über Corneodesmosomen (durch Integration von Corneodesmosin modifizierte Desmosomen) fest verbundenen Korneozyten bietet eine effektive mechanische Barriere gegen Permeabilität. Für ihre Funktionalität sind die Zusammensetzung der Lipide und ihre Organisation elementar (Proksch *et al.*, 2008). Untersuchungen an gesunder humaner Haut haben ergeben, dass die SC Lipide ein nahezu äquimolares Gemisch der oben genannten Lipidklassen sind (Weerheim und Ponec, 2001). Die interzellulären Lipidlamellen sind in hohem Maße geordnet und parallel zur Zelloberfläche orientiert (Doucet *et al.*, 2014, Madison *et al.*, 1987, Schurer und Elias, 1991). Ändern sich die Anteile an CERs, CHOLs und FFAs und/oder die Orientierung der Lipidlamellen wie bei AD, Psoriasis, Lamellarer Ichtyose, u.a., führt dies zu einer Reduktion der Barrierfunktion (van Smeden *et al.*, 2014).

Das Protein Filaggrin hat eine essentielle Funktion beim Aufbau des SC. Es ist entscheidend für die korrekte Bündelung der Keratinfilamente in Korneoyzten (Gruber et al., 2011, Sandilands et al., 2009). Bei Ichtyosis vulgaris, einer Hauterkrankung, die auf dem Verlust der Flg-Expression basiert, kommt es zum Verlust von Keratohyalingranula und zur Bildung eines verdickten SCs. Beides geht mit einer verringerten Barrierefunktion einher (Kezic und Jakasa, 2016, Sandilands et al., 2009). Auch bei AD, einer weit verbreiteten entzündlichen Erkrankung der Haut mit trockener schuppiger Haut und starker Neigung zur Ekzembildung, ist die Hautbarriere gestört. Mutationen innerhalb des für Flg kodierenden Gens, die zu einem Funktionsverlust führen, stellen einen starken prädisponierenden Risikofaktor für die Entstehung von AD dar (Kezic et al., 2014). Ferner konnten Defizite in der Expression von Transglutaminase-1 mit einer veränderten Funktionalität des SC verbunden werden (Matsuki et al., 1998). Innerhalb des SC werden außerdem Filaggrinmonomere von Keratin gelöst, zu natürlichen Feuchtigkeitsfaktoren (NMFs von engl natural moisturizing factors) degradiert und durch Caspase-14 prozessiert. Diese Faktoren bestehen u.a. aus Aminosäuren, Harnstoff sowie Milchsäure und sorgen für eine stetige Feuchtigkeit der Korneozyten, die sie resistent gegen eindringende Mikroben machen soll (Cork et al., 2009, Denecker et al., 2008, Harding et al., 2000, Rawlings, 2014). Dem SC wird auch eine Rolle im Schutz gegen UVB-Strahlen zugesprochen. Im Gegensatz zur UVA-Strahlung, die bis zur Dermis vordringen kann wird die kurzwelligere UVB-Strahlung hauptsächlich in der Epidermis absorbiert. Hier steht neben der

großen Dichte an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren mit Urocaninsäure ein NMF zur Verfügung, dem photoprotektive Eigenschaften zugesprochen werden (Barresi *et al.*, 2011, Tabachnick, 1957). Der pH-Wert des SCs ist ebenfalls in die Barrierefunktion involviert (vgl. Kapitel 1.4.4).

1.4.3 TIGHT JUNCTION-BARRIERE

Zum Jahrtausendwechsel wurde mithilfe von Proteinanalysen und mikroskopischen Untersuchungen der Nachweis erbracht, dass in der Haut TJs lokalisiert sind (Brandner et al., 2002, Morita et al., 1998, Pummi et al., 2001, Yoshida et al., 2001). Furuse et al. konnten 2002 mit Cldn-1-knockout (KO) Mäusen, die innerhalb weniger Stunden nach der Geburt aufgrund eines erheblichen Wasserverlustes starben, eindrucksvoll den Beweis für den Anteil von TJ-Molekülen an der funktionierenden epidermalen Barriere erbringen. Ferner konnte er mithilfe eines Barriereassays mit einem ca. 556 Da großen Biotin-SH-Tracermolekül (Biotin-556) darlegen, dass Cldn-1-positive TJs im SG2 eine Barriere für Moleküle auf dem Weg von innen nach außen darstellen (Furuse et al., 2002). An humaner Epidermis erfolgte die Beschreibung der barriere-bildenden TJs 2010 durch Kirschner et al. Hierbei wurde die innen-nach-außen Barriere für Biotin-556 an Ocln- und Cldn-1-positiven TJs im SG nachgewiesen (Kirschner et al., 2010). Auch in einem porcinen Modell konnte kürzlich der Nachweis über die TJ-Barriere für dieses Biotinmolekül erbracht werden (Herbig et al., 2015). Für größere Biotinmoleküle (Biotin-dPEGTM(24)-NHS (1469 Da) und Biotin-PEG-NHS (5000 Da)) wurde die innen-nachaußen TJ-Barriere bisher nur in muriner Haut beschrieben (Yokouchi et al., 2015). Yoshida et al. zeigten in humaner Epidermis eine Barriere für ein 32 kDa großes Molekül mit Lokalisation an den TJs im SG2 (Yoshida et al., 2013). Untersuchungen an primären humanen Keratinozyten (NHEKs, von engl. normal human epidermale keratinocytes) zeigten eine Beteiligung der TJs an der Barriere für Ionen (Na⁺, Cl⁻ und Ca²⁺) und das 332 Da große Fluorescein sowie für Makromoleküle (3, 4 und 40 kDa FITC Dextran) (De Benedetto et al., 2011, Kirschner et al., 2013, Mertens et al., 2005, Yuki et al., 2007). Im Speziellen konnten Cldn-1, -4, Ocln und ZO-1 mit der Barrierebildung in Verbindung gebracht werden (Kirschner et al., 2013).

Auch die innen-nach-außen Barriere für das ionische Übergangsmetall Lanthan (La³⁺) konnte an den TJs nachgewiesen und mit der Expression von Cldn-1 und Cldn-4 assoziiert werden (Baek *et al.*, 2013, Hashimoto, 1971, Ishida-Yamamoto *et al.*, 2012). Allerdings ist es sowohl bei dieser Barriere als auch bei der außen-nach-innen Barriere schwierig, zwischen dem TJspezifischen Anteil und dem Anteil des SCs zu unterscheiden (Brandner *et al.*, 2015). Im gesunden Zustand der Haut werden Tracer auf dem Weg von außen nach innen in großem Maße durch das SC am Eindringen in die Haut gehindert. Daher konnte bisher auch nicht die Beteiligung von TJs an dieser Barriere in gesunder Haut gezeigt werden. Grundsätzlich sind TJs aber bidirektional, so dass Tracer auch auf der Passage nach innen von ihnen aufgehalten werden sollten, wenn sie sie z.B. aufgrund eines defekten SC erreichen könnten (Anderson, 2001, Yuki *et al.*, 2013).

1.4.4 CHEMISCHE BARRIERE

Hauptbestandteil der chemischen Hautbarriere sind antimikrobielle Peptide (AMPs). Diese werden sowohl von Keratinozyten als auch von Immunzellen gebildet und sind neben dem Schutz vor Mikroben auch in inflammatorische Prozesse und die Wundheilung involviert (Lai und Gallo, 2009, Mangoni *et al.*, 2016, Schittek *et al.*, 2008, Steinstraesser *et al.*, 2008). AMPs kontrollieren das Wachstum von Mikroben auf der Haut und sind wichtig für das Verhältnis zwischen Wirt und residenten Organismen (Baroni *et al.*, 2012, Lai *et al.*, 2010). Ihr Wirkspektrum reicht von Bakterien über Viren bis zu Pilzen und deckt somit einen Großteil der infektiösen Mikroorganismen ab (Baroni *et al.*, 2012, Braff *et al.*, 2005). Manche AMPs werden konstitutiv exprimiert wie humanes β -Defensin (hBD)-1 oder Dermcidin während andere in Folge von Stimuli wie Verletzung, Entzündung oder Infektion produziert werden (z.B. hBD-2, hBD-3 oder Cathelicidin LL-37) (Braff *et al.*, 2005, Clausen und Agner, 2016, Mangoni *et al.*, 2016, Schittek *et al.*, 2008). Daneben hemmt auch der saure pH-Wert des SCs (pH 4 – 6) das Wachstum pathogener Bakterien und ist somit wichtiger Bestandteil der chemischen Hautbarriere (Fluhr und Elias, 2002).

1.4.5 IMMUNOLOGISCHE BARRIERE

Auf Schädigungen z.B. durch UV-Licht, eindringende Allergene oder Pathogene sowie mechanische Traumata reagiert die Haut mit der Aktivierung des Immunsystems. Neben den Immunzellen der Haut (Langerhans-Zellen, dendritische Zellen, Mastzellen, Basophile und T-Zellen) ist auch die humorale Immunantwort durch Cytokine (Interferone, Interleukine, Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren und Chemokine) Teil der immunologischen Barriere. Cytokine sind in zahlreiche Prozesse in der Haut involviert. Sie vermitteln und regulieren Differenzierung, Migration, Adhäsion, Proliferation, Entzündungsreaktionen, Immunantwort sowie Wundheilungsprozesse und bewahren so die Homöostase der Haut (Hänel *et al.*, 2013, Omori-Miyake *et al.*, 2014, Watkins *et al.*, 1995). Über die Ausschüttung verschiedener pro-inflammatorische Cytokine (z.B. IL-1 β , IL-6, TNF) regulieren die Zellen der Haut die Aktivität und/oder die Rekrutierung von Immunzellen und verbinden so angeborene und spezifische Immunantwort (Fritsch, 2009, Watkins *et al.*, 1995). Langerhans-Zellen und dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle dabei, die spezifische Immunantwort auf

Pathogene auszulösen, während andere Antigene toleriert werden. Hochkonservierte Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs, dt. etwa Mustererkennungsrezeptoren) identifizieren Pathogene anhand von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs, von engl. **p**athogen-**a**ssociated *m*olecular **p**atterns) wie Lipopolysacchariden oder (LPS) Peptidoglykanen (Fritsch, 2009, Kawai und Akira, 2009). PRRs der Haut sind Toll-like Rezeptoren (TLR), Nukleotid-bindende Oligomerisierungs-Domäne (NOD)-like Rezeptoren und C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR). Bakterien werden dabei durch verschiedene TLRs und NODs erkannt, während TLR3 die Anti-Virusreaktion einleitet (Kawai und Akira, 2006, Kobayashi *et al.*, 2009). Der CLR Dectin-1 erkennt β -Glukan als Bestandteil der Zellwand von Bakterien, Hefen und Pilzen und löst daraufhin die Immunantwort aus (Kobayashi et al., 2009). Sowohl angeborene als auch erworbene Immunantwort lösen Inflammationsreaktionen in der Haut aus, mit denen eine lokale Begrenzung der Verletzung erreicht werden soll (Watkins et al., 1995).

1.5 CLAUDINE

Wie bereits beschrieben, nehmen die Claudine eine zentrale Rolle bei der Entstehung von TJs und der TJ-Barriere ein und sollen im Folgenden daher genauer beschrieben werden.

1.5.1 STRUKTUR DER CLAUDINE

Claudine sind über viele Organismen hinweg stark konservierte Transmembranproteine. Humane Claudine umfassen etwa 207-305 Aminosäuren (AS) und sind etwa 21-34 kDa groß (Günzel und Yu, 2013). Bislang sind 27 Claudine in Säugetieren bekannt, die zum Teil gewebeoder entwicklungsspezifische Expressionsmuster zeigen (Mineta et al., 2011, Tsukita et al., 2001). Die Struktur von Claudinen ist geprägt von einem kurzen N-terminalen Ende, dem vier Transmembrandomänen mit zwei extrazellulären Schleifen und ein in der Länge sehr unterschiedliches C-terminales Ende (25-55 AS) folgen (siehe Abbildung 1-4) (Krause et al., 2008). Die erste extrazelluläre Schleife (EZS1) enthält zwei konservierte Cysteinreste, die eine Disulfidbrücke im parazellulären Raum bilden, und je nach Claudin unterschiedlich geladene Reste. Daher rührt die Idee, dass sie eine Rolle in der ladungsspezifischen Barriere von TJs spielen (Angelow et al., 2008, Colegio et al., 2003, Colegio et al., 2002). Über die zweite extrazelluläre Schleife (EZS2) können Interaktionen zwischen Claudinen entlang der Plasmamembran derselben Zelle (cis-Interaktion) oder von gegenüberliegenden Zellen (trans-Interaktionen) vermittelt werden (Krause et al., 2008). In trans-Interaktionen scheint auch die EZS1 involviert zu sein (Krause et al., 2015). Für die Claudine in TJs wurden unterschiedliche Präferenzen bezüglich heterophiler (zwischen verschiedenen Claudinen) bzw. homophiler



Abbildung 1-4: Schematisches Modell der Claudin-Struktur. Das Modell zeigt die Topologie der Claudine mit den vier prognostizierten Transmembrandomänen (1-4) sowie den zwei extrazellulären Schleifen (EZS). Außerdem sind die konservierten Aminosäurereste (AS, schwarz) und einige molekulare Eigenschaften eingezeichnet. Charakteristisch ist das PDZ-Bindemotiv (violett) im COOH-terminalen Bereich, über das sie mit anderen Tight Junction(TJ)-Proteinen interagieren können. Geladene Aminosäurereste (gelb) können die parazelluläre Ladungsselektivität der TJs beeinflussen. In der längeren EZS1 (etwa 50 AS) liegt darüber hinaus vermutlich ein Cysteinpaar, das eine Disulfidbrücke ausbilden kann. In EZS2 (etwa 25 AS) liegt die Bindestelle für das *Clostridium perfringens* Enterotoxin (CPE, grau). Im cytoplasmatischen Teil der Claudine finden sich darüber hinaus mögliche Palmitoylierungs- (grün) und Phosphorylierungsstellen (weiß).

(zwischen gleichen Claudinen) Interaktionen herausgestellt. Für Cldn-1 ist bisher bekannt, dass es *trans*-interagiert mit Cldn-3, aber nicht mit Cldn-2 oder Cldn-4. Die *trans*-Interaktionen zwischen Cldn-3/Cldn-1 bzw. Cldn-5/Cldn-1 sind stärker ausgeprägt als die zwischen Cldn-3/Cldn-5. Für Cldn-1, -2, -3 und -5 sind darüber hinaus starke homophile *trans*-Interaktionen möglich.

Für *cis*-Interaktionen wurden folgende Präferenzen analysiert: Cldn-5/Cldn-5 > Cldn-5/Cldn-1 > Cldn-3/Cldn-1 > Cldn-3/Cldn-3 > Cldn-3/Cdn5 (Piontek *et al.*, 2011). Cldn-4 scheint keine homophilen *cis*-Interaktionen auszubilden. *Cis*-Interaktionen zwischen Cldn-16 und Cldn-19 sowie zwischen Cldn-4 und Cldn-8 scheinen für den korrekten Zusammenbau der TJs und die Bildung parazellulärer Ionenpermeabilität nötig zu sein (Hou *et al.*, 2009, Hou *et al.*, 2010). Neben den Claudin/Claudin-Interaktionen konnten auch Interaktionen zwischen Claudinen und TAMPs nachgewiesen werden (Cording *et al.*, 2013, Koval, 2013). Die Expression und Interaktion verschiedener TJ-Proteine scheint daher für Morphologie und Funktionalität der TJs eine Rolle zu spielen. In der EZS2 liegt auch die Bindestelle für das *Clostridium perfrigens* Enterotoxin (CPE). Dieses Toxin ist ursächlich für schwere Darmerkrankungen bei Lebensmittelvergiftung, indem es an Claudine des Darmepithels bindet und die parazelluläre

Permeabilität für Flüssigkeit und Elektrolyte verändert und zum Zelltod führt (Veshnyakova *et al.*, 2010).

Das C-terminale Endstück unterscheidet sich zwischen Claudinen zum Teil erheblich in seiner Länge. Über das dort enthaltene PDZ-Bindemotiv können Claudine direkt mit PDZ-enthaltenen TJ-assoziierten Plaqueproteinen (z.B. ZO-1/-2/-3) interagieren und so durch den indirekten Kontakt zum Aktin-Zytoskelett in den TJs stabilisiert werden (Itoh *et al.*, 1999).

Posttranslationale Modifikationen wie Palmitoylierung der Transmembrandomänen und Phosphorylierung scheinen zusätzliche wichtige Schritte für die Oligomerisierung, Lokalisierung, den korrekten Zusammenbau und die Interaktion innerhalb der TJs sowie für deren Barrierefunktion zu sein (González-Mariscal *et al.*, 2010, Van Itallie *et al.*, 2005). Wird hingegen durch Dephosphorylierung von Cldn-1 und ZO-1 deren Interaktion verändert, lässt die Barrierefunktion nach (Nunbhakdi-Craig *et al.*, 2002).

1.5.2 CLAUDINE IN DER BARRIEREFUNKTION VON ENDOTHELIEN UND EPITHELIEN

Für die Barrierefunktion von TJs ist die Kombination der exprimierten Claudine entscheidend, so dass Epithelien-spezifische Charakteristika des parazellulären Transportes entstehen können (Günzel und Yu, 2013, Van Itallie und Anderson, 2006). Man unterscheidet zwischen den porenbildenden (pore forming) und abdichtenden (sealing) Claudinen. Während Cldn-1, -3 bis -9, -11 und -14 eher der letztgenannten Gruppe zugeordnet werden und mit verringertem parazellulärem Transport assoziiert sind, stehen Cldn-2, -10, -12, -15 und -17 mit erhöhter parazellulärer Permeabilität in Zusammenhang (Günzel und Yu, 2013). Veränderungen in der Claudin-Expression wirken sich zum Teil erheblich auf den Phänotyp verschiedener Epithelien und Endothelien aus (Anderson und Van Itallie, 2009, Furuse und Tsukita, 2006). Beim Menschen konnte ein Zusammenhang zwischen Mutationen von CLDN-1 und dem Neonatalen Ichthyose-Sklerosierende-Cholangitis (NISCH)-Syndrom hergestellt werden. Das NISCH-Syndrom manifestiert sich bei komplettem Verlust von Cldn-1 und zeigt sich durch Ichthyose, Alopezie, spärlichen Wuchs von Wimpern und Augenbrauen sowie Zahnproblemen. Außerdem treten schwerwiegende Veränderungen an Gallengängen und der Leber (z.B. Hepatomegalie und Gelbsucht) auf (Baala et al., 2002, Feldmeyer et al., 2006, Hadj-Rabia et al., 2004, Kirchmeier et al., 2014, Paganelli et al., 2011). Bei Mäusen wirkt sich der Verlust von Cldn-1 deutlich gravierender aus und führt aufgrund einer gestörten Hautbarriere innerhalb weniger Stunden nach Geburt zum Tod (vgl. Kapitel 1.6) (Furuse et al., 2002).

In weiteren Mausmodellen konnte außerdem gezeigt werden, dass Claudine einen großen Einfluss auf die Spezifität für die Ladung und die Größe der Moleküle haben, die durch die TJs strömen. Fehlt Cldn-5 in der Bluthirnschranke von Mäusen, wird die Größenselektivität beeinträchtigt und Moleküle bis 800 Da können passieren (Nitta *et al.*, 2003). Mäuse mit Cldn-15 KO zeigen einen Mangel bei der Natrium-Permeabilität und der Glucose-Aufnahme im Darm (Tamura *et al.*, 2011). Der Einsatz von CPE und die daraus resultierende Entfernung von Claudinen aus den funktionalen TJ Komplexen führte in caninen Nierenepithelzellen (MDCK-Zellen, von engl. *Madin-Darby canine kidney* epithelial cells) und Caco-2 Zellen zu einer gestörten Barrierefunktion und einem Anstieg der Permeabilität (Sonoda *et al.*, 1999, Takahashi *et al.*, 2005).

Auch eine Überexpression kann Einfluss auf die Barrierefunktion der TJs haben. MDCK-Zellen, in denen Cldn-1 überexprimiert wurde, zeigten einen erhöhten transepithelialen elektrischen Widerstand (TER, von engl. *transepithelial electrical resistance*) und reduzierte parazelluläre Permeabilität (Inai *et al.*, 1999). Überexpression von Cldn-4 resultierte in Zellen der Speicheldrüse und in MDCK-Zellen in einem Anstieg des TER und einem verringerten Kationentransport (Michikawa *et al.*, 2008, Van Itallie *et al.*, 2001, Van Itallie *et al.*, 2003). Entgegengesetzte Auswirkungen hatte die Transfektion von MDCK-Zellen mit Cldn-2. Hier wurden die TJs durchlässig für Kationen und Wasser (Amasheh *et al.*, 2002, Rosenthal *et al.*, 2010). Bei homozygoter Überexpression von Cldn-6 zeigten Mäuse einen erhöhten Wasserverlust, eine veränderte Zusammensetzung der Epidermis, eine erhöhte Permeabilität von innen-nach-außen und sie starben binnen 48 Stunden nach ihrer Geburt (Turksen und Troy, 2002). Heterozygote Überexpression verzögerte die Entstehung der außen-nach-innen Barriere, veränderte die Differenzierung und die Mäuse zeigten einen zeitweise erhöhten Wasserverlust, der hier aber weniger ausgeprägt war (Troy *et al.*, 2005).

1.6 CLAUDIN-1 IN DER HAUT

Cldn-1 trägt maßgeblich zur Hautbarriere bei und zeigt bei einigen Hautkrankheiten Veränderungen im Expressionsmuster. Der *knockout* von Cldn-1 führt in Mäusen zu einem letalen Verlust der Hautbarriere wie Furuse *et al.* 2002 zeigen konnten (Furuse *et al.*, 2002). Die Mäuse sterben aufgrund eines erhöhten Wasserverlustes. Dieser basiert aber nicht auf einer erhöhten Wasserpermeabilität von Keratinozyten (Kirschner *et al.*, 2013), sondern auf einer erhöhten Wasserpermeabilität des SC (Sugawara *et al.*, 2013). Der zugrundeliegende Cldn-1-abhängige Mechanismus, also die Art des Einflusses auf die Protein- und/oder Lipidzusammensetzung des SC und dessen Organisation, ist noch unklar. Die Expression von für die SC-Bildung wichtigen Proteinen (Inv, Lor, Flg und TGM-1) wird durch Verlust von Cldn-1 in NHEKs (nach KD) und in murinen Cldn-1 KO-Zellen ebenso verändert wie die Lipidzusammensetzung im SC von Cldn-1 KO Mäusen (Gruber *et al.*, 2015, Kirschner *et al.*, 2010, Kirschner *et al.*, 2013). In humanen Keratinozyten konnte die

Beteiligung von Cldn-1 an der TJ-Barriere anhand verschiedener Ionen und Moleküle mit Größen zwischen 332 Da und 40 kDa nachgewiesen werden (De Benedetto *et al.*, 2011, Kirschner *et al.*, 2013, Yuki *et al.*, 2007). Die Beeinträchtigung der Barriere für einen 557 Da großen Biotin-Tracer in Abhängigkeit von Cldn-1 wurde auch in KO-Mäusen gezeigt (Furuse *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte eine Beteiligung von Cldn-1 an der Wundheilung belegt werden. Untersuchungen an chronischen Wunden zeigten einen deutlichen Verlust von Cldn-1, während in akuten Wunden Cldn-1 nachgewiesen wurde. In humanen primären Keratinozyten, in denen Cldn-1 mittels *Knockdown* reduziert war, wurden sowohl Zellmigration als auch die Proliferation vermindert und damit die Wundheilung negativ beeinflusst (Volksdorf *et al.*, 2017).

In der Haut von einigen NISCH-Patienten erschien das SC ähnlich wie bei der Cldn-1 KO Maus dicker und kompakter und es wurden vermehrt Corneodesmosomen gefunden (Baala *et al.*, 2002, Feldmeyer *et al.*, 2006, Furuse *et al.*, 2002, Hadj-Rabia *et al.*, 2004, Kirchmeier *et al.*, 2014). Verringerte Mengen von Keratohyalin im humanen SG bei diesen Patienten könnten wie bei *Ichthyosis vulgaris* (IV) für ein grundsätzlich erniedrigtes Flg-Level im SC sprechen (Kirchmeier *et al.*, 2014, Sybert *et al.*, 1985). Bei Cldn-1 KO-Mäusen konnte hingegen eine Akkumulation von Pro-Flg und damit eine veränderte Flg-Prozessierung gezeigt werden (Sugawara *et al.*, 2013). Der größte Unterschied zwischen Maus und Mensch ist, dass letzterer ohne Cldn-1 lebensfähig ist. Funktionelle Analysen der in der Maus so stark betroffenen Hautbarriere fehlen bislang bei den 16 am NISCH-Syndrom erkrankten beschriebenen Personen (Szepetowski *et al.*, 2017).

Bei verschiedenen Hautkrankheiten konnten veränderte Expressionslevel von Claudin-1 ausgemacht werden. Eine dieser Erkrankungen ist die Atopische Dermatitis (AD). Die dabei auftretenden Barrieredefekte äußern sich z.B. in einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust (TEWL, von engl. *transepidermal water loss*) und in einer gestörten außen-nachinnen Barriere sowohl in nicht-läsionaler (weniger ausgeprägt) als auch in läsionaler Haut (De Benedetto *et al.*, 2011, Gruber *et al.*, 2015, Jakasa *et al.*, 2006, Jakasa *et al.*, 2007, Kezic *et al.*, 2014). De Benedetto *et al.* fanden 2011 eine Reduktion des Cldn-1 Levels in nicht-läsionaler Haut von AD-Patienten verglichen mit gesunder Haut und Patienten mit Psoriasis in einer nordamerikanischen Kohorte (De Benedetto *et al.*, 2011). Für das SG und das untere SSP/SB in nicht-läsionaler Haut einer deutschen Patientengruppe konnten kürzlich ebenfalls reduzierte Cldn-1 Immmunfluoreszenzintensitäten im Vergleich zu gesunder Haut beobachtet werden (Daten der AG Brandner, Bergmann *et al.*, in Vorbereitung). Untersuchungen einer österreichischen und einer weiteren nordamerikanischen Patientengruppe zeigten keine Reduktionen von Cldn-1 in nicht-läsionaler Haut (Gruber *et al.*, 2015, Yuki *et al.*, 2016). Für läsionale Haut wurde die Reduktion von Cldn-1 hingegen mehrfach beschrieben (Batista *et al.*, 2015, Gruber *et al.*, 2015, Yuki *et al.*, 2016). Koreanische Forscher konnten im Gegensatz zu einer populationsbasierten Studie in einer krankenhausbasierten Studie eine Korrelation zwischen einem *CLDN-1* Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, von engl. *single nucleotide polymorphism*) und AD ausmachen (Yu *et al.*, 2015). 2016 konnte auch für eine äthiopische Kohorte eine Assoziation zwischen einem *CLDN-1* SNP und AD gezeigt werden (Asad *et al.*, 2016). In einer dänischen Kohorte konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden (Ross-Hansen *et al.*, 2013). Diese Studien sprechen zusammengenommen für Unterschiede in der genetischen Beteiligung von *CLDN-1* an AD.

Auch bei *Psoriasis vulgaris* ist die Hautbarriere in läsionaler Haut in beide Richtungen gestört und es zeigt sich dort ein vermindertes Cldn-1 Level (Brandner *et al.*, 2006, Kirschner *et al.*, 2009, Peltonen *et al.*, 2007, Schaefer *et al.*, 1977, Shani *et al.*, 1985, Takahashi *et al.*, 2014, Watson *et al.*, 2007).

1.7 CLAUDIN-4 IN DER HAUT

Die physiologische Funktion von Cldn-4 in der Haut ist bisher nicht final geklärt. Die TJ-Barriere von überflutet kultivierten Keratinozyten wird durch den Verlust von Cldn-4 gestört, was sich durch erhöhte Permeabilität für Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Fluorescein und ein 4 kDa großes FITC-Dextran äußert (Kirschner et al., 2013). Cldn-4 zeigt in Hautkrankheiten oft Veränderungen in der Expression und der Lokalisation. So zeigte sich im Plattenepithelkarzinom (SCC, von engl. Squamous cell carcinoma) eine dominante Expression von Cldn-4 in verhornenden Zellen (Morita et al., 2004). Rachow et al. zeigten hingegen, dass die Expression von Cldn-4 im SCC auf mehr Zellschichten ausgedehnt ist als in gesunder Haut. Diese Änderungen des Expressionsmusters konnten auch in sonnenexponierter Haut nachgewiesen werden (Rachow et al., 2013). Auch bei Psoriasis zeigte sich eine im Vergleich zu gesunder Haut verbreiterte Cldn-4 Expression in der läsionalen Epidermis (Kirschner et al., 2009, Peltonen et al., 2007). Für die Epidermis von AD-Patienten gibt es kontroverse Aussagen über die Lokalisation und Expression von Cldn-4. Zum einen gibt es Ergebnisse, die für eine gesteigerte Expression in nicht-läsionaler Haut sprechen (Gruber et al., 2015 und Daten der AG Brandner in Bergmann et al., in Vorbereitung), während Yuki et al. ein reduziertes Cldn-4 Level in nicht-läsionaler Haut beobachteten (Yuki et al., 2016). In läsionaler Haut zeigte sich im Vergleich zu gesunder Haut sowohl bei Gruber et al. als auch bei Yuki et al. keine quantitative Veränderung. Kürzlich generierte Daten beschreiben jedoch eine Herunterregulation im SG und eine Hochregulation im SSP (Daten der AG Brandner, Bergmann *et al.*, in Vorbereitung). Bei manchen Patienten zeigte sich eine verbreiterte Expression von Cldn-4 in läsionaler Haut (Gruber *et al.*, 2015, Kubo *et al.*, 2014, Yuki *et al.*, 2016). Batista *et al.* fanden hingegen keine Veränderungen von Cldn-4 bei AD-Patienten (Batista *et al.*, 2015).

Im Maus-KO-Modell wurde keine phänotypische Veränderung der Haut festgestellt. Es entwickelten sich allerdings mit Vergrößerungen des Urothels, einer sich ab dem 12. Lebensmonat entwickelnden letalen Hydronephrose sowie einer erhöhten Anfälligkeit für experimentell induzierte Lungenschädigungen den Organismus-beeinträchtigende Defekte in anderen Epithelien bei Cldn-4 Mangel (Fujita *et al.*, 2012, Kage *et al.*, 2014). Veränderungen in der Lokalisation und der Expression von Cldn-4 nach Interaktion anderer Barrierekomponenten mit der TJ-Barriere konnten mit Barriere-modulierenden Prozessen assoziiert werden, so dass Cldn-4 als wichtiges Molekül der epidermalen Barriere betrachtet werden kann (vgl. Kapitel 1.8).

1.8 INTERAKTION ZWISCHEN TIGHT JUNCTIONS UND ANDEREN KOMPONENTEN DER EPIDERMALEN BARRIERE

Alle genannten Bestandteile der Hautbarriere beeinflussen sich gegenseitig und können miteinander interagieren (vgl. Abbildung 1-5, zusammengefasst in Bäsler et al., 2016). Als Beispiel sei hier nur die gesteigerte Sekretion von TNF α , IL-1 α und IL-1 β nach mechanischer Entfernung (Tape stripping) der SC Barriere in der Maus genannt (Wood et al., 1992). Die TJs liegen zentral zwischen allen Barrieren und zeigen eine hohe Flexibilität, die eine schnelle Reaktion auf sich verändernde Begebenheiten ermöglicht. Der Einfluss, den TJs auf die SC-Barriere haben, wurde sowohl an Cldn-1 (vgl. Kapitel 1.6) als auch an den TJ-Proteinen Ocln (in rekonstruierter humaner Haut (RHS, von engl. reconstructed human skin) und Cldn-6 (in muriner Epidermis) nachgewiesen, bei denen Veränderungen ihrer Expression die Protein-Lipid-Zusammensetzung im SC veränderten (Rachow et al., 2013, Turksen und Troy, 2002). Rekonstruierte humane Epidermis (RHE), deren TJ-Barriere durch die Behandlung mit cCPE gestört wurde, zeigte ebenfalls Auffälligkeiten in der Funktionalität und im Aufbau des SC (Yuki et al., 2013). Für die immunologische Barriere wurde gezeigt, dass in NHEKs die Reduktion von ZO-1 zu einem Anstieg von IL-1 β führt und Mäuse mit Cldn-1 KD einen dosisabhängigen Anstieg an Il-1 β zeigen (Bäsler und Brandner, 2017, Tokumasu *et al.*, 2016). Die Funktionalität von TJs hat auch deshalb einen hohen Anteil daran, die Immunantwort der Haut zu regulieren, weil über sie der Kontakt von PRRs zu externen Liganden sowie der Eintritt von Viren limitiert wird (Guttman und Finlay, 2009, Kuo et al., 2013, Rahn et al., 2017). Der



Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der verschiedenen epidermalen Hautbarrieren und ihrer Interaktion mit den Tight Junctions. Die Tight Junctions liegen zentral im *Stratum granulosum* (SG) und können mit den übrigen Elementen der epidermalen Hautbarriere interagieren. SB, *Stratum basale*; SSP, *Stratum spinosum*; SC, *Stratum corneum*. (modifiziert mit Erlaubnis von Bäsler *et al.*, 2016)

Einfluss von TJs auf die anderen Barrierekomponenten ist bisher wenig untersucht worden. Andererseits konnte eine Beeinflussung der TJs durch alle anderen Barrieren nachgewiesen werden.

Das **Mikrobiom** kann sowohl positive als auch negative Effekte für die TJ-Barriere haben. So führte die Infektion mit *S. aureus* zu einer zweiphasigen Reaktion der TJs in RHE. Zunächst wurde durch sie die TJ-Barriere gestärkt, bevor sie die Internalisierung von Cldn-1 und Cldn-4 auslöste mit der ein Verlust der Barrierefunktion einhergeht (Bäsler *et al.*, 2017). An immortalisierten HaCaT (von engl. *Human adult low Calcium high Temperature*) -Zellen kam es hingegen nicht zu einer vorgelagerten Barrierestärkung nach Zugabe von *S. aureus*. Hier zeigte sich eine deutliche Herabregulation der Intensität von Cldn-1-, Cldn-4-, ZO-1- und Ocln-Immunfluoreszenzsignalen an den Zell-Zell-Grenzen, die von einem fallenden TER begleitet wurden (Ohnemus *et al.*, 2008). Auch Daten aus *in vivo* Hautproben mit *Impetigo contagiosa* zeigen, dass Cldn-1 an infizierten Stellen herabreguliert wird. Bestätigt werden konnten diese Ergebnisse auch in einem porcinen *ex vivo* Modell, bei dem die Applikation von *S. aureus* zu einer Reduktion von Cldn-1 und ZO-1 führte (Ohnemus *et al.*, 2008). Es wurde auch der Effekt einer Besiedelung bzw. Infektion mit *S. epidermidis* analysiert. Hier zeigten sich ein kurzzeitiger Anstieg des TER und eine teilweise erhöhte Expression von TJ-Proteinen in

HaCaT-Zellen und im porcinen Modell (Ohnemus *et al.*, 2008). Für Cldn-1, Cldn-4, ZO-1 und Ocln konnte dieser Barriere-stärkende Effekt auch in NHEKs gezeigt werden, die mit probiotischen Bakterienlysaten behandelt wurden (Sultana *et al.*, 2013).

Auch durch Veränderungen der Integrität des **SC**, kommt es zu einer Beeinflussung der TJs. Allerdings scheint die Art der Störung des SC entscheidend zu sein für die darauffolgenden TJ-Reaktionen. *Tape stripping* an Mäusen, also eine mechanische Störung des SC, initialisiert zunächst eine Reduktion von Cldn-1 und Cldn-4 auf Proteinebene einhergehend mit einer verminderten Lanthanbarriere, während nach einer Stunde eine erhöhte Expression von TJ-Proteinen gezeigt werden konnte (Baek *et al.*, 2013, Kirschner *et al.*, 2011). Veränderungen von SC-Struktur und –Funktion durch fehlendes Flg hingegen veränderte weder die TJ-Zusammensetzung noch deren Funktionalität im murinen System (Yokouchi *et al.*, 2015). In RHE mit Flg-defizienten humanen Keratinozyten zeigte sich ebenfalls keine Funktionsveränderung der Barriere bei leicht veränderter Expression von Cldn-4 und Ocln (Niehues *et al.*, 2017).

Für die **immunologische Barriere** gibt es viele Studien, die einen Einfluss auf die TJs zeigen. Zunächst einmal führte die Gabe von IL-1 β in einer humanen *in vivo* Studie zu einer Herabregulation von Cldn-1 an den Zell-Zell-Grenzen (Watson *et al.*, 2007). *Ex vivo* zeigte sich in humaner Haut eine verbreiterte Lokalisation von Ocln und ZO-1 sowie eine erhöhte Proteinmenge von ZO-1 (Kirschner *et al.*, 2009). Die Applikation von TNF α oder IL-1 β führte zu dosis- und zeitabhängigen Veränderungen vom TER. IL-1 β beeinflusste auch die Lokalisation und Expression von Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 in NHEKs (Kirschner *et al.*, 2009). Auch weitere pro-inflammatorische Cytokine verändern das Level von TJ Proteinen. In NHEKs, die mit IL-4 und/oder -13 behandelt wurden, stieg das Cldn-1-Level an (De Benedetto *et al.*, 2011), wohingegen ein RHE-Modell mit Cldn-1 Reduktion auf die Applikation von IL-4, -13 und -31 reagierte (Gruber *et al.*, 2015). Eine Erhöhung des Histaminlevels führte in RHS (von engl. *reconstructed human skin*) zu einem Verlust von Cldn-1, Cldn-4, Ocln und ZO-1 und einer damit einhergehenden erhöhten Permeabilität für ein 557 Da großes Tracermolekül (Gschwandtner *et al.*, 2013).

Die Aktivierung von TLRs hat einen TJ-stärkenden Effekt, der sich durch einen erhöhten TER und eine verringerte Tracerpermeabilität zeigt. Für TLR2 konnte dieser Effekt mit der Hochregulation von Cldn-1, Cldn-23, Ocln und ZO-1 sowie mit der Phosphorylierung von Ocln in Zusammenhang gebracht werden (Kuo *et al.*, 2013, Yuki *et al.*, 2011b).

Für einige Elemente der chemischen Barriere konnte ein positiver Einfluss auf die TJs nachgewiesen werden. So sorgten die AMPs Psoriasin, hBD-3 und LL-37 für eine Steigerung

des TER, die mit einer verringerten Permeabilität für ein 4 kDa großes Tracermolekül einherging. Neben einer erhöhten Expression einiger TJ-Proteine (u.a. Ocln, verschiedene Claudine) wurde bei der Behandlung zusätzlich eine Veränderung der Lokalisation von Cldn-1, -3, -4, -14 und -23 (mit hBD-3) bzw. von Cldn-1, -3, -4, -7 und Ocln (mit LL-37) zu den Zell-Zell-Grenzen beschrieben, was für eine erhöhte Barrierefunktion spricht (Akiyama *et al.*, 2014, Hattori *et al.*, 2014, Kiatsurayanon *et al.*, 2014).

1.9 EPIDERMALE TESTSYSTEME

Aufgrund der hohen Komplexität der humanen Haut ist es essentiell, alle Einzelkomponenten zu analysieren und ihren Beitrag zum Gesamtkonzept "Hautbarriere" zu verstehen. Problematisch wird dies bei in vivo und ex vivo Studien, die hohen ethischen Anforderungen unterliegen und für die nur wenige Probanden und damit Probenmaterial zur Verfügung stehen. Außerdem lässt sich im Kontext nicht zwischen den Reaktionen der einzelnen Barrierekomponenten unterscheiden, sondern nur die kollektiv ausgelöste Antwort des Organismus betrachten. Die Möglichkeit, auf den Modellorganismus Maus auszuweichen, bietet sich für einen solchen gesamtheitlichen Ansatz zwar an, bietet er doch zusätzlich zur Analyse der Reaktion auf Einzelprovokationen oder -injektionen auch die Möglichkeit der gezielten genetischen Manipulation und anschließenden Betrachtung von phänotypischen Veränderungen aller Organe. Für die Haut gilt es aber zu beachten, dass die murine Epidermis in ihrer Struktur erheblich von der humanen Epidermis abweicht. Zum einen ist die murine Epidermis (mit Ausnahme der speziell gezüchteten haarlosen Rassen) dicht gepackt mit Haaren, während der Großteil der humanen Epidermis interfollikular ist. Zum anderen weist sie keine Fortsätze in die Dermis (sogenannte Reteleisten) auf (Gudjonsson et al., 2007). Darüber hinaus ist die Regenerationszeit der Epidermis bei Mäusen deutlich geringer, die murine Epidermis enthält nur 2-3 Keratinozytenschichten und hat nur 1/4 der Stärke der menschlichen Epidermis (Berking et al., 2002, Gudjonsson et al., 2007). Auch die angrenzende Dermis unterscheidet sich zwischen den Spezies. Die menschliche Dermis ist erheblich dicker als die murine Dermis und enthält weniger Haarfollikel. Außerdem ist letztere von einer ausgeprägten Muskulatur umspannt, die beim Menschen nur noch rudimentär im Nacken- und Gesichtsbereich vorhanden ist, so dass die murine Wundheilung hauptsächlich auf Kontraktion ohne größere Narbenbildung basiert (Khavari, 2006, Wong et al., 2011). Nicht zuletzt sind auch Unterschiede im Immunsystem zu erwähnen (Mestas und Hughes, 2004). Alle genannten Aspekte lassen es wahrscheinlich werden, dass sich die Funktionalität der Hautbarriere bei Maus und Mensch unterscheidet und andere Interaktionen eine Rolle spielen. Für die kosmetische Industrie wurde der Einsatz von tierischen Testsystemen in der Europäischen Union im Jahr 2013 außerdem verboten, so dass die Entwicklung alternativer Testsysteme nötig wurde. Einen guten Ansatz, komplexe Systeme zu verstehen, bietet die Analyse der Einzelkomponenten in *in vitro* Modellen. Diese ermöglichen es, Antworten einzelner Zelltypen auf definierte Herausforderungen (z.B. pathologische Veränderungen oder toxikologische Studien) zu bewerten. Für die Epidermis haben sich mehrere Ansätze etabliert. Zum einen werden Untersuchungen an NHEKs oder immortalisierten Zelllinien (z.B. HaCaT-Zellen) in Einzelzellschichten (engl. *Monolayer*) durchgeführt. Außerdem ergibt sich die Möglichkeit, Keratinozyten von Patienten zu kultivieren, die geno- und/oder phänotypische Varianten aufweisen, um Rückschlüsse auf die Entstehung und Ursache einer Krankheit ziehen sowie mögliche Behandlungsansätze ausmachen zu können.

Durch Erhöhung der Calciumkonzentration oder nach Erreichen von Konfluenz beginnen Keratinozyten zu differenzieren (Green, 1977, Hennings et al., 1980). Als überflutete Kulturen bilden diese Keratinozyten kein funktionales SC aus und ähneln eher epithelialen Zellen in Schleimhäuten (Eckhart et al., 2000, Madison et al., 1989). Nichtsdestotrotz bieten sie die Möglichkeit, gezielt nur Reaktionen von TJs in Epithelien und grundlegende molekulare Mechanismen zu betrachten. Für die Entstehung eines in vitro-Modells mit funktionalem SC müssen die Keratinozyten an der apikalen Seite luftexponiert sein, d.h. sich an der sogenannten Luft-Medium-Grenze (engl. Air-Liquid-Interface (ALI)) befinden. Bei dieser 3D-Kultivierung gibt es zwei Ansätze, rekonstuierte humane Epidermis (RHE) und rekonstruierte humane Haut (RHS), die sich über die Jahre etabliert haben und die beide die *in vivo* Epidermis im Menschen bezogen auf Differenzierung, Barrierefunktion und Histologie sehr ähnlich nachbilden (Niehues et al., 2018, Poumay et al., 2004, Prunieras et al., 1983). Die RHE besteht ausschließlich aus Keratinozyten, während RHS aus einer Dermis-simulierenden Matrix (z.B. aus Kollagen und Fibroblasten) besteht, auf welche Keratinozyten gegeben werden. RHE ermöglicht die Analyse Keratinozyten-spezifischer Zellantworten in der Epidermis und bildet damit das ideale Testsystem für diese Arbeit.

1.10 KNOCKDOWN VS. TARGETING

Für die Bewertung der Rolle von einzelnen Proteinen für die Barrierefunktion lässt sich mithilfe von gentechnischen Manipulationen (z.B. *Knockdown*) die Expression oder durch gezielte Bindung (*Targeting*) die Funktion einzelner Moleküle ändern. Die Manipulation der Genexpression einzelner Proteine kann in Keratinozyten einfach erreicht werden. So konnte z.B. die Expression von FLG durch siRNA- (*small interfering* RNA) bzw. shRNA- (*small hairpin RNA*) vermittleter RNA-Interferenz in primären Keratinozyten und den daraus gebildeten 3D-Modellen gesenkt werden, um den Einfluss von Flg auf die Barrierefunktion zu

analysieren (Mildner *et al.*, 2010, Pendaries *et al.*, 2014). Kirschner *et al.* reduzierten 2013 die Expressionslevel von Cldn-1, Cldn-4, ZO-1 und Ocln in primären überflutet kultivierten Keratinozyten mit siRNA und konnten so deren Einfluss auf die Hautbarriere analysieren (Kirschner *et al.*, 2013).

Eine alternative Vorgehensweise ist die Behandlung von Zellen mit einem Peptidmimetikum oder der c-terminalen Region des Clostridium perfringens Enterotoxins (cCPE). Diese Behandlung führt zu einer Bindung der Claudine und moduliert so ihre Funktion (Sonoda et al., 1999, Winkler et al., 2009, Zwanziger et al., 2012). In MDCK-Zellen führte die Behandlung mit cCPE zu einer Beeinträchtigung der TJ-Barriere (TER, 4 und 10 kDa FITC Dextran) (Sonoda et al., 1999). Andere Studien zeigten in situ eine erhöhte parazelluläre Passage für Makromoleküle bis 20 kDa nach Applikation von cCPE (Kondoh et al., 2005). Für cCPE ist bekannt, dass es eine hohe Bindungsaffinität zu Cldn-3, Cldn-4, Cldn-6 bis -9 hat, während Cldn-1, Cldn-2 und Cldn-14 schwächer gebunden werden (Veshnyakova et al., 2010). Modifikationen der c-terminalen Domäne von CPE, die für die Bindung entscheidend, alleine aber nicht zytotoxisch ist, können dafür genutzt werden, die Bindungseigenschaften gezielt zugunsten bestimmter Claudine zu verändern. So kann der Einfluss einzelner TJ-Proteine auf die parazelluläre Permeabilität getestet werden (Veshnyakova et al., 2012). Takahasi et al. publizierten z.B. mit cCPE-S304A/S305P/S307R/N309H/S313H einen Breitbandbinder, der zusätzlich zu Cldn-4 auch an Cldn-1, -2 und -5 bindet (Takahashi et al., 2012). Die Triplemutante cCPE-S305P/S307R/S313H (SSS) zeigt hohe Bindungsaffinitäten zu Cldn-1 bis -9, während cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A (LSID) primär Cldn-4 bindet und eine geringere Affinität zu den übrigen Claudinen zeigt (Protze et al., 2015, Veshnyakova et al., 2012).

Mithilfe dieser Methoden kann zusätzlich unterschieden werden, ob es einen Unterschied macht, die Zielproteine während der gesamten TJ- und Barrierebildung fernzuhalten oder erst nachträglich zu beeinflussen.

1.11 ZIELE DER ARBEIT

Tight Junctions haben einen erheblichen Anteil an der Funktionalität der Hautbarriere. Seit Jahrzehnten wird dieses Feld der Biologie intensiv beforscht, aber noch immer sind nicht alle molekularen Grundlagen verstanden und die Bedeutung einzelner TJ-Bestandteile ist ungeklärt. Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass der Verlust von TJ-Proteinen z.T. erhebliche phänotypische Auswirkungen hat. So sterben Mäuse mit Cldn-1 KO innerhalb weniger Stunden nach der Geburt aufgrund eines hohen transepidermalen Wasserverlustes (Furuse *et al.*, 2002). Auch in manchen entzündlichen Hauterkrankungen oder -infektionen, die mit einer

Barrierestörung einhergehen, sind das Level und/oder die Lokalisation verschiedener TJ-Proteine verändert. Kürzlich konnte in murinen Keratinozyten außerdem ein dosis-abhängiger Effekt von Cldn-1 für die Barrierefunktion und an Mäusen für die Ausprägungen von AD-Merkmalen gezeigt werden (Tokumasu et al., 2016). Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Bedeutung der TJ-Proteine Cldn-1 und Cldn-4 für die epidermale Barriere in humanen Zellen zu bestimmen. Dafür soll der Einfluss der siRNA-vermittelten Claudin-Reduktion auf die parazelluläre Barriere von innen-nach-außen und von außen-nach-innen sowie auf die allgemeine Barrierefunktion, dargestellt durch den transepithelialen elektrischen Widerstand, untersucht werden. Um die *in vivo* Situation humaner Epidermis dabei bestmöglich abzubilden, wird für die Untersuchungen ein Modell rekonstruierter humaner Epidermis verwendet. Da auch das Stratum corneum in die Barrierebildung involviert ist, soll darüber hinaus ein Einfluss des Claudin-Verlustes auf die Protein- und Lipidzusammensetzung im SC geklärt werden. Für die Analyse der Auswirkungen kurzfristiger Veränderung der TJ-Zusammensetzung wird RHE mit Mutanten der c-terminalen Domäne von Clostridium perfringens Enterotoxin behandelt. Aufgrund der in Mäusen beschriebenen Relevanz von Cldn-1 für die Inflammation bei AD, soll für dieses Molekül auch überprüft werden, ob es im humanen System die Inflammation beeinflusst und in die Reaktion auf bakterielle Besiedlung involviert ist.

Die Untersuchungen sollen das Wissen über die Bedeutung der TJs für die humane Hautbarriere erweitern. Da man zukünftig die Hautbarriere z.B. bei der kutanen Applikation von Medikamenten einfach überwinden möchte, aber auch die schädlichen Wirkungen von applizierten Chemikalien oder Strahlung vermieden werden sollen, ist detailliertes gesichertes Wissen über die Barrierefunktion der Haut essentiell.

1.12 FLUSSDIAGRAMM DER DOKTORARBEIT



Abbildung 1-6: Flussdiagramm der Doktorarbeit.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN

Eine Übersicht über alle verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien während dieser Arbeit ist Tabelle 2-1 zu entnehmen.

Tabelle 2-1:	Übersicht	über verwei	ndete Geräte	und Verbr	auchsmaterialien.
1 1000110 2 11	0.001.010110			unu (eroi	

Gerät / Material	Hersteller
Autoklav "Evo130"	MediTech (Norderstedt, DE)
CO ₂ -Zellinkubatoren:	
- "Heracell® 150i"	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA,
	USA)
- "MCO-17 AC"	Sanyo (Osaka, JP)
Deckgläser (24x60 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-
	Königshofen, DE)
Digitalkamera "EC3"	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
Einbettautomat "Shandon Citadel 2000"	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA,
	USA)
Einbettformen "PELCO [®] Flat	Ted Pella Inc. (Redding, CA, USA)
Embedding Mold #105"	
Einbettkassetten "Universal"	MEDITE GmbH (Burgdorf, DE)
Einmalspritzen	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, DE)
Einmalspritzen mit Luer-Lock-Anschluss	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Einschweißgerät	SEVERIN Elektrogeräte GmbH (Sundern,
	DE)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA,
	USA)
Elektrophorese-Stromversorgungseinheit	Consort (Turnhout, BE)
Entwicklungsgerat "Curix 60"	Agia (Berlin, DE)
Faitenfilter	(Düran DE)
Eänhaltamman	(Duren, DE) Kraataah Diagnastias (Amstardam, NL)
Farbekammer Esinwaaga DD 210 D#	Sertorius (Honnover, DE)
Felliwaage "DF 210 D Eluoroszonzmikroskon Axionlan ?"	Zoiss (Göttingon, DE)
Fluoreszenzmador Infinite M200"	Teeen Group Ltd. (Mönnederf, CH)
Cowobaainbattungsautamat Laica FM	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
TP"	Leica Microsystems Ginori (wetziai, DE)
Gewebeschwämmchen	Fa. R. Langenbrinck (Emmendingen, DE)
Heizblock "Ori-Block DB-3"	Techne (Cambridge, UK)
Heizmagnetrührer "MR 3001"	Heidolph (Schwabach, DE)
Homogenisator "TissueLyser"	Qiagen (Hilden, DE)
Gerät / Material	Hersteller
----------------------------------------------------------	-------------------------------------------
Impfösen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen,
Kryoronrenen (1 ml, 1,8 ml)	I hermo Fisher Scientific (waitham, MA,
V::hlwlatta	USA) MEDITE (mbII (Duradorf, DE)
Kunipiatie Liehtmilweelvene	MEDITE GmbH (Burgdon, DE)
DMI S"	Laion Microgystoms CmbH (Watzler, DE)
- "DMLS"	Leica Microsystems CmbH (Wetzlar, DE)
- "DNIIL" Milwetiteunletten	Leica Microsystems Omori (wetziar, DE)
	Corning (Corning NV USA)
	Corning (Corning, NY, USA)
- 24-Well	Corning (Corning, NY, USA)
- 90-well für Kolorimetrische Assays	Drand Carbin & Ca. KC (Weath sine DE)
- 96- <i>well</i> für Fluoreszenzmessung	Brand GmbH & Co. KG (wertheim, DE)
Mikrotom "RM2165"	Leica Biosystems (Wetzlar, DE)
Mikrowelle "206"	Robert Bosch GmbH (Stuttgart, DE)
Mini-Protean [®] TGX [™] Gele (4-15 %,	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA,
12 %)	USA)
Multipette [®] M4	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Nitrocellulosemembran (0,45 µm)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA,
â	USA)
Objektträger "SuperFrost [®] Plus"	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co
	KG (Sondheim/Rhön, DE)
Pap Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG (Steinfurt,
	DE)
Paraffin-Gießstation "EG 1150H"	Leica Biosystems (Wetzlar, DE)
Paraffinstreckbad "1052"	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
	(Burgwedel, DE)
Parafilm "M"	Bemis Company, Inc. (Neenah, WI, USA)
Pasteurpipetten	
- Glas	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH
	(Hamburg, DE)
- Polyethylen	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
pH-Meter "766 Calimatic"	Knick (Berlin, DE)
Photometer (OD ₆₀₀) "SmartSpec 3000"	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA,
	USA)
Photometer "Sunrise"	Tecan Group Ltd. (Männedorf, CH)
Pipetten	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Pipettenspitzen	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Pipettenspitzen, steril, Low Retention	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettenspitzen, steril, mit Filter	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Pipettierhilfe "pipetus [®] "	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG
	(Eberstadt DE)

Gerät / Material	Hersteller
Präparatkörbchen, klein, 4 Abteilungen,	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
mit Verschluss (für EM)	
Protein Lobind Reaktionsgefäße 2 ml	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
Reagenzienbehälter 20 ml (für EM)	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml,	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
5 ml), steril	
<i>Real-time</i> PCR-System "Light cycler 96"	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
und LightCycler [®] 480 Multiwell Platte,	
weiß	
Reinstwasseranlage "PFXXXM1"	Elga labwater (Lane End, UK)
Rotationsschüttler "Roto-Shake Genie"	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY,
C-1-441 1/0250 h	USA)
Schuttler "KS250 basic"	Therma Eigher Scientific (Welthern MA
serologische Fipetten (2 mi, 5 mi, 10 mi, 25 ml)	LISA)
25 IIII) Skalpallklingan Edalstahl	USA) Feather Safety Pazor Co. I td. (Ocaka, IPN)
Skalpenkingen, Eucistani Snaktronhotomotor NanaDron 2000e ³	Thermo Fisher Scientific (Waltham MA
spektrophotometer "Ivanobrop 2000c	USA)
starila Mullkomprassan	Fink & Walter GmbH (Merchweiler, DF)
Sterilfilter	Thik & Water Onion (Werenweiter, DL)
- mit PVDF-Membran (0.45 µm)	Merck KGaA (Darmstadt_DF)
- für Proteine "FP 30/0.2 CA-S"	GE Healthcare (München DE)
Sterilwerkbank "Hera Safe 12"	Heraeus Instruments (Hanau DE)
Thermocycler "UNO-Thermoblock"	Biometra GmbH (Göttingen DE)
Vakuumpumpe "Vacusin"	INTEGRA Biosciences GmbH (Biebertal
· maampampe ", · acasip	DE)
Voltohmmeter EVOM"	World Precision Instruments (Sarasota, FL,
"	USA)
Vortexer:	,
- "REAXtop"	Heidolph (Schwabach, DE)
- "Vortex-Genie 2"	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY,
	USA)
- "VF2"	IKA Labortechnik (Staufen, DE)
Waage "BL 3100"	Sartorius (Hannover, DE)
Wärmeschrank "T6030"	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
Western Blot Transfer Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA,
	USA)
Zellkultureinsätze "Millicell [®] 0,4µm PCF,	Merck KGaA (Darmstadt, DE)
12 mm"	
Zellkulturschalen (35 mm, 60 mm,	Corning (Corning, NY, USA)
100 mm, 150 mm)	
Zellzähler "Countess"	Invitrogen (Karlsruhe, DE)

Gerät / Material	Hersteller
Zentrifugen:	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
- "Labofuge 400R"	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
- "Biofuge fresco"	Heraeus Instruments (Hanau, DE)
- "Biofuge 13"	Eppendorf AG (Hamburg, DE)
- "Centrifuge5424R"	peqlab, VWR International GmbH
- "PerfectSpin 24 Plus"	(Darmstadt, DE)
Zentrifugenröhrchen, konisch,	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA,
Polypropylen (15 ml, 50 ml)	USA)

2.2 CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

Eine Übersicht über alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien ist Tabelle 2-2 zu entnehmen.

Substanz / Reagenz	Hersteller		
2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol	Serva (Heidelberg, DE)		
2-Dodecenylbernsteinsäureanhydrid	Serva (Heidelberg, DE)		
(DDSA)			
2-Mercaptoethanol = β- Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,		
	DE)		
2-Phospho-L-ascorbinsäuretrinatriumsalz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,		
(Vitamin C)	DE)		
antifect [®] N Liquid	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt, DE)		
Bacitracin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München		
	DE)		
Biotin-dPEG TM (24)-NHS	Iris Biotech GmbH (Marktredwitz, DE)		
Biotin-PEG-NHS-5000 Da	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX,		
	USA)		
bovines Serum Albumin (BSA)	Roche (Mannheim, DE		
Bradford-Lösung	AppliChem GmbH (Darmstadt, DE)		
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,		
	DE)		
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Serva (Heidelberg, DE)		
Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA,		
	USA		
Columbia Agar	Oxoid (Hampshire, UK)		
Coomassie Brilliant Blau G250	Fluka (Taufkirchen, DE)		
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol)	Roche (Mannheim, DE)		
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt, DE)		
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck (Darmstadt, DE)		
$(Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O)$			

Tabelle 2-2: Übersicht über verwendete Chemikalien und Reagenzien.

Substanz / Reagenz	Hersteller		
EDTA(Ethylendiamintetraessigsäure)-	Biochrom AG (Berlin, DE)		
Versen 1 % (w/v)			
Entwickler-Lösung	AGFA (Mortsel, BE)		
Eosin-G-Lösung	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)		
EpiLife [®] Medium	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA,		
	USA		
Epon (Glycidether 100)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)		
Ethanol (absolut)	Merck (Darmstadt, DE)		
Ethanol (99 %, 96 %, 80 %, 70 %)	Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen,		
	DE)		
Eukitt	Kindler GmbH (Freiburg, DE)		
EZ-Link TM Sulfo-NHS-LC-Biotin	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA,		
	USA		
Fetales Kälberserum (FCS, von engl fetal	Invitrogen (Karlsruhe, DE)		
calf serum)			
Fixierer-Lösung	AGFA (Mortsel, BE)		
Fluoromount G [®]	Southern Biotech (Eching, DE)		
Formafix 4 %, gepuffert	Grimm med. Logistik GmbH (Torgelow,		
	DE)		
Glutardialdehyd 25 %	Merck (Darmstadt, DE)		
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)		
Glycidether 100	Serva (Heidelberg, DE)		
	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)		
Hamatoxiin (nach Mayer)	Medite (Burgdori, DE)		
HiPerfect I ransfektionsreagenz	Qiagen (Hilden, DE) Thomas Eishen Seisstifie (Welthem MA		
Human Keralinocyle Growin Supplement	Inermo Fisher Scientific (waitham, MA,		
$(\Pi \mathbf{KGS})$ Igonal [®] CA 630 NP40	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München		
Igepai CA-050 MI 40	DF)		
Isonronanol	DD) Sigma Aldrich Chamia CmhU (München		
	DF)		
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt_DF)		
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, DE)		
Lanthan(III)nitrat-Hexahvdrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München.		
	DE)		
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,		
	DE)		
Lucifer yellow CH Dilithium Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,		
	DE)		
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)		
Methanol	J.T. Baker, Avantor Performance Materials,		
	LLC. (Center Valley, PA, USA)		
Methylnadicanhydrid (MNA)	Serva (Heidelberg, DE)		

Substanz / Reagenz	Hersteller
NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Natrium-deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,
	DE)
Natrium-Kakodylat-Trihydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,
	DE)
Natronlauge (1N NaOH)	Merck (Darmstadt, DE)
Osmiumtetroxid	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Paraplast Plus (=Paraffin)	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, DE)
PBS (ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺ , steril)	Biochrom AG (Berlin, DE)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom AG (Berlin, DE)
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE)
Phenylmethanesulfonyl (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,
	DE)
Phosphorsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, DE)
Phosphatase-Inhibitor	Cell Signaling Technology (Danvers, MA,
	USA)
Ponceau S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,
	DE)
Propylenoxid	Serva (Heidelberg, DE)
Proteinblock	Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA,
	USA)
rhKGF/FGF-7 (von engl. recombinant	R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN,
human Keratinocyte Growth Factor)	USA)
RNaseZAP TM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München,
	DE)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA,
	USA)
Spectra [®] Multicolor Broad Range Protein	BIO-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA,
Lauder stavilas Wassan für die Zelliultur	USA) B. Brown Malaungan A.C. (Malaungan DE)
Sterilium [®] classic pure	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, DE)
TEMED (N N N' N' Totromothylothon	Fluke (Taufkirghen, DE)
1 2 diamin)	Plaka (Taurkhenen, DE)
1,2-ulainin) Trinatriumoitrat Dihydrat (Na-C-H-O-	Merck (Darmstadt_DF)
	Werek (Darmstadt, DL)
2 fi2O) Tris (Trizma Basa)	Sigma Aldrich Chamia GmbH (Münchan
1115 (1112111a Dast)	DE)
Trynsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München
11ypsin	DE)
Trypsin (2.5 %)	Biochrom AG (Berlin DF)
Tween	Merck (Darmstadt DE)

Substanz / Reagenz	Hersteller
Xylol	J.T. Baker, Avantor Performance Materials,
	LLC. (Center Valley, PA, USA)

2.3 SOFTWARE

Die während dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 2-3 aufgelistet:

••				
Takalla 2 2. Ilkaa		Coffeenance Jaman	A d a d 1	Tanatallan
Tabelle 2-5: Uber	'sicht über verwendete	Souware, deren	Anwendung und i	Hersteller.
	Stelle aber ter nellaete	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~		

Name	Anwendung	Hersteller		
Endnote X7/X8	Literaturdatenbank	Clarivate	Analytics	(Philadelphia,
		USA)		
MS Office 365	Textverarbeitung,	Microsoft (Redmond, U	SA)
(Excel, Powerpoint,	Bildbearbeitung,			
Word)	Präsentation,			
	Tabellenkalkulation			
Fiji (ImageJ)	 Densitometrische Aus- wertung von Western Blots 	Wayne Ras	band (Madise	on, USA)
	 Messung der Lipidlamellenlänge Bildbearbeitung 			
SPSS 24	Statistische Auswertung	IBM (Armo	onk, USA)	
LAS EZ 2.1.0	Bildaufnahme am Licht	Leica Micr	osystems G	mbH (Wetzlar,
	mikroskop	DE)		
OpenLab 3.0.9	Bildaufnahme	Improvision (Forchheim, DE)		, DE)
	Fluoreszenzmikroskop			
GIMP v2.10	Bildbearbeitung	https://wwv	v.gimp.org	

2.4 ANTIKÖRPER

Als Negativkontrollen für Immunfluoreszenzfärbungen wurden Antikörper-Isotypen der Firma Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA; Maus, Kaninchen), R&D Systems (Minneapolis, MN, USA; Ziege) oder Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA; Meerschweinchen) verwendet, die entsprechend der Proteinkonzentration des Primärantikörpers verdünnt wurden. Die genutzten sekundären Antikörper waren mit den Fluorochromen Alexa Fluor[®] 488, Alexa Fluor[®] 594 (beide Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) oder DyLight[®] 488 (Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, TX, USA)) gekoppelt und wurden in einer Verdünnung von 1:600 (Alexa Fluor[®]) oder 1:400 (DyLight[®]) in PBS verwendet. Die beim Western Blot eingesetzten sekundären Meerrettichperoxidasegekoppelten Antikörper der Firma Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA) wurden (wenn nicht anders angegeben) 1:5.000 in 5 % Magermilchpulver (in TBST) verdünnt. In Tabelle 2-4 sind alle verwendeten Primärantikörper aufgelistet.

Antikörper	Wirt	Klonalität	Verdünnung	Hersteller
(Klon/Label)				
Claudin 1	Kaninchen	polyklonal	WB 1:1.500	Invitrogen (Darmstadt, DE)
(Jay.8)			IF 1:700	
Claudin 4	Maus	monoklonal	WB 1:200	Invitrogen (Darmstadt, DE)
(3E2C1)				
Filaggrin	Kaninchen	polyklonal	WB 1:200	BioLegend (Dedham, MA,
(Poly19058)				USA)
Filaggrin	Kaninchen	polyklonal	IF 1:2.500	Novus Biological (Littleton,
(NBP1-21310)				CO, USA)
GAPDH	Kaninchen	monoklonal	WB 1:5.000	Cell Signaling Technology
(14C10)				(Danvers, MA, USA)
GAPDH	Maus	monoklonal	WB 1:5.000	Thermo Fisher Scientific
(GA1R)				(Waltham, MA, USA)
Involucrin	Maus	monoklonal	WB 1:2.000	Leica Microsystems GmbH
(SY5)			IF 1:1.250	(Wetzlar, DE)
Keratin 10	Meer-	polyklonal	IF 1:400	Progen (Heidelberg, DE)
(GPK10.1)	schweinchen			
Keratin 6	Maus	monoklonal	IF 1:100	Progen (Heidelberg, DE)
(Ks6.KA12)				
Ki67	Maus	monoklonal	IF 1:30	Agilent Technologies, Inc.
(MIB-1)				(Santa Clara, CA, USA)
Loricrin	Kaninchen	polyklonal	WB 1:7.500	BioLegend (Dedham, MA,
(AF 62)			(Sekundär-	USA)
			antikörper	
			1:10.000)	
			IF 1:5.000	
Occludin	Ziege	polyklonal	IF 1:750	Santa Cruz Biotechnology,
(N-19)				Inc. (Dallas, TX, USA)
Occludin	Maus	monoklonal	WB 1:100	Thermo Fisher Scientific
(OC-3F10)				(Waltham, MA, USA)
α-Tubulin	Maus	monoklonal	WB 1:7.000	Merck KGaA, (Darmstadt,
(DM1A)				DE)

Tabelle 2-4: Übersicht über die verwendeten Antikörper.

2.5 ZELLKULTUR

2.5.1 ANZUCHT VON KERATINOZYTEN

Zur Anzucht von Keratinozyten wurden Präputia über Nacht bei 4 °C in Zellkulturmedium mit 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) gelagert. Im Folgenden wurde das Gewebe zunächst in sterilem PBS gewaschen und anschließend die derbe Seite des Präputiums in 1-2 mm² große Stücke zerteilt. Diese wurden in 0,25 % Trypsin überführt und über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss konnte die Epidermis von der Dermis abgezogen werden, da das Trypsin die Zell-Matrix-Verbindungen zwischen Epidermis und Basalmembran gelöst hatte. Die isolierte Epidermis wurde in 10 % FCS (in PBS) überführt und durch mehrmaliges Aufund Abpipettieren wurde eine mechanische Trennung der Zellen vorgenommen. Nach Zentrifugation (5 min, 800 g) der Zellsuspension wurden der Überstand und das Zellpellet in EpiLife Medium (+1 % Pen/Strep) aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Dichte von etwa 100.000 Zellen/ml ausgesät und für ca. 5-7 Tage unbewegt bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Bei guter Anwuchsrate folgte dann ein Mediumwechsel, um abgestorbene Zellen und Zellreste aus dem Überstand zu entfernen.

Sobald eine Konfluenz von 70 % erreicht war, wurden die Zellen durch eine 5minütige Inkubation bei 37 °C mit Trypsin/EDTA (0,01/0,02 %) abgelöst. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurde die Zellsuspension in 10 % FCS überführt und zentrifugiert (5 min, 800 g). Das Zellpellet konnte dann zur weiteren Kultivierung wieder in das Wachstumsmedium EpiLife mit dem Zusatz HKGS (von engl. *Human Keratinocyte Growth Supplement*) aufgenommen und in Zellkulturschalen ausgesät werden oder zur späteren Verwendung weggefroren werden (siehe 2.5.4).

Die Nutzung des humanen Gewebes erfolgte unter Zustimmung des Ethik-Komitees der Ärztekammer Hamburg (WF-061/12).

2.5.2 Kultivierung und Passagieren von Keratinozyten

Humane Keratinozyten wurden in Wachstumsmedium bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator mit 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Erreichen einer 70 %igen Konfluenz wurde das Medium abgegossen. Es folgten ein Waschschritt der Zellen mit PBS und eine Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,01/0,02 %) für 5 min im Inkubator. Anschließend wurden die abgelösten Zellen in 10 % FCS überführt und zentrifugiert (5 min, 800 g). Das Zellpellet wurde im Folgenden zur weiteren Kultivierung in Wachstumsmedium resuspendiert und in Zellkulturschalen ausgesät.

2.5.3 Zellzählung

Da sowohl für die Kultivierung als auch für Experimente die verwendete Zellzahl entscheidend ist, wurde die Zellsuspension nach der Zentrifugation im für die Aussaat minimal benötigten Volumen an Kulturmedium aufgenommen und gezählt. Die Bestimmung der Zellkonzentration geschah nach Herstellerangaben im Zellzähler "Countess" (Invitrogen, Karlsruhe, DE). Dies

ermöglichte die Berechnung von eventuell erforderlichen Verdünnungen und die Zellen konnten anschließend in der benötigten Dichte ausgesät werden.

2.5.4 KRYOKONSERVIERUNG

Zur langfristigen Lagerung dient die Kryokonservierung von Zellen. Hierfür wurde das Zellpellet nach Zentrifugation (siehe 2.5.1) in Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 10 % DMSO aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Kryoprotect-Röhrchen gegeben und diese in einer Nalgene Einfrierbox für 24 h bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Kryoprotect-Röhrchen zur langfristigen Lagerung in Flüssigstickstofftanks überführt.

2.5.5 REKULTIVIERUNG

Bei der Rekultivierung der Zellen musste zunächst das zytotoxische DMSO aus der Zellsuspension entfernt werden. Dazu wurden die Kryoröhrchen zunächst in einem warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellsuspension zügig in PBS überführt. Nach Zentrifugation (5 min, 800 g) wurden der Überstand verworfen und das Pellet in Wachstumsmedium resuspendiert. Anschließend konnten die Zellen in der gewünschten Konzentration zur Kultivierung in Zellkulturschalen ausgesät werden.

2.5.6 ANLEGEN VON REKONSTRUIERTER HUMANER EPIDERMIS

Für das Anlegen rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) wurden Keratinozyten in Passage 3 nach Erreichen einer 70 %igen Konfluenz verwendet, die in EpiLife Medium kultiviert wurden. Nach Ablösen der Zellen durch Trypsin/EDTA wurden sie in kaltes 10 %iges FCS (in PBS) überführt. Die Zellen wurden dabei auf Eis gelagert. Das durch Zentrifugation (5 min, 800 g) entstandene Zellpellet wurde anschließend in RT-warmes EpiLife Medium mit einer Endkonzentration von 1,5 mM Ca²⁺ aufgenommen. Pro Modell wurden 200.000 Zellen verwendet, die in 500 µl Medium vorlagen. Die Zellsuspension wurde tropfenweise in kreisenden Bewegungen in Millicell[®] *Culture Plate Inserts* gegeben, die in einer 6-*well*-Mikrotiterplatte standen. Basal wurden 2,5 ml Medium zugegeben. Nach einer 30stündigen Inkubation bei 37 °C wurde das Medium über und unter den Filtern abgesaugt und nur basal Medium zugeführt (*Air-Liquid-Interface*, ALI). Dem Medium mit 1,5 mM Ca²⁺ wurden zusätzlich Vitamin C in einer finalen Konzentration von 92 µg/ml sowie 10 ng/ml KGF (für Modelle nach Pierre Fabre, (Bäsler *et al.*, 2017) oder ausschließlich 50 µg/ml Vitamin C (für Modelle nach Poumay, (Poumay *et al.*, 2004) zugefügt. Während der Inkubation an der ALI folgte jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel.

2.6 BAKTERIEN

Alle Bakterienstämme, die während dieser Arbeit verwendet wurden, wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Holger Rohde (Institut für Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, UKE Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Tabelle 2-5 fasst die verwendeten Bakterienspezies zusammen.

	Tabelle 2-5:	Verwendete	Bakterienstämme.
--	--------------	------------	------------------

Spezies	Stamm	Referenz
Staphylococcus aureus	SH1000	(Horsburgh et al., 2002)
Staphylococcus carnosus	TM300	(Rosenstein et al., 2009)

2.6.1 Kultivierung

Die Bakterien wurden aus einem Kryostock auf Columbia-Agarplatten transferiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie für 6 Wochen bei 4 °C gelagert, um bei Bedarf frische Bakterienkulturen anzulegen. Zu diesem Zweck wurden mit Impfösen Bakterien von der Stammplatte auf frische Agarplatten übertragen und über Nacht inkubiert (37 °C).

2.6.2 INOKULATION VON REKONSTRUIERTER HUMANER EPIDERMIS

Für die Infektion von RHE wurden Bakteriensuspensionen hergestellt. Hierfür wurden 5 ml 0,9 % NaCl-Lösung mit Staphylococci inokuliert bis ein OD₆₀₀ von 1,0 (entspricht etwa 10^9 Bakterien/ml) erreicht war. Für die weitere Verwendung wurde diese Suspension schrittweise 1:10 bis zu einer finalen Konzentration von 10^7 Bakterien/ml verdünnt. Anschließend wurden die RHE-Modelle apikal mit 5 µl NaCl-Lösung oder Bakteriensuspension (entspricht 5·10⁴ Bakterien/cm²) behandelt. Nach Auftragen der Lösung wurde diese mit schmalen Glasspateln (hergestellt aus Pasteurpipetten) vorsichtig verteilt, ohne die Ränder oder die Modelloberfläche zu berühren. Sodann folgte eine 48stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.7 MOLEKULARBIOLOGISCHE VERFAHREN

2.7.1 RNA-INTERFERENZ

Mithilfe von RNA-Interferenz kann die Funktion einzelner Gene und ihrer kodierten Proteine gestoppt und auf diese Weise untersucht werden. Bei diesem Gen-*Knockdown* (KD) wird durch *small interfering* RNA (siRNA, dt. etwa kleine eingreifende RNA), die komplementär an mRNA-Moleküle bindet, die Translation zum Protein vorübergehend verhindert. Für den KD wurde zunächst eine Transfektionslösung angesetzt. Dafür wurden die spezifischen siRNAs und die Transfektionsreagenz HiPerfect in Wachstumsmedium verdünnt, im Verhältnis 1:1

gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden kultivierte Keratinozyten in Suspension genommen und dann mit dem Transfektionsmix gemischt. Anschließend konnten sie für den Versuch ausgesät werden. Die finale Maximalkonzentration der siRNA in der Zellsuspension wurde auf Basis von Vorversuchen auf 80 nM (entspricht einer 1:250 Verdünnung der Stock-Lösung) festgesetzt. Um die dosis-abhängige Wirkung analysieren zu können, wurde als weitere Konzentration 54 nM (entspricht 67,5 % der Maximalkonzentration) gewählt. Als Kontrollen wurden unbehandelte Zellen bzw. mit *AllStars Negative Control* siRNA (Qiagen, Hilden, DE) behandelte Zellen mitgeführt. Für das Zielgen wurden jeweils zwei verschiedene siRNAs verwendet. Tabelle 2-6 listet alle verwendeten siRNAs auf.

Zielgen	siRNA	Zielsequenz	Hersteller
Claudin 1	Hs_CLDN1_5	CTGACGCTGCTAGGATAGTTA	Qiagen (Hilden,
	Hs_CLDN1_8	ATGGACATTGAGATACTATCA	DE)
Claudin 4	Hs_CLDN4_7	CAGAGTGGATGGACGGGTTTA	
	Hs_CLDN4_4	AAGAGCTATTCATCACTGTAA	
-	AllStars Negative	Control siRNA	

2.7.2 RNA-Isolation

Zur Isolation der RNA aus RHE wurde die ausgeschnittene Insert-Membran zunächst in einem 2 ml-Reaktionsgefäß in 300 μ l RLT-Puffer mit 1 % β -Mercaptoethanol (β -ME) aufgenommen und entweder bei -80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet. Dafür wurde sie nach Zugabe einer sterilen Mahlkugel im Homogenisator (Tissue Lyser, Qiagen, Hilden, DE) 3 min mit einer Frequenz von 30 Hz homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat auf eine QIAshredder-Säule gegeben und nach Herstellerangaben behandelt. Die Gesamt-RNA wurde im Anschluss mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, DE) nach Herstellerangaben aus den homogenisierten Proben isoliert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch im NanoDrop (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)) bei 260 nm bestimmt. Über das Verhältnis A260/A280 wurde die Reinheit der RNA begutachtet. Ein Wert von 2 zeugt von ausreichend reiner RNA, während ein Wert <2 mögliche Kontaminationen anzeigt. Lag das Verhältnis A260/230 deutlich unter 2 wurde die Probe aufgereinigt. Dazu wurde sie mit 350 µl RLT (+1 % β -ME) und 250 µl EtOH abs. vermischt und auf eine *RNeasy Mini spin* Säule gegeben. Nach 5minütiger Inkubation und anschließender Zentrifugation (13.000 U/min) wurde der Durchfluss erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 500 µl RPE (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden, DE) gewaschen. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13.000 U/min wurde die Säule trocken zentrifugiert (2 min;

13.000 U/min) und bei offenem Deckel 10 min bei RT inkubiert. Die Elution erfolgte im Anschluss durch Zugabe von RNase-freiem Wasser, einminütiger Inkubation bei RT und folgender Zentrifugation (1 min; 13.000 U/min). Ein Teil des RNA-haltigen Durchflusses wurde abschließend nochmals auf die Säule gegeben und ebenfalls zentrifugiert (1 min; 13.000 U/min).

2.7.3 cDNA-Synthese

Für die quantitative Expressionsanalyse muss die *messenger* RNA (mRNA) zunächst mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase per Polymerasekettenreaktion (PCR, von engl. *polymerase chain reaction*) in einzelsträngige cDNA (*complementary* DNA) umgeschrieben werden. Während dieser Arbeit wurde das Kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR* (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) für die Erststrangsynthese der cDNA verwendet.

Ablauf der cDNA-Synthese

1. Ansatz zusammengeben:

x μl RNA (0,5 - 2 μg)

+ 4 μl Reaktionsmix + 2 μl Enzym-Mix als Mastermix ansetzen

ad 20 $\mu l \; dd H_2 O$

2. kurz mischen und anzentrifugieren

3. im PCR Cycler:

Dauer	Temperatur
10 min	25 °C
15 min	50 °C
5 min	85 °C
∞	4 °C

4. Lagerung der cDNA bei -80 °C

2.7.4 QUANTITATIVE REAL-TIME-POLYMERASEKETTENREAKTION

Mit der quantitativen *real-time*-PCR (qPCR) lässt sich eine quantitative Expressionsanalyse von Genen erstellen. Als Matrize (engl. *"template"*) dient einzelsträngige cDNA. Für die Quantifizierung werden Fluoreszenzmessungen während bzw. am Ende der einzelnen PCR-Zyklen durchgeführt. Während dieser Arbeit wurde mit *taqman*-Sonden gearbeitet, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorochrom (FAM) und am 3'-Ende mit einem nicht-fluoreszierenden *Quencher* (MGB), der die emittierte Fluoreszenz des Reporters löscht, solange

sie sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, markiert sind. Während der Synthese des Gegenstranges wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase das Fluorochrom am 5'-Ende der Sonde, die sich an das *template* angelagert hat, gelöst. Dadurch entfernen sich Reporter und *Quencher* voneinander und die messbare Fluoreszenz nimmt zu. Die während der exponentiellen Phase der PCR detektierte Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an frei gewordenem Fluorochrom und damit zur Menge an synthetisierter DNA. Der Beginn der exponentiellen Phase wird über den PCR-Zyklus bestimmt, bei dem die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz zum ersten Mal signifikant übersteigt (C_T –Wert; abgekürzt von engl. *threshold cycle*). So kann dann auch die Ausgangsmenge der amplifizierten Sequenz bestimmt werden: Je höher der C_T -Wert, desto geringer die *template*-Menge.

Zielgen	taqman-Sonde	Hersteller
Claudin 1	Hs00221623_m1	Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA)
Claudin 3	Hs00265816_s1	
Claudin 4	Hs00533616_s1	
Claudin 7	Hs00600772_m1	
Filaggrin	Hs00856927_g1	
GAPDH	Hs03929097_g1	
Interleukin-1β	Hs01555410_m1	
Involucrin	Hs00846307_s1	
JAM-A	Hs00170991_m1	
Loricrin	Hs01894962_s1	
Occludin	Hs00170162_m1	
Repetin	Hs03405633_m1	
ZO-1	Hs01551861_m1	

 Tabelle 2-7: Verwendete qPCR-Primer.

Während dieser Arbeit wurden je 4,5 µl einer 1:25 Verdünnung der generierten cDNA als *template* benutzt und mit Primer und Polymerase nach Herstellerangaben versetzt. Die qPCR wurde im *Real-time* PCR-System "Light cycler 96" (Roche Diagnostics, Mannheim) mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Dauer	Temperatur
Vorinkubation	120 sek	50 °C
	600 sek	95 °C
Amplifikation	10 sek	95 °C
	30 sek	60 °C
Kühlung	30 sek	37°C

Alle realtime-PCR Analysen wurden in Triplikaten gemessen.

Datenanalyse

Die von der Software LightCycler 96 1.1 ausgegebenen C_T -Werte wurden gemittelt und auf ein stabil exprimiertes Haushaltsgen (GAPDH) normiert, um mögliche Unterschiede in der vorangegangenen cDNA-Synthese auszugleichen. Aus der Differenz von C_T -Wert des Zielgens und C_T -Wert des Haushaltsgens ergab sich das ΔC_T . Im nächsten Schritt wurde das $\Delta \Delta C_T$ gebildet, indem die Differenz zu einer normalisierten Referenzprobe für jede Probe berechnet wurde. Die relative Genexpressionsrate G, die den Unterschied der Expressionslevel aufzeigt, berechnete sich dann als

$$G = 2^{-\Delta \Delta} C_{T}$$

Für die Normierung der Claudin-1 mRNA-Level wurde das niedrigste ΔC_T als 100 % Expression definiert und zur Berechnung der $\Delta \Delta C_T$ aller weiteren Claudin-1 Expressionslevel als Referenz herangezogen.

2.8 **PROTEINBIOCHEMISCHE VERFAHREN**

2.8.1 **PROTEINISOLATION**

Für die Isolierung von Proteinen aus epidermalen 3D-Modellen wurde die Insert-Membran mit dem RHE-Modell in ein 2 ml- Reaktionsgefäß mit RIPA-Puffer, 1 % Protease-Inhibitor-Mix (PIM) sowie 1 % Phosphataseinhibitor gegeben, eine sterile Mahlkugel zugegeben und im *Tissue Lyser* 3 min mit 30 Hz homogenisiert. Im Folgenden wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 4 °C, 13000 U/min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Lagerung wurde der proteinhaltige Überstand bei -80 °C eingefroren.

RIPA-Puffer (pH 8,0)

Trizma Base	50 mM
NaCl	150 mM
Igepal	1 %
Na-deoxycholate	0,5 %
EDTA	5 mM
SDS	0,1 %

Protease-Inhibitor-Mischung (100x)

Leupeptin	1 mg/ml
Pepstatin A	0,1 mg/ml
Bacitracin	10 mg/ml
PMSF	10 mM

2.8.2 PROTEINBESTIMMUNG

Für die Gesamtproteinbestimmung wurde der Bradford-Assay durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffmoleküls Coomassie-Brilliant-Blau G-250 von 465 nm auf 595 nm, wenn es mit Proteinen Komplexe bildet (Bradford, 1976). Von der zu testenden Probe wurde 1 μ l mit 19 μ l *A. dest.* in einer 96-*well*-Platte gemischt und anschließend mit 180 μ l Bradford-Reagenz versetzt. Eine Bovine Serum Albumin (BSA)-Standardreihe (19 μ l Standard + 1 μ l RIPA-Puffer) wurde für die Auswertung der Messwerte mittels Eichgeraden mitgeführt und ein Leerwert (19 μ l *A. dest.* + 1 μ l RIPA-Puffer) gemessen. Die Messung der Absorption bei 570 nm erfolgte am Tecan Magellan (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH).

2.8.3 GELELEKTROPHORESE NACH LAEMMLI

Zur Analyse von Proteinproben wurden die enthaltenen Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Proteinauftrennung basiert hierbei zum einen auf der Porengröße des Acrylamidgels und zum anderen auf einem diskontinuierlichen Puffersystem, das eine hohe Trennschärfe erreicht (Laemmli, 1970). Durch Erhitzen und Inkubation der Proben mit β-Mercaptoethanol und SDS werden die Proteine zunächst denaturiert. SDS-Moleküle lagern sich proportional zur Proteinmasse an. So wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und diese können ihrer Molekularmasse entsprechend in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Bei einer angelegten elektrischen Spannung von 120 - 150 V, migrieren kleine Moleküle schneller durch das Gel, während größere zurückgehalten werden. Während dieser Arbeit wurde hierfür das Mini-PROTEAN TGX-Gelsystem benutzt, wobei die Acrylamidkonzentration entsprechend der Größe der zu analysierenden Proteine gewählt wurde (12 % oder 4 - 15 %). Zur Analyse der aufgetrennten Proteine wurde der Proteinstandard "SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder" (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA); Abbildung 2-1) mitgeführt.

	kDa	
-	- ~260	
	- ~140	
-	- ~100	
-	- ~50	
	- ~40 _	
	- ~25 _	
_	- ~15	
	- ~10 -	

Abbildung 2-1: Verwendeter Proteinstandard "Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder" für SDS-PAGEs (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Angegeben ist das jeweils entsprechende Molekulargewicht in kDa.

Probenvorbereitung

Zur Linearisierung der Proteine und zur Anlagerung von SDS wurden die Proteinproben mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgekocht. Anschließend wurden sie auf Eis abgekühlt und je 5-10 µg Gesamtprotein in die Geltaschen aufgetragen.

2x SDS-Probenpuffer (pH 6,8)

Tris	60 mM
Glycerin	10 %
β-Mercaptoethanol	10 %
SDS	5 %
Bromphenolblau	0,5 %

5x Elektrophoresepuffer

Glycin	192 mM
Tris	25 mM
SDS	0,1 %

2.8.4 WESTERN BLOT

Mithilfe von Antikörpern lassen sich die durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine detektieren, nachdem sie auf eine Nitrocellulosemembran transferiert ("geblottet") wurden (Towbin *et al.*, 1979). Eine Möglichkeit zum Transfer ist das *tankblotting*-Verfahren. Dabei wurde zunächst das Trenngel vom Sammelgel befreit. Die für das "Blotsandwich" verwendeten Nitrocellulosemembranen und Filterkarton-Papiere wurden in Transfer-Puffer äquilibriert und dann in der Reihenfolge 1. Filterpapier, 2. Gel, 3. Membran, 4. Filterpapier zu einem "Sandwich" zusammengelegt. Nach Ausstreichen von Luftblasen wurde das Blotsandwich in die Blotkammer eingesetzt, durch eine Kühleinheit zusätzlich gekühlt und vollständig mit kaltem Blotpuffer bedeckt. Die Blotkammer wird mit einem Rührfisch bestückt und auf einem Magnetrührer platziert. Der Transfer auf die Membran fand bei 4 °C mit 100 V und 350 mA für 2 h statt.

Beim Semi-Dry-Blot wurden die Einzelelemente ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau in den Blotkammern erfolgte hier von unten nach oben in der Reihenfolge 1. Filterpapier, 2. Membran, 3. Gel, 4. Filterpapier. Auch hier mussten eventuell entstandene Luftblasen und überschüssiger Puffer ausgestrichen werden. Im Trans-Blot Turbo Transfersystem (Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)) wurden die Proteine bei 25 V und 1,0 A innerhalb von 30 min auf die Membran übertragen.

Im Anschluss an den Transfer wurde die Membran in TBST gewaschen und mit Ponceau S die Qualität von Elektrophorese und Proteintransfer überprüft. Nach Entfärbung in Wasser und TBST folgte die Proteindetektion (vgl. 2.8.5).

Transfer-Puffer	
Methanol	20 %
Glycin	192 mM
Tris	25 mM
SDS	0,02 %

2.8.5 PROTEINDETEKTION

Um spezifische Zielproteine mit Antikörpern zu markieren und zu analysieren wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT in 5 % Magermilch in TBST-Puffer inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Die Inkubation mit dem gegen das Zielprotein gerichteten Primärantikörper folgte anschließend ü.N. bei 4 °C oder für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen in TBST wurde dann der jeweilige spezies-spezifische Sekundärantikörper auf die Membran gegeben. Nach 30minütiger Inkubation folgten erneut 3 Waschschritte. Die Detektion der Peroxidase-gekoppelten Antikörper geschah mithilfe der Pierce Chemilumineszenz-Reagenz von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA). Dafür wurden die Luminol- und Peroxid-Lösungen im Verhältnis 1:1 gemischt und für 3 min auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die überschüssige Flüssigkeit von der Membran gestrichen und letztere in eine Röntgenkassette überführt. Durch Auflegen von Fotofilmen auf die Membran und die anschließende Entwicklung im Agfa Curix 60 (Agfa, Mortsel, Belgien) wurden die Lichtemissionen der markierten Proteinbanden sichtbar gemacht und konnten anschließend genauer analysiert werden. Zur Überprüfung der Vergleichbarkeit der aufgetragenen Proteinmengen und zur Quantifizierung wurde zusätzlich ein Referenzprotein (α -Tubulin oder GAPDH) detektiert. Durch die Normierung der Zielproteinmengen auf das Referenzprotein konnte die relative Proteinmenge der einzelnen Proben miteinander verglichen werden.

10x	TBST-Puffer	(nH 7.4))
IUA	I DO I -I uniti	(PII / 97)	,

Tris	100 mM
NaCl	1,5 M
Tween	0,5 %

2.9 HISTOLOGISCHE VERFAHREN

2.9.1 EINBETTEN VON RHE-MODELLEN IN PARAFFIN

Für die Anfertigung histologischer Untersuchungen wurden die Membranen, auf denen die RHE-Modelle gewachsen waren, ausgeschnitten und max. 48 h bei 4 °C in 4 % Formafix fixiert. Dann folgte die Einbettung in Paraffin. Dabei wurden die Membranen zunächst in Einbettkassetten zwischen zwei in Formafix getränkte Gewebeschwämmchen gelegt. Für die Entwässerung und Einbettung in Paraffin wurde dann der Einbettautomat Citadel 2000 genutzt, der folgende Schritte tätigte:

1.) H ₂ O	30 Minuten
2.) Ethanol 70 %	30 Minuten
3.) Ethanol 80 %	20 Minuten
4.) Ethanol 96 %	20 Minuten
5.) Ethanol 96 %	20 Minuten
6.) Ethanol 99 %	20 Minuten
7.) Ethanol 99 %	30 Minuten
8.) Xylol	30 Minuten
9.) Xylol	30 Minuten
10.) Xylol	30 Minuten
11.) Paraffin	30 Minuten
12.) Paraffin	30 Minuten

Anschließend konnten die Membranen den Histosetten entnommen werden und mit einer heißen Pinzette in Gießförmchen aufrechtstehend in Paraffin eingegossen werden.

2.9.2 HERSTELLUNG VON PARAFFINSCHNITTEN

Für histologische Untersuchungen wurden von den eingebetteten Proben am Mikrotom Paraffinschnitte hergestellt. Die vorgekühlten Paraffinblöcke wurden eingespannt und parallel zur Klinge ausgerichtet. Sobald das Präparat vollständig angeschnitten war, wurden Schnitte von 5 μm Dicke zum Aufnehmen auf Objektträger angefertigt. Diese wurden mit einem angefeuchteten Pinsel zunächst in ein Wasserbad mit kaltem Leitungswasser überführt, in dem sie geglättet und falls nötig voneinander getrennt wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit Hilfe eines Objektträgers in ein ca. 40 - 45 °C warmes Wasserbad gegeben. In diesem Streckbad wurden die Schnitte bis zur Glättung inkubiert. Sodann wurden sie auf beschichtete Objektträger "SuperFrost[®] Plus" aufgenommen und für etwa 30 min auf dem Strecktisch (42 – 45 °C) getrocknet, bevor sie über Nacht im Wärmeschrank (ca. 55 °C) fixiert wurden.

2.9.3 HÄMALAUN EOSIN FÄRBUNG

Die Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung ist ein Verfahren zur Anfärbung von Gewebestrukturen. Sie dient vor allem der Übersichtsgewinnung und Betrachtung morphologischer Veränderungen. Dabei färbt Hämalaun den Zellkern und das endoplasmatische Retikulum blau. Von Eosin hingegen werden u.a. Mitochondrien, Kollagen, Keratin und die extrazelluläre Matrix rot gefärbt.

Zunächst wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert und hydratisiert. Dies geschah durch die folgenden Inkubationsschritte:

1.) Xylol	10 Minuten
2.) Xylol	10 Minuten
3.) Xylol	10 Minuten
4.) Ethanol 99 %	1 Minute
5.) Ethanol 99 %	5 Minuten
6.) Ethanol 96 %	kurz schwänken
7.) Ethanol 80 %	kurz schwänken
8.) Ethanol 70 %	kurz schwänken
9.) A. dest.	5 Minuten

Daran schlossen sich die Färbung in Hämatoxilinlösung nach Mayer (6-8 min) und das 10minütige Bläuen unter fließendem Leitungswasser an. Nach einer kurzen Spülung in *A. dest.* folgte die Färbung in Eosin (30-40 sek). Nach einem erneuten kurzen Spülen wurden die Schnitte anschließend in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (Ethanol 70%, Ethanol 80%,

Ethanol 96%, 2x Ethanol 99%) entwässert und abschließend dreimal für 10 min in Xylol inkubiert. Auf die Objektträger wurde anschließend Eukitt[®] gegeben und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, standen sie zur Betrachtung unter dem Lichtmikroskop zur Verfügung.

2.9.4 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN

Immunfluoreszenzfärbungen erlauben die differenzierte Lokalisation einzelner Zielproteine. Zunächst wurden die Gewebeschnitte dafür analog zur HE-Färbung entparaffiniert und hydratisiert (vgl. 2.9.3). Zum Freilegen der Epitope wurden die Schnitte im Anschluss in eine Küvette mit TEC Puffer gegeben und 2x 10 min bei 360 W in der Mikrowelle erhitzt. Nach der Hitzebehandlung wurden die Gefäße mit dem restlichen TEC-Puffer aufgefüllt und die Schnitte etwa 30 min abgekühlt. Nach zweimaligem Spülen in TBST (3 min) wurden die Schnitte mit Trypsin (0,001 % in Tris-HCl) benetzt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Es folgten ein kurzes Spülen in A. dest. und zwei Waschschritte in TBST (3 min), bevor die Schnitte für 30 min mit Dako Blocking Solution (Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA)) bedeckt wurden. Sowohl die verdünnten Primärantikörper (siehe Tabelle 2-4) als auch die Isotypkontrollen wurden 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und anschließend nur der Überstand auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. der Serum-Kontrolle wurde ü.N. bei 4 °C in einer lichtundurchlässigen feuchten Kammer durchgeführt. Im Anschluss an dreimaliges Spülen in TBST wurden am folgenden Tag bei RT für 30 min die Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben. Einem Waschschritt mit PBS (5 min) folgte die Kernfärbung in einem DAPI-Bad (0,001 mg/ml in PBS) für 1 min. Danach wurden die Schnitte je 2x in PBS (5 min) und A. dest. (3 min) gewaschen und sogleich feucht mit Fluoromount-G eingedeckelt.

10x PBS-Puffer (pH 7,4)

NaCl	1,37 M
KCl	27 mM
$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$	65 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM

20x Tris-EDTA-Citrat (TEC)-Puffer (pH 7,8)

Tris	41 mM
EDTA	34 mM
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	23 mM

10x TBST-Puffer (pH 7,6)

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05 %
Tris-HCl	
Tris	0,5 M
HCl	ad pH 7,4
Trypsin-Lösung	
Trypsin	0,001 %
CaCl ₂	1,2 mM
Tric-HCl	10 %

2.10 cCPE-Behandlung

Für die Behandlung mit der c-terminalen Domäne von *Clostridium perfringens* Enterotoxin (cCPE) wurde das Basalmedium der RHE-Modelle entweder an Tag 2 oder an Tag 6 nach Wechsel auf ALI mit 50 μg/ml der cCPE-Varianten versetzt. Nach 48stündiger Inkubation folgten Analysen der Barriere mithilfe der Messung des transepidermalen elektrischen Widerstands und des *Lucifer Yellow*-Assays (vgl. Kap. 2.11.3 und 2.11.5). Die verschiedenen cCPE-Varianten, die während dieser Arbeit verwendet wurden, wurden freundlicherweise von PD Dr. Jörg Piontek (Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin, DE) zur Verfügung gestellt. Es wurden drei verschiedene Claudin-bindende Varianten von cCPE getestet. Wildtypisches cCPE (WT) zeigt hohe Bindungsaffinität zu Cldn-3, -4, -6, -7 und bindet mit geringerer Affinität Cldn-1 (Kimura *et al.*, 2010, Sonoda *et al.*, 1999). Die Mutante cCPE-S305P/S307R/S313H (SSS) bindet Cldn-1 bis -9 und zeigt höhere Affinität zu Cldn-1(Protze *et al.*, 2015), während cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A (LSID) primär Cldn-4 bindet und eine geringe Affinität zu den übrigen Claudinen zeigt (Veshnyakova *et al.*, 2012). Zusätzlich wurde eine nicht-bindende Negativkontrolle zum Vergleich eingesetzt (Y306A/L315A, YALA).

2.11 BARRIERE-ASSAYS

Die Barrierefunktion der Epidermis von innen-nach-außen wurde in den epidermalen 3D-Modellen mit unterschiedlichen Assays getestet. Um die parazelluläre Permeabilität für Moleküle verschiedener Größe zu testen, wurde ein Biotinylierungs-Assay (vgl. 2.11.1) durchgeführt und mithilfe des Lanthan-Assays (vgl. 2.11.2) wurde die Durchlässigkeit für Ionentracer untersucht. Darüber hinaus wurde anhand des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER, vgl. 2.11.3) der Ionenfluss quantifiziert. Mit der Messung der Impedanz (vgl. 2.11.3) konnte der Widerstand der RHE-Modelle gemessen und in die verschiedenen Einzelkomponenten (R^{SC}, R^{para}, R^{api}, R^{bas} und R^{sub}) unterteilt werden, womit eine Unterscheidung der spezifischen Widerstände von SC- und TJ-Barriere möglich wurde. Die Analyse der außen-nach-innen Barriere basierte auf der Messung von apikal appliziertem *Lucifer Yellow* im basalen Mediumkompartiment (vgl. 2.11.5).

2.11.1 BIOTINYLIERUNGS-ASSAY

Für den Biotin-Assay wurden 0,5 mg/ml EZ-LinkTM Sulfo-NHS-LC-Biotin (im Folgenden Biotin-556; MW: 556,67 Da) bzw. 1 mg/ml Biotin-dPEGTM(24)-NHS (Biotin-1500; MW: 1469,72 Da) oder Biotin-PEG-NHS-5000 Da (Biotin-5000; MW: 5000 Da) in PBS (mit 1 mM CaCl₂) gelöst. 200 µl dieser Lösungen wurden unter die Filter der epidermalen Modelle gegeben und diese für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend konnten die durch den Tracer biotinylierten Proteine im Extrazellularraum mittels TexasRed-Streptavidin (Rockland Immunochemicals Inc., Limerick, PA, USA), das mit dem Sekundärantikörper während der Immunfluoreszenzfärbung kombiniert wurde (vgl. 2.9.4), sichtbar gemacht werden. Durch funktionelle TJs wird Biotin gestoppt. Um die Funktionalität der TJs zu quantifizieren, wurden die *Tracerstopps* pro Gesichtsfeld unter dem Mikroskop (40x Vergrößerung, Axiophot II; Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE) gezählt.

2.11.2 LANTHAN-ASSAY

Die Barrierestudie mit Lanthan wurde während der Präparationsschritte für die Kunstharz-Einbettung durchgeführt. Nach der Fixierung der Modelle (2 h, 4 °C) in einer Lösung aus 2 Volumen Glutaraldehyd 4 %, einem Volumen Kakodylat-Puffer und *A. dest.* (ein Volumen) folgte ein Waschschritt in Kakodylat-Puffer (≥ 2 h, 4 °C). Anschließend wurden die Modelle in einer basal applizierten Lanthannitrat-Osmiumtetroxid-Lösung (jeweils 1 %) lichtgeschützt für 3 h bei RT nachfixiert. Das Fixiermittel wurde durch kurzes Spülen in *A. dest.* bei RT ausgewaschen. Für die sich anschließende Entwässerung der Modelle wurde der Gewebeeinbettungsautomat Leica EM TP (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE) genutzt. Die Modelle wurden in Präparatkörbchen überführt und diese automatisiert in den folgenden Lösungen geschwenkt:

1.)	Ethanol 35 %	5 Minuten
2.)	Ethanol 50 %	5 Minuten
3.)	Ethanol 70 %	5 Minuten

4.)	Ethanol 96 %	5 Minuten
5.)	Ethanol 100 %	5 Minuten
6.)	Ethanol 100 % + Propylenoxid (1:1)	5 Minuten
7.)	Propylenoxid	5 Minuten
8.)	Propylenoxid	5 Minuten
9.)	EPON + Propylenoxid (1:1)	120 Minuten

Anschließend wurden die Körbchen dreimal für 8 h in EPON inkubiert und dann in mit EPON (+ 2 % 2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol) gefüllten Einbettformen zentriert platziert. Nach einer 4stündigen Inkubation bei RT wurden die Einbettformen zur Polymerisation der Proben für 3 Tage in einem Wärmeschrank (60 °C) gelagert. Die Eponblöcke standen nach Aushärtung zum Trimmen und Schneiden und zur anschließenden Betrachtung unter dem Elektronenmikroskop zur Verfügung. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Marek Haftek und Mitarbeitern (Universität Lyon1, Lyon, FR) durchgeführt.

Lanthannitrat (4 %)

Lanthan(III)nitrathexahydrat	92 mM
pН	7,6 - 7,8

Kakodylatpuffer

Natriumkakodylattrihydrat	0,4 M
CaCl ₂	1,2 mM

Lanthannitrat-Osmiumtetroxid-Lösung

2% Lanthannitrat in Kakodylatpuffer	1 Volumen
2% Osmium Tetroxid in A. dest.	1 Volumen

EPON A

Glycidether 100	62 ml
DDSA	100 ml

EPON B

Glycidether 100	100 ml
MNA	89 ml

EPON	
EPON A	1 Volumen
EPON B	1 Volumen
EPON-Gemisch zur Einbettung	
EPON A	2 Volumen
EPON B	3 Volumen
2,4,6 Tris(dimethylaminomethyl)phenol	2 %

2.11.3 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands

Für die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TER, von engl. *transepithelial eletrical resistance*) wurden die Filter mit den RHE-Modellen in eine 24-*well*-Platte überführt, in der basal 600 μ l erwärmtes PBS vorgelegt waren. Apikal wurden 400 μ l PBS zugegeben. Die Elektroden des Volt-Ohm-Meters (World Precision Instruments, Sarasota, USA) wurden vor der Messung in 70 % EtOH für etwa 10 min desinfiziert und anschließend in vorgewärmtem PBS äquilibriert. Für die Messung wurden die Elektroden so in die *well*-Platte eingesetzt, dass sich eine Elektrode auf der apikalen und eine auf der basalen Seite der Filtereinsätze befand. Angaben zum Widerstand über das Modell erfolgten nach Abzug eines Leerwertes und bezogen auf die Membranfläche (0,6 cm²) in k $\Omega \cdot cm^2$. Aufgrund der großen Donorvariabilität wurde für Vergleiche verschiedener Versuche der jeweils auf die unbehandelte RHE-Kontrolle normierte TER (rel. TER) herangezogen.

2.11.4 IMPEDANZMESSUNG

Mithilfe der Impedanzspektroskopie können die Ergebnisse der TER-Messung noch genauer unterteilt werden. Dabei wird der Widerstand der Epithelzellschicht (R^{epi}) vom Widerstand der subepithelialen Schichten (R^{sub}) getrennt. In nativen Geweben entspräche letzterem der Widerstand von Bindegewebe und Muskulatur. Im Zellkultursystem wird der zusätzliche Widerstand durch die Filtermembran gebildet. Für die Messung der Impedanz werden verschiedene Wechselstromfrequenzen angelegt und die frequenzabhängige Leitfähigkeit von Membranen für die Berechnung ausgenutzt. Bei niedrigen Frequenzen entspricht der gemessene Wert dem Gesamtwiderstand, weil der Strom über die in Reihe geschalteten Widerstände fließt, wohingegen bei hohen Frequenzen ausschließlich R^{sub} ermittelt wird, da der Strom nun den Weg über die leitenden Membranen und den in Reihe geschalteten R^{sub} nimmt (Fromm *et al.*, 2009). Für die graphische Darstellung der Impedanz nutzt man Nyquist-

Diagramme. Dabei werden die realen Widerstände (Z^{re}), die dem Ohm'schen Widerstand entsprechen, auf der horizontalen Achse aufgetragen und der reaktive "imaginäre" Teil (Z^{im}), der aufgrund der kapazitativen Eigenschaften des Epithels entsteht, auf der vertikalen Achse. Einheit ist dabei jeweils $\Omega \cdot cm^2$. Durch Verbindung der Messpunkte entsteht ein Halbkreis, dessen Schnittpunkt mit der x-Achse bei niedrigen Frequenzen den Gesamtwiderstand (=TER) angibt, wohingegen der Schnittpunkt am hochfrequenten Ende R^{sub} darstellt. R^{epi} ergibt sich aus der Differenz dieser Werte. Bei der hier verwendeten Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie kann ferner zwischen dem parazellulären Widerstand der TJs (R^{para}) und dem transzellulären Widerstand (R^{trans}), der durch die apikale und basale Membran der Zellen entsteht (R^{api} und R^{bas}), unterschieden werden. Für diese Diskriminierung wird selektiv der parazelluläre Weg z.B. durch Zugabe von EGTA, einem Ca²⁺-Chelator, geöffnet. Die Veränderung des epidermalen Widerstands R^{epi} sowie die Änderung der parazellulären Passage von Tracermolekülen ermöglicht anschließend eine Berechnung von R^{para} und R^{trans}. Die für diese Arbeit verwendete Hypothese zum Schaltkreis der RHE enthält innerhalb von R^{epi} außerdem einen separaten Widerstand des Stratum corneums (R^{SC}). R^{para} ist hierbei parallel zu R^{trans} geschaltet. R^{SC} und R^{sub} verlaufen seriell zu diesen Komponenten. Außerdem wurden die kapazitativen Eigenschaften der Zellmembranen im SC und im SG (C^{SC}, C^{api} und C^{bas}) bei der Berechnung berücksichtigt (Abbildung 2-2). Die Impedanzmessungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Dorothee Günzel und Mitarbeitern (Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin, DE) durchgeführt und interpretiert.



Abbildung 2-2: Hypothese zum Schaltkreis in rekonstruierter humaner Epidermis für die Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie und Schema zur lokalen Einordnung innerhalb der Epidermis. Modell zum Schaltkreis, bei dem zwischen parazellulärem Weg (Widerstandselement R^{para}) und transzellulärem Weg (R^{api} und R^{bas} sowie Kapazität C^{api} und C^{bas}) unterschieden wird. Außerdem wird das *Stratum corneum* durch R^{SC} und C^{SC} berücksichtigt. R^{sub} stellt die Filtermembran der Zellkultur als subepithelialen Widerstand dar. api, apikale Membran; bas, basale Membran; rot, Anteil des *Stratum corneums* am epidermalen Widerstand; hellgrün, apikaler Anteil des transzellulären epidermalen Widerstands; dunkelgrün, basaler Anteil des transzellulären epidermalen Widerstands; blau, parazellulärer/TJ-Anteil des epidermalen Widerstands; schwarz, subepithelialer Widerstand. TJ, Tight Junctions. Entstanden mit freundlicher Unterstützung von D. Günzel, modifiziert nach Proksch *et al.*, 2008.

2.11.5 LUCIFER YELLOW-ASSAY

Um die Permeabilität der RHE von außen-nach-innen zu prüfen, wurden 200 µl einer 1 mM *Lucifer Yellow* (LY)-Lösung (in PBS) appliziert. Hierfür wurden die RHE-Modelle in 6-*well*-Platten mit 1,5 ml Medium überführt, der Tracer apikal zugegeben und anschließend für 6 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl aus dem basalen Mediumkompartiment für die Messung in eine Mikrotiterplatte überführt und das übrige Medium bei -20 °C zur langfristigen Lagerung eingefroren. Zusätzlich wurde eine Standardreihe aus 15 Verdünnungen der LY-Lösung mitgeführt. Als Leerwert diente Epilife-Medium. Die Messung in Triplikaten wurde am Fluoreszenzreader "Infinite M200" (Tecan Group Ltd., Männedorf, CH) durchgeführt, wobei folgende Einstellungen gewählt wurden: Anregungswellenlänge 425 nm, Emissionswellenlänge 550 nm, 10 Blitze, 50-fache Verstärkung. Die Tracer-Permeabilität errechnete sich als:

 P_{APP} (cm/s) = Flux ($\mu g^* s^{-1} * cm^{-2}$) / Tracerkonzentration ($\mu g/ml$).

2.12 Messung der interzellulären Lipidlamellenlänge im Stratum Corneum

Für die Messung der interzellulären Lipidlamellenlänge wurden die RHE Modelle zunächst über Nacht in einer Lösung aus 2 % Paraformaldehyd, 2,5 % Glutaraldehyd und 0,1 M Kakodylatpuffer bei 4 °C fixiert. Nach einem sich anschließenden einstündigen Waschschritt in Kakodylatpuffer (0,4 M) und der Post-Fixierung mit 1 % OsO₄ (90 min, RT) folgte ein kurzes Spülen in *A. dest.* bevor die Proben in einer aufsteigenden Ethanol-Propylenoxid-Reihe dehydriert wurden. Der Einbettung in EPON folgte die Herstellung von Ultradünnschnitten und deren Betrachtung im Transelektronenmikroskop CM 10 (Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

Pro RHE-Modell wurden in verschiedener Tiefe des *Stratum corneums* mindestens 5 Bereiche zwischen Korneozyten ausgewählt. Innerhalb dieser Bereiche wurden jeweils ein Ausschnitt des interzellulären Bereichs und der interzellulären Lipidlamellen semiautomatisch mithilfe eines Software Plug-Ins für Image J (http://rsbweb.nih.gov) markiert und danach wurde die Lipidlamellenlänge pro Interzellularraum vermessen. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, wurde das Verhältnis von Lipidlamellenlänge zu Interzellularraum auf eine Fläche von 1000 nm² normiert. Mit den normierten Lipidlamellenlängen wurden anschließend die statistischen Analysen ausgeführt (Dähnhardt-Pfeiffer *et al.*, 2012).

Die Messung der interzellulären Lipidlamellenlänge wurde freundlicherweise von S. Dähnhardt-Pfeiffer (Microcopy Services Dähnhardt GmbH, Flintbek, DE) durchgeführt.

2.13 STATISTIK

Alle Daten sind (wenn nicht anders angegeben) als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) notiert. Ausreißer wurden bei einer Datenmenge von mehr als 15 Einzelwerten entsprechend dem Grubbs Test (engl. extreme studentized deviate, ESD) ausgeschlossen (Rosner, 1983). Bei weniger als 15 Einzelwerten wurden Ausreißer anhand des Interquartilsabstands (engl. interquartile range, IQR) mit dem Faktor 2,2 bestimmt (Hoaglin und Iglewicz, 1987). Statistische Analysen wurden entweder mit der Analyse der Varianz (engl. analysis of variance, ANOVA) oder mit einem linearen gemischten Modell (für RHE mit bakterieller Infektion) und entsprechenden Post-Hoc Tests zur Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt (wenn nicht anders angegeben). Bei Varianzheterogenität wurde der Post-Hoc-Test nach Games-Howell angewendet, während bei Varianzhomogenität die Post-Hoc-Tests Gabriel's (bei gleicher Gruppengröße) oder Hochberg's GT2 (bei unterschiedlichen Gruppengrößen) zum Einsatz kamen. P<0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet. Korrelationen wurden anhand der Korrelationskoeffizienten nach Pearson (linear, R_p) oder mit der Spearman'schen Rangkorrelation (nicht linear, R_s) bestimmt. Die Effektgröße wurde hierbei entsprechend der Klassifizierung von Cohen interpretiert (Cohen, 1988). Alle statistischen Berechnungen wurden mit SPSS 24 (IBM, Armonk, USA) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

Veröffentlichte Studien zeigen für murine Systeme und humane überflutet kultivierte Zellen, dass die Tight Junction (TJ)-Proteine Claudin-1 und Claudin-4 im *Stratum granulosum* (SG) eine entscheidende Rolle für die Funktionalität der Hautbarriere spielen (u.a. Furuse *et al.*, 2002, Sugawara *et al.*, 2013, Kirschner *et al.*, 2013). Für Claudin-1 (Cldn-1) konnte zudem ein dosis-abhängiger Effekt auf die Barrierefunktion in murinen kultivierten Keratinozyten gezeigt werden (Tokumasu *et al.*, 2016). Entsprechende Studien an humaner Epidermis fehlen bislang. Diese Arbeit soll daher den Anteil der Moleküle Cldn-1 und Cldn-4 an der Hautbarriere in rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) beleuchten und dabei zwischen dem Effekt bei langfristiger Reduktion der Proteine durch siRNA-Behandlung und dem kurzfristigen Effekt durch Entfernung nach Behandlung mit verschiedenen Mutanten des c-terminalen Endes von *Clostridium perfringens* Enterotoxin (cCPE) unterscheiden. Aufgrund von Daten zur Veränderung von Cldn-1 bei Atopischer Dermatitis (AD) (Batista *et al.*, 2015, Bergmann *et al.*, in Vorbereitung, De Benedetto *et al.*, 2011, Gruber *et al.*, 2015) und den dort häufig auftretenden bakteriellen Infektionen soll zudem überprüft werden, ob und wie der Verlust von Cldn-1 die inflammatorische Reaktion von humanen Keratinozyten beeinflusst.

3.1 CHARAKTERISIERUNG REKONSTRUIERTER HUMANER EPIDERMIS NACH POUMAY UND PIERRE FABRE

Um die *in vivo*-Situation bei den sich anschließenden Analysen möglichst getreu dem menschlichen Körper nachstellen zu können, wurden zunächst zwei RHE-Modelle in Bezug auf Morphologie, Differenzierung und Barrierefunktion beurteilt. Sowohl die Zeitpunkte der Entstehung von TJs und damit einer Barriere im SG als auch die *Stratum corneum* (SC)-Reifung wurden dabei in RHE nach Poumay (P) (Poumay *et al.*, 2004) und nach Pierre Fabre (PF) (Bäsler *et al.*, 2017) verglichen. Außerdem wurde die Proliferation quantifiziert.

3.1.1 REKONSTRUIERTE HUMANE EPIDERMIS NACH POUMAY

Zur morphologischen Betrachtung der RHE im zeitlichen Verlauf wurden Hämalaun-Eosin (HE)-Färbungen angefertigt. Es kam immer wieder zu interindividuellen Unterschieden zwischen gleichaltrigen Modellen, so dass jeweils mindestens Doppelansätze für alle sich anschließenden Analysen ausgewertet wurden. An T1 sah man in RHE nach Poumay zunächst nur 2-3 sich überlagernde Zellschichten mit einem kaum ausgeprägten SC. Danach nahm die Anzahl an lebenden und SC-Schichten zu, so dass an T4 bereits ~4 lebende Schichten und ein davon differenzierbares SC vorhanden waren. Im *Stratum basale* (SB) wurden ab diesem Zeitpunkt palisadenartige Strukturen sichtbar, so dass die Schichtung mit der menschlichen

Epidermisstruktur vergleichbar wurde. Ab etwa dem fünften Tag war sichtbar, dass sich die Anzahl lebender Zellschichten kaum weiterentwickelte und bei etwa 6 Zellschichten stagnierte, während das SC konstant an Schichten zunahm. Besonders zu späteren Zeitpunkten manifestierte sich diese Beobachtung, so dass das SC viel ausgeprägter war als der Bereich der lebenden Zellschichten. Die HE-Bilder in Abbildung 3-1A (rechts) zeigen exemplarisch die Entwicklung der RHE nach Poumay am vierten, achten und vierzehnten Tag (T4, T8 und T14) nach Wechsel auf *Air-Liquid-Interface* (ALI) Kultivierung.

Zur der fortschreitenden Keratinozyten-Differenzierung Analyse wurden die Differenzierungsmarker Keratin 10 (CK10), Involucrin (Inv), Loricrin (Lor) sowie Filaggrin (Flg) angefärbt. So konnte der Differenzierungsprozess von Keratinozyten beginnend bei der ganz frühen Differenzierung (CK10) über mittlere Zeitpunkte (Inv) bis zur späteren Differenzierung (Lor, Flg) verglichen werden. Zur Interpretation und Begutachtung der RHE-Modelle wurde die Lokalisation der Färbung mit derjenigen in gesunder humaner Haut verglichen (Abbildung 3-1C). CK10 als Marker für die ganz frühe Differenzierung wird in gesunder humaner Haut ab der ersten suprabasalen Schicht exprimiert. In RHE nach P zeigte CK10 von T1 an die erwartete Lokalisation. Zu späten Zeitpunkten (T12 und 14) zeigten sich z.T. auch im SB CK10-positive Bereiche. Die Färbung von Inv war in den ersten Tagen auf die obersten Zellschichten begrenzt. Allerdings ist hierbei zu beachten, dass zu sehr frühen Zeitpunkten die Zellschichten so eng aufeinanderlagen, dass eine optische Unterscheidung von SC, SG und Stratum spinosum (SSP) kaum möglich war. Ab Tag 4 konnte eine differenzierte Färbung unterhalb des dann differenzierbaren SC im SG und oberen SSP wahrgenommen werden wie in gesunder Haut präsent. Die Modelle von Tag 8 und später zeigten nach wie vor die korrekte Lokalisation der Färbung, aber ihre Intensität nahm ab. Lor wurde ab T4 nur im SG nachgewiesen, wo es auch in humaner Haut liegt. Auch vorher war die Lokalisation auf den oberen Bereich begrenzt, aber eine Unterscheidung der verschiedenen Schichten war noch nicht möglich. Bei der Färbung von Flg waren zunächst (T1 und T2) nur einzelne punktförmige Bereiche in den obersten Zellen positiv. Es fanden sich neben der erwarteten Lokalisation im SG (ab etwa T3) bei den Modellen nach P ab T8 diffusere Signale, die auch im SC (T12) und an T14 in allen suprabasalen Schichten Flg-positive Bereiche zeigten. In Abbildung 3-1A sind exemplarische Bilder der Immunfluoreszenzfärbungen von RHE nach P an Tag 4, Tag 8 und Tag 14 nach Wechsel auf ALI zusammengestellt. Neben den Differenzierungsmarkern wurden auch die Basalschicht und die Proliferation analysiert. Die Anzahl an proliferativ aktiven Basalzellen, die nach Färbung von Ki67 mithilfe des Antikörpers MIB-1 quantifiziert werden konnten, lag bei Modellen nach P zwischen mindestens $4,7 \pm 0,6$ Ki67-positiven



Abbildung 3-1: Lokalisation von Differenzierungsmarkern und Hämalaun Eosin (HE)-Färbung in rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) nach Protokollen von Poumay (A) bzw. Pierre Fabre (B) im zeitlichen Verlauf im Vergleich zu gesunder Haut (C). In 4 Spalten sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen (grün) von Keratin 10 (CK10), Involucrin, Loricrin oder Filaggrin und Kernfärbung (Dapi; blau) überlagert mit dem Phasenkontrastbild dargestellt. T4, T8, T14 = 4, 8 und 14 Tage nach Wechsel auf *Air-Liquid-Interface* Kultivierung. Messbalken = 50 μ m. (verändert mit Erlaubnis nach Bäsler *et al.*, 2017)

Zellen/Gesichtsfeld (9,9 \pm 2,8 % Basalzellen) an Tag 5 und maximal 20,1 \pm 1,8 (43,1 \pm 7,7 %) proliferativ-aktiven Basalzellen an Tag 10 (Daten nicht dargestellt). Zum Vergleich: In gesunder humaner Epidermis geht man von 9 – 20 % proliferierenden Basalzellen aus (Heenen *et al.*, 1998). Eine Färbung von Keratin 6 zeigte, dass sich bei den Modellen nach P zu jedem Zeitpunkt in allen Schichten hyperproliferative Bereiche befanden (Ergebnisse nicht abgebildet). Der transepitheliale elektrische Widerstand (TER) als Maß für die Funktionalität der Gesamtbarriere nahm stetig zu, betrug an Tag 4 1,62 \pm 0,67 kOhm·cm² (n=3) und an Tag 8 4,61 \pm 0,12 kOhm·cm² (n=6).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass das epidermale 3D-Modell nach Poumay eine gute epidermale Struktur aufwies. Allerdings entsprach das Verhältnis zwischen lebenden und abgestorbenen Epidermisschichten nicht der *in vivo* Situation im Menschen. Auch die Lokalisation der Differenzierungsmarker und die Proliferation unterschied sich z.T. erheblich von derjenigen in gesunder humaner Haut.

3.1.2 REKONSTRUIERTE HUMANE EPIDEMRIS NACH PIERRE FABRE

Als zweites 3D-Modell rekonstruierter Epidermis diente das Modell nach Pierre Fabre (Bäsler *et al.*, 2017). Die morphologische Analyse (HE, Abbildung 3-1B rechts) ergab auch hier einen Beginn der Differenzierung der Keratinozyten direkt nach dem Wechsel auf ALI und die Bildung einer Epidermis-gleichen Struktur. Lagen zunächst nur wenige Zellschichten mit kaum sichtbarem SC übereinander, waren an T4 schon 5-7 lebende Zellschichten übereinander erkennbar, von denen etwa 3 das SSP und 1-3 das SG bildeten. Das SB zeigte schon hier die typische Palisaden-ähnliche Struktur. Auch das SC hatte sich weiterentwickelt und umfasste etwa 5 Zellschichten. An Tag 8 nach Wechsel auf ALI konnte bei RHE nach PF deutlich zwischen der Morphologie der einzelnen Epidermisschichten unterschieden werden. Auf das SB folgten etwa 3-4 Zellschichten des SSP, bevor das von abflachenden Zellen mit Keratohyalingranula gekennzeichnete SG begann. Die Anzahl der SC-Schichten hatte sich auf etwa 12-14 erhöht. Diese Morphologie war auch 14 Tage nach Wechsel auf ALI noch zu erkennen, einzig das SC hatte an Zellschichten zugenommen.

CK10 zeigte von Beginn an (ab T1) die erwartete Lokalisation in allen suprabasalen Epidermisschichten. Inv konnte ab T3 in den erwarteten Schichten (oberes SSP und SG) nachgewiesen werden. Die Färbung an früheren Tagen war wie oben beschrieben rein optisch aufgrund der engen Zellanordnung nicht sicher einer Epidermisschicht zuzuordnen, beschränkte sich aber auf den obersten Modellbereich. Selbiges gilt für Lor an den ersten Tagen der Entwicklung. Ab T4 war für Lor nur das SG positiv wie in gesunder Haut, wobei sich die Färbung zu späten Zeitpunkten (ab T12) schwach ins SC ausbreitete. Die Färbung von Filaggrin

zeigte in den ersten drei Tagen nach Wechsel auf ALI wieder punktförmige Lokalisationen in den obersten Zellen und manifestierte sich dann im SG, wobei auch hier ab T12 schwache positive Signale im SC zu finden waren. Abbildung 3-1B zeigt repräsentative Ergebnisse der Färbung von Differenzierungsmarkern in je einem RHE-Modell nach PF an T4, T8 und T10. Bei RHE nach PF war mit einem Wert von $35,8 \pm 1,6$ Ki67-positiven Zellen schon an T3 die höchste Proliferationsaktivität (69,4 \pm 9,8 %) zu sehen. An T5 zeigte die Proliferation auch hier ihr Minimum mit 10.3 ± 0.9 Ki67-positiven Zellen pro Gesichtsfeld (16.8 ± 4 %). Bis auf den Zeitpunkt T10 ($17,3 \pm 1,5$ Ki67-positive Zellen/Gesichtsfeld) lag die Proliferationsrate in diesen Modellen über derjenigen der Modelle nach P. Die Modelle nach PF zeigten an T3 und T4 in SG und SSP, an T8 im unteren SSP und an T14 an der Grenze von SG und SC sowie in der ersten suprabasalen Schicht Keratin 6-positive Bereiche. Insgesamt waren die hyperproliferativen Bereiche hier weniger prominent als bei RHE nach P und kamen ausschließlich suprabasal vor. Da sie auf Basis der beschriebenen Ergebnisse der in vivo-Situation in humaner Epidermis ähnlicher sind, wurden die Modelle nach Pierre Fabre für die sich anschließenden Studien verwendet (bzgl. Barrierefunktion siehe Kap. 3.1.3). Spätere Zeitpunkte als T8 wurden für die Analysen verworfen, da die Anzahl an SC-Schichten aufgrund der abwesenden Abschuppung im Zellkulturmodell im Vergleich zu humaner Haut zu hoch wurde. RHE an Tag 4 diente daher als Modell der Barriere in der (späteren) Entwicklung/Regeneration, während RHE an Tag 8 die in vivo Sitation der reifen Hautbarriere nachstellt.

3.1.3 **DEFINITION DER BARRIEREREIFE**

Zur Quantifizierung der Gesamtbarriere diente die Messung des TER. Dieser lag im Mittel an Tag 4 bei $1,49 \pm 0,1$ kOhm·cm² (n=12) und steigerte sich bis Tag 8 auf $3,36 \pm 0,18$ kOhm·cm²



Abbildung 3-2: Lokalisation von Occludin und Biotin-556 Stopps in rekonstruierter humaner Epidermis an Tag 4 (A) und Tag 8 (B). Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von Biotin-556 (rot) und Occludin (Ocln, grün) mit Kernfärbung (Dapi, blau). An funktionellen TJs kommt es zur Kolokalisation von Ocln und Biotin-556 Stopps. Weiße Umrandungen in A und B zeigen Ausschnitte, die in A' bzw. B' vergrößert dargestellt sind. Messbalken = 20 μm. (n=12). Zur Analyse der TJ-Barrierefunktion wurde der Biotin-Assay herangezogen. An Tag 4 hatten sich bereits erste TJs in den Modellen gebildet, die eine Barriere von innen nach außen für Moleküle mit einer Größe bis etwa 556 Da darstellten (Biotin-556 Stopps; Abbildung 3-2). Die punktförmige Färbung von Occludin (Ocln) und die Biotin-556 Stopps zeigten eine Kolokalisation im Bereich des SG. Die durch die Kolokalisation als funktionell identifizierten TJs waren allerdings noch nicht so zahlreich, so dass teilweise auch oberhalb des SG biotinylierte Proteine sichtbar waren. Mit fortschreitender Zeit reifte die TJ- Barriere. Ab Tag 8 nach ALI fanden sich fast ausschließlich vollständige Biotin-556 Stopps im SG der RHE. Für die Begutachtung der außen-nach-innen Barriere wurde die Permeabilität für den Farbstoff *Lucifer Yellow* gemessen. An Tag 4 nach ALI betrug diese $8,14\cdot10^{-8} \pm 5,9\cdot10^{-9}$ cm/s und verringerte sich bis Tag 8 auf $2,24\cdot10^{-9} \pm 2,01\cdot10^{-9}$ cm/s (n=4).

3.2 KNOCKDOWN VON CLAUDIN 1 IN RHE

Der Knockdown (KD) einzelner Proteine in 3D Hautmodellen durch RNAi wird in der Forschung schon lange praktiziert, um den jeweiligen Einfluss auf die Barrierefunktion klären zu können (Mildner et al., 2006, Pendaries et al., 2014, Rachow et al., 2013). Um im während dieser Arbeit verwendeten Modell den Effekt verschiedener Cldn-1 Level analysieren zu können, wurde durch die Transfektion mit 2 verschiedenen siRNAs zum einen versucht, eventuell auftretende unspezifische "off-target" Effekte sichtbar zu machen und zum anderen über die unterschiedliche KD-Effizienz nach Zugabe zwei verschiedener Konzentrationen von siRNA No8 verschiedene Restproteinlevel in den RHEs zu generieren. Die Transfektion mit den beiden auf Basis von Vorversuchen gewählten siRNA-Konzentrationen (54 nM No8 und 80 nM No5 und No8) führte zur signifikanten Reduktion der Genexpression und des Proteinlevels von Cldn-1 in RHE, so dass konzentrationsabhängige Effekte analysiert werden konnten. Nach 4 Tagen Inkubation an der ALI ergab sich auf Proteinebene nach Behandlung mit Cldn-1-spezifischer siRNA eine auf dem Level von p<0,001 signifikante Reduktion im Vergleich zum unbehandelten WT-Modell und zur siRNA-Kontrolle (siRNA Ktrl; Abbildung 3-3). Im Mittel lag das Cldn-1-Proteinlevel nach Behandlung mit 54 nM siRNA No8 (No8₅₄) bei 4.7 ± 0.8 % des Cldn-1-Proteinlevels der WT-Modelle. Die semi-quantitative Auswertung der Western Blots ergab dabei Werte zwischen 0 % und maximal 18,1 %. Die Transfektion mit 80 nM siRNA No8 (No8) reduzierte das Cldn-1-Level auf 0.35 ± 0.1 % (min. 0 %; max. 3.2 %) und die Behandlung mit 80 nM siRNA No5 (No5) resultierte in einem Cldn-1-Proteinlevel von $39,3 \pm 3,7\%$ (min. 0%; max.112,6%). Auch zwischen den verschiedenen siRNA-Behandlungen zeigten sich signifikante Unterschiede. Die großen Schwankungen innerhalb der



Abbildung 3-3: Einfluss der verschiedenen siRNA-Behandlungen auf das Proteinlevel von Claudin-1 (Cldn-1) in RHE an Tag 4 bzw. Tag 8. A, Repräsentativer *Western Blot* von Claudin-1 (Cldn-1) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). B, Relative Proteinlevel von Cldn-1. Zur Normierung der Werte wurde jeweils der Wert der Wildtyp-Kontrolle (WT) verwendet. Mittelwert + SEM. No5 = Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5, No8 = Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8, No8₅₄ = Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8, siRNA Ktrl = Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA. n = 12 verschiedene Spender. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8, ° zu No8₅₄. *: p<0,05; ***, ###, •••, °°°: p<0,001.

siRNA-Behandlungsgruppen kamen durch die hohe intraindividuelle Variabilität bezüglich des jeweiligen Claudin-1 Levels verschiedener Spender zustande.

An Tag 8 waren die Proteinlevel ebenfalls im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und bis auf die Transfektion mit No5 auch zur siRNA Kontrolle noch signifikant verringert. Die Restproteinlevel der mit No8-behandelten RHE-Modelle lagen im Mittel bei 25,5 \pm 2,8 % (p<0,001 zu WT und siRNA Ktrl). Die Einzelwerte der verschiedenen Modelle lagen dabei zwischen 0 % und 63 %. RHE-Modelle, die mit No8₅₄ behandelt waren, enthielten 52,3 \pm 4,1 % Cldn-1 (p<0,001 zu WT und siRNA Ktrl). Der niedrigste Wert lag hier bei 0 % und der Maximalwert lag bei 97 %. Auch die Behandlung mit No5 führte zu reduzierten Cldn-1-Proteinleveln an Tag 8 (p<0,05 zu WT, p=0,056 zu siRNA Ktrl). Diese Modelle zeigten im Mittel ein Proteinlevel von 88,6 \pm 3,8 % (Min. 15,5; Max. 144,5 %). Nach wie vor zeigten die verschiedenen siRNA-Behandlungen untereinander signifikant unterschiedliche KD-Effizienz. Die Transfektion mit der siRNA Ktrl führte weder zum frühen noch zum späten Zeitpunkt zu signifikanten Veränderungen des Proteinlevels.

Die quantitative Analyse auf Ebene der Genexpression brachte ähnliche Werte hervor und zeigte eine stark-positive Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Level der individuellen Modelle (Korrelationskoeffizient nach Pearson R_P = 0,845 (Tag 4, p<0,01) bzw. 0,687 (Tag 8, p<0,01). Das Bestimmtheitsmaß R² des linearen Modells zur Kurvenanpassung des Zusammenhangs von mRNA- und Proteinlevel lag bei 0,71 (Tag 4) bzw. 0,47 (Tag 8) (Abbildung 3-4A und B).

Studien dieser Arbeitsgruppe an Proben gesunder humaner Haut haben gezeigt, dass es erhebliche intraindividuelle Unterschiede in den epidermalen Claudin-1 Leveln gibt (Bergmann et al., in Vorbereitung). Nach Normierung auf die Probe mit der höchsten Immunfluoreszenzintensität ergaben sich dort Schwankungen von bis zu 50 %. Analog zur dortigen Normierung wurde in dieser Arbeit das Claudin-1 mRNA Level normiert. Dabei wurde der niedrigste gemessene ΔC_T -Wert als Cldn-1 Level von 100 % definiert und zur Berechnung der $\Delta\Delta C_{T}$ -Werte aller weiteren gPCR-Daten als Referenzprobe herangezogen (vgl. Kap. 2.7.4). Das normierte Cldn-1 Expressionslevel (Abbildung 3-5) betrug an Tag 4 nach Wechsel auf ALI in WT-Modellen im Mittel $75,4 \pm 2,8$ %. Die Einzelwerte lagen dabei zwischen 36,1 und 107,2 %. Die Transfektion mit siRNA No8 reduzierte das Cldn-1 Level auf $13,6 \pm 1,2$ % (min. 5,2%; max. 32,7%), durch No 8_{54} sank die Expression auf $22,9 \pm 1,6$ (min. 12,3%, max. 45%) und No5 resultierte in Expressionsleveln von $38,5 \pm 2,1$ % (min. 14,9 %; max. 70,2 %). Für Tag 8 ergaben sich in unbehandelten Kontrollmodellen Expressionslevel von $73,7 \pm 3,4 \%$, wobei der kleinste gemessene Wert bei 35,5 % lag und der höchste bei 134,6 %. Nach Cldn-1spezifischer siRNA-Transfektion lagen die gemittelten Werte bei 31.2 ± 1.9 % (No8; min. 10,8%, max. 57,1%), $38,2 \pm 2,1\%$ (No8₅₄ min. 18,6%, max. 74,5%) und $52,1 \pm 2,9\%$ (No5; min. 20,3 %, max. 80 %). Die Reduktion war an Tag 4 in allen Fällen auf dem Niveau von p<0,001 und bis auf No5 (p<0,01 zu siRNA Ktrl) auch an Tag 8 signifikant im Vergleich zu WT und siRNA Ktrl. Durch die Behandlung mit Kontroll-siRNA kam es nicht zu signifikanten Veränderungen der Genexpression von Cldn-1 (Tag 4: 67,7 \pm 2,1 %; Tag 8: 65,8 \pm 2,5 %). Untereinander zeigten die verschiedenen target-spezifischen siRNA-Behandlungen an Tag 4 signifikante Unterschiede in den normierten Cldn-1 Leveln. An Tag 8 war dieser Unterschied nur noch zwischen No5 und No854 bzw. No8, nicht aber zwischen den beiden mit verschiedenen Konzentrationen von No8 transfizierten Gruppen signifikant.



Abbildung 3-4: Korrelation zwischen relativen mRNA- und Proteinleveln an Tag 4 (A) bzw. Tag 8 (B). A, gestrichelte Linie zeigt den Graphen der linearen Funktion y=1,11^x-0,14; B, gestrichelte Linie zeigt den Graphen der linearen Funktion y=0,98^x+0,01. Farbige Punkte symbolisieren jeweils korrelierte mRNA- und Proteinwerte von Einzelmodellen. Zur Normierung diente jeweils die unbehandelte WT-Kontrolle. Grau, WT, wildtypische RHE; grün, siRNA Ktrl, Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; gelb, No8 54nM, Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8; rot, No5, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; blau, No8, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. n = 10 verschiedene Spender.



Abbildung 3-5: Boxplots der normierten Claudin-1 mRNA-Level nach verschiedenen siRNA-Behandlungen. Die Boxen zeigen den jeweiligen Wertebereich der Behandlungsgruppen, der durch oberes und unteres Quartil begrenzt ist. Kreuze markieren den Mittelwert und waagerechte Linien den Median. Durch die Antennen werden die Werte im Bereich bis zum 1,5-fachen Wert des Interquartilsabstandes gezeigt. Werte außerhalb dieses Bereiches werden als Punkte dargestellt. Für die Normierung wurde der niedrigste gemessene ΔC_T -Wert aller RHE-WT-Modelle herangezogen. Blau, No8, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; gelb, No8₅₄, Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8; rot, No5, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; grün, siRNA Ktrl, Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; Grau, WT, wildtypische RHE. n = 8 verschiedene Spender. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8, ° zu No8₅₄. ##, °°: p<0,01; ***, ###, •••, °°°: p<0,001.
Ergänzt wurden diese Daten durch Immunfluoreszenzfärbungen von Cldn-1, die den KD bestätigen (Abbildung 3-6). Dabei zeigte sich, dass schon am vierten Tag nach Wechsel auf ALI in den unbehandelten Modellen (WT) eine deutliche Cldn-1-positive netzartige Struktur im RHE entstanden war. Die siRNA-Kontrolle wies Proteinlokalisationen auf, die dem unbehandelten Modell sehr ähnlich waren. Nach Behandlung mit 80 nM siRNA No8 konnte in großen Bereichen kein Cldn-1 lokalisiert werden. Ledglich vereinzelte Zellen wiesen ein schwach-positives Signal auf. In den mit No5- und No854-transfizierten Modellen zeigten nur einzelne Bereiche im SG Cldn-1. An Tag 8 waren in den unbehandelten und siRNA Ktrltransfizierten Modellen große zusammenhängende Bereiche mit Cldn-1 zu erkennen. Die Cldn-1-positiven netzartigen Strukturen waren im Verglich dazu in den mit No5-behandelten Keratinozyten deutlich schmaler ausgeprägt und eher auf das SG beschränkt. Mit No854transfizierte Modelle zeigten nur ein zartes Cldn-1-positives Signal, welches an einzelnen Stellen prominenter sichtbar war. In RHE mit No8-Behandlung zeigten weiterhin nur einzelnen Zellen Cldn-1. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verwendete Methode zur Proteinreduktion in RHE zielführend war und sich das Modell daher gut für die Herangehensweise dieser Arbeit an die Analyse der dosis-abhängigen Beeinflussung der Barrierefunktion eignete.



3-6:

von

nach

siRNA-

54 nM

siRNA

AllStars

siRNA.

mit

rekonstruierter

3.2.1 EINFLUSS DES KNOCKDOWNS AUF DIE MORPHOLOGIE DER RHE

Die Morphologie der RHE-Modelle wurde untersucht, um bei den nachfolgenden Analysen der Barrierefunktion auf der einen Seite mögliche Veränderungen in die Interpretation der Daten einfließen lassen zu können und auf der anderen Seite diese Veränderungen von den Veränderungen der TJ-Funktionalität trennen zu können. Änderungen in der Zellmorphologie aufgrund des Verlustes von Cldn-1 konnten bei der Analyse der HE-Färbung in den lebenden Zellschichten nicht ausgemacht werden. Die auf die Höhe der WT-Modelle normalisierte relative Modellhöhe von SB bis zur Grenze SG-SC betrug 0.98 ± 0.03 (siRNA Ktrl), 0.95 ± 0.02 (No8₅₄), 1.02 ± 0.25 (No5) bzw. 0.96 ± 0.01 (No8) an Tag 4. Zum späten Zeitpunkt ergaben sich Werte von 0.99 ± 0.01 (siRNA Ktrl), 0.97 ± 0.02 (No 8_{54}), 0.88 ± 0.02 (No5) bzw. 0.99 ± 0.02 (No8). Anhand elektronenmikroskopischer Bilder konnte die Morphologie der RHE genauer analysiert werden (Abbildung 3-7). Es ließen sich an Tag 4 in wildtypischen Modellen insgesamt ca. 7 lebende (davon etwa 1-3 Schichten SG) und ca. 5-6 Zellschichten im SC zählen (siehe auch Kap. 3.1.2). Modelle der siRNA Ktrl zeigten ebenfalls eine gute morphologische Entwicklung (SB, 3-4 Schichten SSP, 2 Schichten SG und 4-6 Schichten SC). Im SSP waren deutlich Desmosomen sichtbar (Abbildung 3-7A, rechts unten "D") und im SG waren Keratohyalin-Granula vorhanden (Abbildung 3-7B, Mitte rechts "KHG"). Die unteren Schichten der Epidermis (SB und SSP) veränderten sich kaum, wenn Cldn-1 nach targetspezifischer siRNA-Behandlung fehlte, aber es war eine deutliche Veränderung der Stratifizierung und Morphologie der Keratinozyten sowie eine Reduktion der



С

Abbildung 3-7: Ultrastrukturelle **B** Aufnahmen der WT und siRNAbehandelten RHE an Tag 4. Dargestellt sind jeweils Keratinozyten an der Grenze zwischen Stratum granulosum (SG) und Stratum corneum (SC), KHG: Keratohyalingranula, D: Desmosomen, V: Vakuolen. WT, wildtypische RHE; No5, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; No8, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; No854nM, Transfektion mit 54 nM siRNA Hs CLDN1 8; siRNA Ktrl, Transfektion mit AllStars Negative Control siRNA. Maßstab: 500 nm.

Keratohyalingranula im SG zu sehen. Das etwa dreilagige SC war nur spärlich keratinisiert und die SC-Lagen waren weder mit den lebenden Zellschichten noch untereinander fest verbunden (Abbildung 3-7C). Dosis-abhängig zeigten die Modelle, die mit 54 nM siRNA No8 behandelt wurden, weniger Veränderungen in der Stratifizierung und eine korrekte SC-Bildung, wobei auch hier ungewöhnliche Vakuolen im Übergangsbereich von SC und SG sichtbar waren (Abbildung 3-7D). Der hohe logistische Aufwand ermöglichte diese detaillierten mithilfe von Prof. Marek Haftek in Lyon durchgeführten morphologischen Analysen leider nur für RHE an Tag 4.

Um einen potentiellen Einfluss auf die Differenzierung durch den Cldn-1 KD zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen von CK10, Inv, Lor und Flg in RHE nach Cldn-1 KD durchgeführt. Abbildung 3-8 zeigt die Gegenüberstellung von WT-, siRNA Ktrl- und No8behandelter RHE an Tag 4 und Tag 8. Für keines der Proteine ergab sich eine Lokalisation in anderen als den erwarteten Epidermisschichten. Für Lor und Flg wurden aber weniger positive Bereiche an Tag 4 sichtbar als in Kontrollmodellen (WT und siRNA Ktrl). Unterschiede in der



Abbildung 3-8: Lokalisation von Differenzierungsmarkern in RHE nach Claudin-1 Knockdown. In 4 Spalten sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen (grün) von Keratin 10 (CK10), Involucrin, Loricrin oder Filaggrin und Kernfärbung (Dapi; blau) überlagert mit dem Phasenkontrastbild in Wildtyp(WT)-RHE, siRNA-Kontrolle bzw. nach Cldn-1 KD mit siRNA No8 dargestellt. Oben: Tag 4, unten: Tag 8. No8, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; siRNA Ktrl, Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA. Messbalken = 50 μm.

Intensität der Färbung deuteten auf einen Einfluss auf die Genexpression bzw. Proteinebene hin. Die Modelle des späten Zeitpunktes zeigten diese Unterschiede nicht mehr. Die Inv-Färbung erschien zu beiden Zeitpunkten im Übergangsbereich zwischen SG und SC tendenziell breiter als in WT und siRNA Ktrl. Eine Quantifizierung der Genexpression und/oder der Proteinlevel von Inv, Lor und Flg wird in Kapitel 3.5 genauer betrachtet.

Es lässt sich daher festhalten, dass die Differenzierung in den lebenden Zellschichten von RHE demnach nicht bedeutend durch die siRNA-Behandlung verändert wurde, sich aber erhebliche Beeinträchtigungen in der Stratifizierung und der SC-Bildung zeigten.

3.2.2 EINFLUSS DES KNOCKDOWNS AUF DIE PROLIFERATION

Die Analyse der Ki67-Färbung diente der Beantwortung der Frage, ob der KD von Cldn-1 in RHE eine veränderte Zellteilung auslöst. Es kam zu einer leichten Erhöhung von MIB-positiven Zellen zum frühen Zeitpunkt, die aber nicht signifikant war. So fanden sich im Mittel 17,6 \pm 1,2 Ki67-positive Zellen/Gesichtsfeld in unbehandelten WT-Modellen, während die *target*-spezifische Transfektion mit siRNA zu Werten von 28,2 \pm 4,3 (No8, p=0,188), 25,3 \pm 3,7 (No8_{54nM}, p=0,335 zu WT) bzw. 19,1 \pm 1,97 (No5, p=0,959) Ki67-positive Zellen führte. Die siRNA-Ktrl Modelle zeigten 26,5 \pm 4,0 (p=0,293) Ki67-positive Zellen. Zum späten Zeitpunkt zeigten sich keine relevanten Veränderungen in der Proliferation in Abhängigkeit vom Cldn-1 KD (No8: 18,4 \pm 1,5; No8₅₄: 23,1 \pm 2,3; No5:18,7 \pm 3,2; WT: 19,9 \pm 4,4; siRNA Ktrl: 28,2 \pm 4,9 Ki67-positiven Zellen). Die Zellteilung wurde in dem hier verwendeten Modellsystem folglich nicht durch den Verlust von Cldn-1 beeinflusst.

3.2.3 EINFLUSS DES KNOCKDOWNS AUF DIE EXPRESSION ANDERER TJ-ASSOZIIERTER PROTEINE

Mögliche Veränderungen der TJ-Proteine Ocln und Cldn-4 in RHE nach KD von Cldn-1 wurden auf Protein- und Genexpressionsebene untersucht. Abbildung 3-9A zeigt, dass Ocln auf mRNA-Ebene weder während der Entwicklung/Regeneration noch in RHE mit reifer Barriere statistisch relevant verändert wurde. Die Proteinquantifizierung ergab für Tag 4 eine signifikante Erhöhung des Ocln-Levels in siRNA Ktrl-Modellen (p<0,05 im Vergleich zu WT). Außerdem befand sich in RHE mit No5 signifikant weniger Ocln als in siRNA Ktrl-Modellen (p<0,05) (Abbildung 3-9B). Für Cldn-4 wurde z.T. eine signifikante Reduktion der Expression zum frühen Zeitpunkt beobachtet (Abbildung 3-9C). Es ergaben sich Expressionslevel von 0,8-fach \pm 0,05 (No8_{54nM}; p=0,07 zu WT), 0,65-fach \pm 0,03 (No5; p<0,001 zu WT) und 0,64-fach \pm 0,05 (No8; p<0,001 zu WT). An Tag 8 wurden keine Veränderungen sichtbar. Auf

Proteinebene zeigten sich weder zum frühen noch zum späten Zeitpunkt signifikante Unterschiede für Cldn-4 (Abbildung 3-9D).

Die Auswirkungen auf das TJ-Plaqueprotein ZO-1 und auf JAM-A wurden ausschließlich auf Ebene der Genexpression analysiert. Beide zeigten weder während der Entwicklung noch in reifer RHE Veränderungen (Abbildung 3-9E und F).

Alles in allem führte der Verlust von Cldn-1 in RHE also nur zu marginalen Beeinflussungen anderer TJ-assoziierter Proteine auf Protein- bzw. Genexpressionsebene.







Abbildung 3-9: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf die Genexpression und das Proteinlevel anderer Tight Junction-assoziierter Proteine. A, B: Einfluss auf Occludin (Ocln); C, D: Einfluss auf Claudin-4 (Cldn-4); E: Einfluss auf ZO-1; F: Einfluss auf JAM-A. Dargestellt sind die durchschnittlichen relativen Genexpressionslevel (A, C, E, F) bzw. Proteinlevel (B, D) der genannten Moleküle. Zur Normierung der Werte wurde jeweils der Wert der Wildtyp-Kontrolle (WT) verwendet. Mittelwert + SEM. No5 = Transfektion mit 80 nM siRNA Hs CLDN1 5, No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs CLDN1 8, No854: Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8, siRNA Ktrl: Transfektion mit AllStars Negative Control siRNA. n = 3 (A, C, E, F), 4 (D, Tag 4) bzw. 5 (B, D Tag 8) verschiedene Spender. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl; *, #: p < 0,05; ##: p < 0,01; ***: p < 0,001.

3.3 EINFLUSS DES CLAUDIN-1 KNOCKDOWNS AUF DIE EPIDERMALE BARRIERE WÄHREND DER ENTWICKLUNG/REGENERATION (TAG 4)

3.3.1 ANALYSE DER ALLGEMEINEN BARRIEREFUNKTION

Die allgemeine Barrierefunktion der RHE-Modelle für Ionen wurde mittels TER-Messungen bestimmt. Aufgrund der großen Donorvariabilität wurde im Folgenden der jeweils auf die unbehandelte RHE (WT) normierte TER-Wert als Maß betrachtet. Die Behandlung mit siRNA löste generell signifikante Einbußen in der Ionenbarriere aus. So reduzierte sich der TER-Wert in den Modellen der siRNA-Kontrolle im Mittel auf $65,6 \pm 3,8 \%$ (p<0,001 zu WT). Der Verlust von Cldn-1 erniedrigte den transepithelialen Widerstand allerdings deutlich stärker auf $39,8 \pm 2,3 \%$ (No5), $34,2 \pm 2,3 \%$ (No8₅₄) und $20,7 \pm 1,2 \%$ (No8). Die Reduktion war in allen Fällen auf dem Niveau von p<0,001 signifikant im Vergleich zur WT- und siRNA-Kontrolle. Es zeigten sich auch signifikante Unterschiede zwischen den *target*-spezifischen siRNA-Behandlungen (Abbildung 3-10A). Darüber hinaus ergab sich ein linearer Zusammenhang (R²=0,400, p<0,001) und es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen TER-Wert und Genexpressionslevel (R_P=0,632, p<0,01; Abbildung 3-10B).



Abbildung 3-10: Einfluss des Claudin-1 Levels auf den transepithelialen elektrischen Widerstand in RHE an Tag 4. A, Relativer TER (von engl. *transepithelial electrical resistance*) nach Cldn-1 KD durch verschiedene siRNA-Behandlungen im Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen. Mittelwert + SEM. n = 12 verschiedene Spender. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8. ***, ###, •••: p<0,001. B, Korrelation von Cldn-1 mRNA-Level (%) und rel. TER in siRNA-behandelter RHE. Die gestrichelte Linie zeigt den Graphen der linearen Funktion y=0,01x + 0,13. Grün, siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; gelb, No8₅₄, No8 54nM: Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8; rot, No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; blau, No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. n = 8 verschiedene Spender.

3.3.2 ANALYSE DER INNEN-NACH-AUßEN TIGHT JUNCTION-BARRIERE

Die Funktionalität der innen-nach-außen TJ-Barriere kann durch die Analyse des parazellulären Flusses verschiedener Tracermoleküle begutachtet werden. Hierfür stehen zum einen Ionentracer zur Verfügung, die es ermöglichen, den Einfluss elektrischer Ladungen auf die TJ-Passage zu bewerten. Auf der anderen Seite ermöglichen Biotintracer verschiedener molekularer Masse die Beurteilung der Größenspezifität der TJ-Barriere.

3.3.2.1 Analyse der TJ-Barriere für den Ionentracer Lanthan

Um genauer zu untersuchen, ob der starke Einfluss auf den epidermalen Widerstand auf einer negativen Beeinflussung der TJ-Barriere für Ionen beruht, wurde mit dem Ionentracer Lanthan (La³⁺) die parazelluläre innen-nach-außen Penetration analysiert. In der Tat konnte in den elektronenmikroskopischen Bildern beobachtet werden, dass das Molekül im unbehandelten RHE-Modell bereits an Tag 4 nicht weiter als bis zum SG durch die intakte Epidermis wandern konnte (Ergebnisse nicht gezeigt). In Kontroll-siRNA-Modellen kam es ebenfalls nicht zur Penetration von Lanthan über das SG2 hinaus. Der als dunkle Linie gut verfolgbare parazelluläre Weg des Tracers endete im Übergang von SG2 zu SG1 (Abbildung 3-11A und B



Pfeil)). (schwarzer Cldn-1 Wenn herunterreguliert war, wurde Lanthan nicht mehr unterhalb des SG Der gestoppt. Ionentracer infiltrierte die interzellulären Bereiche des SG und durchzog das SC z.T. bis zur Oberfläche (Abbildung 3-11C und D).

Abbildung 3-11: Ultrastrukturelle Aufnahmen zur Lanthanpenetration an Tag 4 in RHE nach Claudin-1 Knockdown im Vergleich zu siRNA-behandelter RHE. Dargestellt sind jeweils Keratinozyten im oberen Stratum granulosum (SG1 und SG2) und Stratum corneum (SC). A, B, Lanthanpenetration in siRNA Ktrl-RHE bis zum SG2. Der Pfeil markiert einen Tracerstopp. C, D, Lanthan durchzieht Parazellularraum eines Cldn-1 KD Modells bis zur Oberfläche. B und D zeigen Vergrößerungen der in A und C mit Linien umrandeten Bereiche. No8, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; siRNA Ktrl, Transfektion mit AllStars Negative Control siRNA. Maßstab: 500 nm (A, C) bzw. 200 nm (B, D).

3.3.2.2 Analyse der TJ-Barriere für Tracermoleküle verschiedener Größe

Die Funktionalität der TJs in den Modellen für Moleküle zwischen 556,67 und 5000 Da wurde mithilfe des Biotin-Assays überprüft (vgl. Kap. 2.11.1). Abbildung 3-12 zeigt in Immunfluoreszenzbildern den Unterschied der funktionellen TJs zwischen WT-Modellen und Modellen mit starkem Cldn-1 KD. In unbehandelten RHE-Modellen waren im SG netzartige Cldn-1-positive Bereiche sichtbar. Im SG2 kam es dabei an funktionellen TJs zur Kolokalisation mit Biotin-556 Stopps (weiße Pfeile Abbildung 3-12B und C), oberhalb derer weder Cldn-1- noch Biotin-positive Signale sichtbar waren. Bei starkem Cldn-1 KD zeigten nur einzelne Zellen ein Cldn-1-positives Signal und die Färbung von Biotin-556 reichte bis zum oberen Rand des Modells. Die Anzahl an funktionellen TJs, die für die kleinste



Cldn-1 KD



Abbildung 3-12: Lokalisation von Claudin-1 und Biotin-556 Stopps in rekonstruierter humaner Epidermis und Tracerpenetration nach Knockdown von Claudin-1 an Tag 4. Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-1 (A, Cldn-1, grün) und Biotin-556 (B, rot). C, mit Kernfärbung (Dapi, blau) sowie Phasenkontrast überlagerte Bilder (merge). An funktionellen TJs kommt es zur Kolokalisation von Cldn-1 und Biotin-556 Stopps. C' zeigt Vergrößerung der in C umrandeten Bereiche. WT, Wildtyp; Cldn-1 KD, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. Messbalken = 50 μm.

Biotinylierungsreagenz undurchlässig waren und über die Anzahl an Biotin-Stopps quantifiziert wurde, nahm dosis-abhängig ab, wenn Cldn-1 herabreguliert war. Der logarithmische Zusammenhang (R^2 =0,617) zwischen Cldn-1 Expressionslevel und Anzahl der Biotin-556 Stopps ist in Abbildung 3-13A dargestellt. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman (R_s) betrug 0,858 und war auf dem Niveau von p<0,01 signifikant. Mit *target*-spezifischer siRNA No8-behandelte Modelle zeigten mit 0 ± 0,01(No8) und 0,2 ± 0,1 (No8₅₄) Biotin-556 Stopps/Gesichtsfeld signifikant (p<0,01) weniger Biotinstopps als wildtypische Modelle (4,1 ± 0,8 Biotin-556 Stopps/Gesichtsfeld) und als siRNA Ktrl-Modelle mit 4,5 ± 0,6 (p<0,01 für No8₅₄ und p<0,001 für No8). Die Behandlung mit siRNA No5 reduzierte die Anzahl an Biotinstopps nur geringfügig auf 2,6 ± 0,5 Biotin-556 Stopps/Gesichtsfeld.

Für die 1500 Da große Biotinylierungsreagenz (Biotin-1500) ergab sich ebenfalls ein logarithmischer Zusammenhang (R²=0,686, Abbildung 3-13B) zwischen mRNA-Level und Anzahl der Biotinstopps. Darüber hinaus lag der Korrelationskoeffizient nach Spearman bei 0,823 (p<0,01). In siRNA Ktrl-Modellen wurden $4 \pm 0,4$ Biotin-1500 Stopps/Gesichtsfeld beobachtet und wildtypische Modelle zeigten $5,4 \pm 0,3$ Stopps. Auch für Biotin-1500 reduzierte der Verlust von Cldn-1 die Anzahl der Tracerstopps signifikant (No5: $3,0 \pm 0,5$, p<0,05 zu WT; No8₅₄: $0,3 \pm 0,2$, p<0,001 zu WT und p=0,001 zu siRNA Ktrl; No8: $0 \pm 0,2$ Biotin-1500 Stopps/Gesichtsfeld, p<0,001 zu WT und p=0,001 zu siRNA Ktrl).

Der Biotin-Assay mit dem 5000 Da großen Biotin (Biotin-5000) resultierte in $4,2 \pm 0,7$ Biotin-5000 Stopps/Gesichtsfeld in wildtypischer Kontroll-RHE und $2,3 \pm 0,6$ Biotin-5000 Stopps/Gesichtsfeld in siRNA Ktrl-Modellen. Nach Cldn-1 KD ergaben sich im Vergleich zur WT-RHE signifikant niedrigere Werte für Modelle, die mit siRNA No8 behandelt wurden 0.5 ± 0.2 ; No854: $0,8 \pm 0,2$ Biotin-5000 Stopps/Gesichtsfeld). beiden (No8: Bei Konzentrationen war der Unterschied auf dem Niveau von p<0,001 signifikant. Für die Behandlung mit No5 ergab sich kein Unterschied in der Barrierefunktion $(2,5 \pm 0,4$ Biotin-Stopps/Gesichtsfeld, p=0,107). Der Vergleich mit den siRNA-behandelten 5000 Kontrollmodellen zeigte hier keine durch Cldn-1 KD induzierten Unterschiede. Der Korrelationskoeffizient lag für die größte Biotinylierungsreagenz bei 0,652 (p<0,01), aber das logarithmische Modell zeigte nur ein R^2 von 0,368 (Abbildung 3-13C).

In Summe konnten in RHE an Tag 4 für alle drei Biotinmoleküle gute positive Korrelationen zwischen dem mRNA-Level von Cldn-1 und der Anzahl der Biotinstopps nachgewiesen werden.



Abbildung 3-13: Einfluss des Claudin-1 Levels auf die innen-nach-außen Barriere für Biotintracermoleküle verschiedener Größe an Tag 4. Gezeigt ist die Quantifizierung der Biotin-Stopps pro Gesichtsfeld nach verschiedenen siRNA-Behandlungen im Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen (links) und die Korrelation von Cldn-1 mRNA-Level (%) und Anzahl an Biotin-Stopps pro Gesichtsfeld in siRNA-behandelter RHE (rechts). Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8, ° zu No8 54nM. *, •, °: p<0,05; **, ##, ••, °°: p<0,01; ***: p<0,001. Gestrichelte Linien zeigen den Graphen der jeweils angepassten logarithmischen Funktionen: A, Biotin-556, y= -6,24 + 2,52·log(x); B, Biotin-1500, y= -3,54 + 1,77·log(x); C, Biotin-5000, y= -1,53 + 0,95·log(x). Grün, siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; gelb, No8 54nM: Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8; rot, No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; blau, No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. n= 6 bzw. 4 (A), 4 bzw. 3 (B) und 3 (C) verschiedene Spender.

3.3.3 ANALYSE DER AUßEN-NACH-INNEN BARRIERE

Über die Permeabilität für den Tracer *Lucifer Yellow* (LY) wurde die Funktionalität der außennach-innen Barriere geprüft. Hierbei ist zu beachten, dass dieser Test nicht nur die Funktionalität der TJ- sondern auch der SC-Barriere widerspiegelt. Die Permeabilität für den 457 Da großen Tracer war in allen Modellen mit Cldn-1 KD signifikant erhöht im Vergleich zu WT- (8,14 · 10⁻⁸ ± 5,9 · 10⁻⁹ cm/s) und Kontroll-siRNA (9,13 · 10⁻⁸ ± 4,6 · 10⁻⁹ cm/s) Modellen (p<0,001; Abbildung 3-14A) und auch untereinander zeigten sich signifikante Unterschiede.



Abbildung 3-14: Einfluss des Claudin-1 Levels auf die außen-nach-innen Barriere an Tag 4. Gezeigt ist die Quantifizierung der *Lucifer Yellow* (LY) Permeabilität von RHE nach verschiedenen siRNA-Behandlungen im Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen (A) sowie die Korrelation der LY Permeabilität zu Cldn-1 mRNA-Leveln (B) und zum relativen TER (C) in siRNA-behandelter RHE. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8, ° zu No8 54nM. ••: p<0,01; ***, ###, •••, °°°: p<0,001. Gestrichelte Linien zeigen den Graphen der jeweiligen Potenzfunktionen: B, y= $5,02 \cdot e^{-6} \cdot x^{-0,91}$; C, y= $9,15 \cdot e^{-8} \cdot x^{-1,18}$. Grün, siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; gelb, No8 54nM: Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8; rot, No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; blau, No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. n= 4 verschiedene Spender.

So lag die LY Permeabilität der mit No8 behandelten Modelle mit $5,76 \cdot 10^{-7} \pm 4,8 \cdot 10^{-8}$ cm/s signifikant oberhalb der Werte von No8 54nM ($3,28 \cdot 10^{-7} \pm 2,2 \cdot 10^{-8}$ cm/s; p<0,01) und No5 ($1,73 \cdot 10^{-7} \pm 8,6 \cdot 10^{-9}$ cm/s; p<0,001). Die Transfektion mit Kontroll-siRNA erhöhte die Permeabilität nicht. Die Permeabilität korrelierte stark negativ mit dem Cldn-1 Level (R_s =- 0,831, p<0,01) und die Kurve einer Potenzfunktion (y=5,02·e⁻⁶·x^{-0,91}) beschreibt den deutlichen Zusammenhang (R^2 =0,702; Abbildung 3-14B). Außerdem korrelierte die Permeabilität signifikant mit dem rel. TER der RHE-Modelle (R_s =-0,896, p<0,01). Abbildung 3-14C zeigt die Kurve der beschreibenden Potenzfunktion (R^2 =0,786).

3.4 EINFLUSS DES CLAUDIN-1 KNOCKDOWNS AUF DIE EPIDERMALE BARRIERE IN REIFER RHE (TAG 8)

3.4.1 ANALYSE DER ALLGEMEINEN BARRIEREFUNKTION

Auch in reifer RHE wurde die Gesamtbarriere von Cldn-1 beeinflusst. Die Senkung des Cldn-1 Levels durch siRNA-Behandlung führte dosis-abhängig zur signifikanten Reduktion der TER-Werte (Abbildung 3-15A). In Abbildung 3-15B ist der lineare Zusammenhang ($R^2=0,320$) dargestellt. Ein R_P für TER und mRNA von 0,566 (p<0,01) zeugte zusätzlich von einer starken linearen Korrelation. Die Ionenbarriere in RHE, die mit der siRNA-Kontrolle behandelt wurde,



Abbildung 3-15: Einfluss des Claudin-1 Levels auf den transepithelialen elektrischen Widerstand in RHE an Tag 8. A, Relativer TER nach Cldn-1 KD durch verschiedene siRNA Behandlungen im Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen. Mittelwert + SEM. n = 12 verschiedene Spender. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8. •: p<0,05; ##: p<0,01; ***, ###, •••, °°°: p<0,001. B, Korrelation von Cldn-1 mRNA-Level (%) und relativem TER in siRNA-behandelter RHE. Die gestrichelte Linie zeigt den Graphen der linearen Funktion y=0,01·x-0,02. Grün, siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; gelb, No8₅₄, No8 54nM: Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8; rot, No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; blau, No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. n = 8 verschiedene Spender. entsprach dem Wert der unbehandelten Modelle (96,2 ± 4,7 %). Der Verlust von Cldn-1 durch siRNA-Transfektion erniedrigte den transepithelialen Widerstand im Mittel auf 72,4 ± 3,9 % (No5), $35,5 \pm 2,4$ % (No8₅₄) und 26,3 ± 2 % (No8). Wieder war auch der Unterschied zwischen den drei *target*-spezifischen Transfektionen signifikant.

3.4.2 ANALYSE DER INNEN-NACH-AUßEN TJ-BARRIERE

Die Anzahl der funktionellen TJs gemessen anhand der Tracerstopps war für alle Biotinmoleküle an Tag 8 größer als an Tag 4. Abbildung 3-16 zeigt eine exemplarische Immunfluoreszenzfärbung in WT-RHE und in RHE mit Cldn-1 KD an Tag 8. In WT-RHE zeigten sich an zahlreichen Stellen im SG Kolokalisationen von Cldn-1 und Tracerstopps (Pfeile Abbildung 3-16B, C). Auch nach Cldn-1 KD zeigten sich einzelne Stellen mit Kolokalisation von Claudin-1 und Biotin-556 Stopps im SG. Gleichzeitig zeigten sich in den KD-Modellen aber auch zu diesem Zeitpunkt noch Bereiche mit Penetration von Biotin-556 über das SG hinaus.

In Modellen mit deutlich reduzierter Menge an Cldn-1 war die Anzahl an Biotin-556 Stopps weiterhin signifikant kleiner als in wildtypischen oder mit siRNA Ktrl-behandelten Modellen (Abbildung 3-17A). So fanden sich $0,2 \pm 0,1$ Biotin-556 Stopps/Gesichtsfeld (No8, p<0,001 zu WT und siRNA Ktrl) und $4,9 \pm 1,5$ Biotin-556 Stopps/Gesichtsfeld (No8₅₄, p=0,01 zu WT bzw. p<0,01 zu siRNA Ktrl), während in wildtypischer RHE $12,5 \pm 1,2$ Biotin-556 Stopps/Gesichtsfeld präsent waren. Die Transfektion mit der siRNA Kontrolle resultierte in $13,4 \pm 1,3$ Biotin-556 Stopps/Gesichtsfeld. Modelle, die mit No5 behandelt wurden zeigten $13,5 \pm 1,1$ Biotin-556 Stopps/Gesichtsfeld. Der Zusammenhang zwischen mRNA-Level und Anzahl an Biotin-556 Stopps konnte durch die logarithmische Funktion y= -32,6 + 10,7 · log(x) (R²=0,381) beschrieben werden und R_s lag bei 0,58 (p<0,01).

Für das 1500 Da große Molekül zeigte sich ein ebenfalls ein logarithmischer Zusammenhang zwischen mRNA-Level und Anzahl der Tracerstopps (y= $-35,3 + 10,8 \cdot \log(x)$; R²=0,368, Abbildung 3-17B). Ein R_s von 0,60 (p<0,01) offenbarte zusätzlich eine starke Korrelation. Die mit No8-behandelten Modelle zeigten in beiden Konzentrationen im Mittel signifikant weniger Biotin-1500 Stopps/Gesichtsfeld als WT und siRNA Ktrl RHE (No8₅₄: $3,4 \pm 1,8$ Biotin-1500 Stopps/Gesichtsfeld, p<0,001; No8: $2,7 \pm 1,4$ Biotin-1500 Stopps/Gesichtsfeld, p=0,001). Wildtypische Modelle zeigten 12,2 ± 0,6 Biotin-1500 Stopps/Gesichtsfeld und Modelle nach Behandlung mit siRNA-Ktrl 12,1 ± 1,2 Biotin-1500 Stopps/Gesichtsfeld. Wieder führte die Behandlung mit siRNA No5 zu keiner Veränderung der Barrierefunktion (11,2 ± 0,8 Biotin-1500 Stopps/Gesichtsfeld). Die Barriere für das größte Biotinylierungsreagenz war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr Cldn-1-abhängig verändert und es gab keinerlei Korrelationen zum Cldn-1 Level (Abbildung 3-17C).



Abbildung 3-16: Lokalisation von Claudin-1 und Biotin-556 Stopps in rekonstruierter humaner Epidermis nach Knockdown von Claudin-1 im Vergleich mit Wildtyp-RHE an Tag 8. Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-1 (A, Cldn-1, grün) und Biotin-556 (B, rot). C, mit Kernfärbung (Dapi, blau) sowie Phasenkontrast überlagerte Bilder (merge). An funktionellen TJs kommt es zur Kolokalisation von Cldn-1 und Biotin-556 Stopps. C' zeigt Vergrößerung der in C umrandeten Bereiche. WT, Wildtyp; Cldn-1 KD, Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. Messbalken = 50 µm.



Abbildung 3-17: Einfluss des Claudin-1 Levels auf die innen-nach-außen Barriere für Biotintracermoleküle verschiedener Größe an Tag 8. Gezeigt ist die Quantifizierung der Biotin-Stopps pro Gesichtsfeld nach verschiedenen siRNA-Behandlungen im Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen (links) und die Korrelation von Cldn-1 mRNA-Level (%) und Anzahl an Biotin-Stopps pro Gesichtsfeld in siRNA-behandelter RHE (rechts). Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8, ° zu No8 54nM. *, #, •: p<0,05; ##, °°: p<0,01; ***, ###, •••: p<0,001. Gestrichelte Linien zeigen den Graphen der jeweils angepassten logarithmischen Funktionen: A, Biotin-556, y= -32,6 + 10,7·log(x); B, Biotin-1500, y= -35,3 + 10,8·log(x); C, Biotin-5000. Grün, siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; gelb, No8 54nM: Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8; rot, No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; blau, No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. n = 7 bzw. 4 (A) und 4 bzw. 3 (B, C) verschiedene Spender.

3.4.3 ANALYSE DER AUßEN-NACH-INNEN BARRIERE

Nach Verlust von Cldn-1 war die außen-nach-innen Barriere auch zum späten Zeitpunkt noch beeinträchtigt und es konnte eine signifikant erhöhte Permeabilität für *Lucifer Yellow* nach der *target*-spezifischen siRNA-Behandlung mit No8 und No8₅₄ und eine im Vergleich zum WT $(2,24 \cdot 10^{-9} \pm 2,0 \cdot 10^{-9} \text{ cm/s})$ tendenziell erhöhte Permeabilität in den mit No5-behandelten Modellen gemessen werden (No8: $2,40 \cdot 10^{-7} \pm 2,3 \cdot 10^{-8}$ cm/s, p<0,001 zu WT und siRNA Ktrl;

* * * 3,0E-07 ### 2,5E-07 LY Permeabilität (cm/s) 2,0E-07 1,5E-07 ## 1,0E-07 5,0E-08 00 0,0E+00 No8 No8 54nM siRNA Ktrl WT No5 Cldn-1 KD Kontrollen В С siRNA Ktrl siRNA Ktrl 5,0E-7 5,00E-7 • No8 54nM No8 54nM No5 No5 No8 No8 4,0E-4,00E LY Permeabilität (cm/s) LY Permeabilität (cm/s) 3,0E-3,00E-2,0E-7 2,00E 1,0E-7 1,00E-7 0,0E0 0,00E0-100 1,50 ò 20 40 60 80 0,00 0,50 1,00 Cldn-1 mRNA-Level (%) rel. TER

Abbildung 3-18: Einfluss des Claudin-1 Levels auf die außen-nach-innen Barriere an Tag 8. Gezeigt ist die Quantifizierung der Lucifer Yellow (LY) Permeabilität von RHE nach verschiedenen siRNA-Behandlungen im Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen (A) sowie die Korrelation der LY Permeabilität zu Cldn-1 mRNA-Leveln (B) und zum relativen TER (C). Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8, ° zu No8 54nM. ##, °°: p<0,01; ***, ###, •••: p<0,001. Gestrichelte Linien zeigen den Graphen der jeweiligen logarithmischen Funktion: B, y= 4,07·e⁻⁷+(-9,23·e⁻⁸)·log(x); C, y= -1,68·e⁻⁸ + (-1,16·e⁻⁷)·log(x). Grün, siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; gelb, No8 54nM: Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8; rot, No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; blau, No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8. n = 4 verschiedene Spender.

No8 54nM: $6,84 \cdot 10^{-8} \pm 1,2 \cdot 10^{-8}$ cm/s, p<0,001 zu WT und p<0,01 zu siRNA Ktrl; No5: $1,55 \cdot 10^{-8} \pm 5,9 \cdot 10^{-9}$ cm/s, nicht signifikant; Abbildung 3-18A). Zwischen den Cldn-1 KD Modellen ergaben sich jeweils signifikante Unterschiede. Die Korrelation zwischen den P_{APP}-Werten für LY und dem mRNA-Level (R_s=-0,509) war zu diesem Zeitpunkt etwas schwächer ausgeprägt, zeigte aber nach wie vor einen dosis-abhängigen Einfluss von Cldn-1 auf die Permeabilität der Barriere und war auf dem Niveau von p<0,01 signifikant. Abbildung 3-18B zeigt das logarithmische Modell des Zusammenhangs von Cldn-1 Expression und LY Permeabilität (R²=0,214). Interessanterweise korrelierte die Permeabilität nach wie vor signifikant mit dem rel. TER (R_s=-0,835, p<0,01). Auch dieser Zusammenhang konnte mit einem logarithmischen Modell dargestellt werden (R²= 0,805).

3.5 EINFLUSS DES CLAUDIN-1 KNOCKDOWNS AUF DAS STRATUM CORNEUM

Aus der Literatur ist bekannt, dass Veränderungen der TJs in Mäusen und RHE auch das SC auf Ebene der Proteine und Lipide beeinflussen (Sugawara et al., 2013, Turksen und Troy, 2002, Yuki et al., 2013). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Effekt des Knockdowns von Cldn-1 auf die Proteinexpression von SC-assoziierten Proteinen und auf die Lipidorganisation in humaner RHE untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Inv-Genexpression nicht verändert wurde (Abbildung 3-19A), aber die Proteinebene eine leichte Hochregulation erfuhr (Abbildung 3-19B). So stiegen die Proteinlevel nach Transfektion mit siRNA No8 an Tag 4 signifikant auf 153.4 ± 14.1 % (No8_{54nM}; p<0.05 zu WT) bzw. 134.3 ± 5.8 % (No8; p=0,005) an. Der Anstieg auf $174,2 \pm 26,8$ % nach Behandlung mit siRNA No5 war nicht signifikant (p=0,141). Auch an Tag 8 zeigte Inv nach target-spezifischer Transfektion Tendenzen einer Hochregulation auf Proteinebene, wobei sich keine Signifikanzen ergaben. Die Expression von Lor zeigte eine ausgeprägte Reduktion an Tag 4 auf den 0.21-fachen ± 0.04 (No5; p<0,01 zu WT), 0,49-fachen \pm 0,08 (No8; p=0,119 zu WT) bzw. 0,6-fachen \pm 0,05 (No8_{54:} p=0,282 zu WT) Wert der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3-19C). Allerdings veränderte auch die Transfektion mit siRNA Ktrl die Expression von LOR auf den 0,54fachen ± 0.07 (p=0.196 zu WT) Wert. Dieser Effekt verschwand über die Zeit, so dass an Tag 8 nur noch in den Cldn-1-spezifisch transfizierten Modellen eine reduzierte Expression von Lor messbar war (No8: 0,77-fach \pm 0,07; No8_{54nM}: 0,75-fach \pm 0,08; No5: 0,82-fach \pm 0,05; siRNA Ktrl: 1,01-fach \pm 0,07). Es ergaben sich keine Signifikanzen. Für Lor war auch auf Proteinebene zu beiden Zeitpunkten ein Trend zur Reduktion nach target-spezifischer siRNA-Behandlung zu sehen (Abbildung 3-19D).



Abbildung 3-19: Einfluss des Cldn-1 Knockdowns auf die Genexpression und das Proteinlevel von Stratum corneum-assoziierten Proteinen. Durchschnittliche relative Expressionslevel (A, C, E, F) bzw. relative Proteinlevel (B, D) der genannten Moleküle. Zur Normierung der Werte wurde jeweils der Wert der Wildtyp-Kontrolle (WT) verwendet. Mittelwert + SEM. No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; No8₅₄: Transfektion mit 54 nM siRNA Hs_CLDN1_8;

Fortsetzung zu Abbildung 2-18:

siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, • zu No8, ° zu No8₅₄. *, #, •: p < 0.05; **, ##, °°: p < 0.01; n = 4 (A, B Tag 4, D, F) bzw. 3 (B Tag 8, C, E) verschiedene Spender.

Daneben war auch das Filaggrin-Level auf mRNA-Ebene z.T. herunterreguliert (Abbildung 3-19E). An Tag 4 ergab sich das 0,39-fache \pm 0,06 Expressionslevel nach Behandlung mit siRNA No5 (p=0,001 zu WT) und das 0,64-fache \pm 0,09 Expressionslevel bei siRNA No8 (nicht signifikant, p=0,169). Zum späten Zeitpunkt lag das Flg-Expressionslevel mit dem 0,68fachen $\pm 0,06$ Wert nur nach Behandlung mit siRNA No8 (p<0,05 zu WT, p=0,004 zu siRNA Ktrl) signifikant unterhalb der unbehandelten bzw. siRNA Ktrl-Modelle. Für Repetin (Rptn) konnte zum frühen Zeitpunkt eine signifikante Steigerung der Expression nach Verlust von Cldn-1 in RHE auf maximal das 6,23-fache $\pm 1,5$ Expressionslevel (No8, p=0,02 zu WT, p=0,052 zu siRNA Ktrl) nachgewiesen werden (Abbildung 3-19F). Das 5,73-fache \pm 1,0 Expressionslevel wurde in den No5-behandelten RHE-Modellen erreicht (p=0,003 zu WT, p=0,011 zu siRNA Ktrl). Auch die Behandlung mit der niedrigen Konzentration siRNA No8 führte zu einer Steigerung der Rptn-Expression auf den 2,1-fachen ± 0.36 Expressionswert (No8₅₄, p=0,065 zu WT). Die Behandlung mit siRNA Ktrl führte ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Rptn-Expression in RHE (1.68-fach \pm 0.19; p=0.032 zu WT). Zum späten Zeitpunkt zeigten nur noch die mit der hohen Konzentration target-spezifischer siRNAbehandelten Modelle eine Tendenz zur Hochregulation von Rptn.

Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass die Behandlung mit siRNA No5 oft zu starken Effekten führte, die unabhängig vom Cldn-1 Level auftraten und damit vermutlich "*off-target"* Effekte sind. Mit der Hochregulation von Inv und Rptn sowie der Reduktion von Lor und Flg zeigten sich an Tag 4 aber auch nach der Behandlung mit siRNA No8 Cldn-1 dosis-abhängige Veränderungen. Für Tag 8 ergab sich nur für Flg eine signifikante Veränderung mit siRNA No8 und eine dosis-abhängige Tendenz zur Hochregulation von Inv, während Lor und Rptn zu diesem Zeitpunkt keine relevante Cldn-1 abhängige Veränderung mehr zeigten.

Neben der Proteinanalyse wurden auch die SC-Lipide, die einen entscheidenden Anteil an der Funktion der SC-Barriere haben, ultrastrukturell untersucht. Diese Messungen und ihre Interpretation wurden dabei von S. Dähnhardt-Pfeiffer (Microscopy Services, Flintbek, DE) an von mir hergestellten Modellen durchgeführt. Dabei ergab es sich, dass die normierte Lipidlamellenlänge pro 1000 nm² Interzellularraum nach Cldn-1 Verlust signifikant verkürzt und mit einer höheren Standardabweichung versehen war, was für ein Problem in der Struktur und Ordnung der Lipide spricht. In wildtypischen Modellen betrug die Länge der Lipidlamellen im Mittel 289 \pm 5,5 nm. Nach Behandlung mit siRNA No8 waren die Lipidlamellen mit 235,8 \pm

3-20: Abbildung Quantifizierung der Lipidlamellenlänge im Interzellularraum des Stratum corneum in RHE. Dargestellt ist die durchschnittliche normierte Lipidlamellenlänge pro 1000 nm² Interzellularraum im mittleren Stratum corneum nach Claudin-1 KD im Vergleich zu WTund siRNA-Kontroll-RHE, die sich aus je 5 Bildern von 3 Lokalisationen errechnet. Mittelwert + SD. No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs CLDN1 8; siRNA Ktrl: Transfektion mit AllStars Negative Control siRNA. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl. **: p<0,01; ***, ###: p<0,001; n = 2 verschiedene Spender.



10,1 nm (p<0,001 zu siRNA Ktrl und WT) deutlich kürzer und zeigten höhere Standardabweichungen. Die Transfektion mit siRNA Ktrl verkürzte die Länge auf $272,7 \pm 7,4$ nm (p<0,01 zu WT; Abbildung 3-20).

Da für die Bildung der Lipidlamellen die Prozessierung und Ausschleusung von *Lamellar Bodies* (LBs) essentiell ist, wurden diese genauer untersucht. Der KD von Cldn-1 veränderte die Polarisierung der Keratinozyten. Die LBs befanden sich statt wie gewöhnlich im apikalen Bereich vermehrt basal in den Keratinozyten (Abbildung 3-21A, schwarze Pfeile). Darüber hinaus kam es zu fehlerhaften Ausschleusungen der LBs, die bereits im SSP begannen. Abbildung 3-21B zeigt, dass dies nach Behandlung mit der siRNA Kontrolle nicht der Fall war. Außerdem wurden die LBs statt wie in WT-RHE als "Strumpf-förmige" Ausstülpung nach unten als breite "Omega-förmige" Blase nach oben ins SC integriert (Abbildung 3-21C, rote Pfeile). Diese Art der Fusion war auch nach Transfektion mit siRNA Ktrl sichtbar, wenn auch quantitativ und qualitativ nicht so stark verändert wie in KD-RHE (pers. Mitteilung, S. Dähnhardt-Pfeiffer).

Auf Basis dieser Daten lässt sich zusammenfassen, dass sich in RHE deutliche Einflüsse auf SC-assoziierte Prozesse in Abhängigkeit von der Expression bzw. vom Verlust von Cldn-1 ergaben.



Abbildung 3-21: Elektronenmikroskopische Bilder des Areals zwischen Stratum spinosum (SSP) und Stratum corneum (SC) in RHE an Tag 8. Übersicht über die Lage der *Lamellar Bodies* nach Claudin-1 KD mit 80 nM siRNA No8 (A) im Vergleich zur siRNA-Kontrolle (B). SG1-3, Schichten 1-3 im *Stratum granulosum*. C, Fusionsereignisse von *Lamellar Bodies* an der Grenze von SG1 und SC (rote Pfeile). A', B' und A'' sind Vergrößerungen der in A, B bzw. A' durch Boxen markierten Bereiche. Zu beachten ist die leichte Rotation von A'' um etwa 20°. Schwarze Pfeile zeigen LBs im basalen Bereich von Zellen im SG3, die dort nur nach Cldn-1 KD nicht aber in der siRNA-Kontrolle gefunden werden konnten. Maßstab: 2000 nm (A, B, C siRNA Ktrl), 1000 nm (A', C Cldn-1 KD und WT), 200 nm (B') und 50 nm (A'').

3.6 EINFLUSS DES CLAUDIN-1 KNOCKDOWNS AUF DIE ENTZÜNDUNGSREAKTION

Studien an murinen Keratinozyten haben ergeben, dass der Verlust von Cldn-1 die Expression des pro-inflammatorischen Cytokins IL-1 β erhöht (Tokumasu *et al.*, 2017). Daher stellte sich die Frage, ob auch in humanen Keratinozyten Cldn-1-abhängig eine Entzündungsreaktion

ausgelöst wird. Dieser Effekt wäre somit systemunabhängig und Keratinozyten-autonom. In der Tat zeigte sich, dass IL-1 β in allen Modellen mit reduziertem Cldn-1 Level höher exprimiert war. Je niedriger die Expression von Cldn-1 war, desto mehr IL-1 β wurde während der Barriereentwicklung von den Keratinozyten gebildet (No8: 3,42-fach ± 0,5; No8₅₄: 3,08-fach ± 0,6; No5: 1,96-fach ± 0,4; Abbildung 3-22). Der Korrelationskoeffizient R_s für die mRNA-Level von Cldn-1 und IL-1 β lag bei -0,536 und war auf dem Niveau von p=0,01 signifikant. Später verschwand dieser Effekt, so dass an Tag 8 keine signifikanten Unterschiede mehr messbar waren und die Expressionslevel nach *target*-spezifischer Transfektion zwischen 0,95-fach ± 0,10 (No5) und 1,55-fach ± 0,43 (No8₅₄) lagen.



Abbildung 3-22: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns (Cldn-1 KD) auf die Genexpression von IL-1 β in RHE im Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen an Tag 4 und Tag 8. Dargestellt sind die durchschnittlichen relativen Expressionslevel. Zur Normierung der Werte wurde der Wert der Wildtyp-Kontrolle (WT) verwendet. Mittelwert + SEM. No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; siRNA Ktrl: Transfektion mit 41/Stars Negative Control siRNA. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl. *, #: p < 0,05; **: p < 0,01. n = 4 verschiedene Spender.

Da die Interaktion von Bakterien mit der Hautbarriere Inflammationsreaktionen auslösen und/oder verstärken kann und die obengenannten Studien an Mäusen durchgeführt wurden, die eine natürliche Hautflora besaßen, sollte überprüft werden, ob bakterielle Besiedlung einen zusätzlichen Effekt auf die Entzündungsreaktion hat. Dafür wurden RHE-Modelle zunächst an Tag 2 oder Tag 6 nach Wechsel auf ALI mit dem apathogenen *S. carnosus* oder dem pathogenen *S. aureus* infiziert und die Reaktionen verglichen. Auf mRNA-Ebene ergab sich dabei, dass durch Infektion die Erhöhung des IL-1 β -Levels deutlich stärker ausfiel, als nach KD allein (Abbildung 3-23). Die Expressionslevel in den WT-Modellen stiegen an Tag 4 durch die Applikation von *S. carnosus* auf 4,98-fach ± 1,15 (p<0,001 zu WT nur mit NaCl behandelt (WT

NaCl)) und durch Infektion mit *S. aureus* auf 10,95-fach \pm 2,80 (p<0,001 zu WT NaCl). Der Unterschied zwischen den Infektionen mit den verschiedenen Bakterienarten war auf dem Niveau von p<0,01 signifikant. Auch siRNA-behandelte Modelle zeigten als Reaktion auf die Infektion mit den verschiedenen Bakterien Steigerungen in der Expression des proinflammatorischen Cytokins. Der Einfluss von *S. carnosus* war hierbei unabhängig vom Cldn-1 KD Level (No8 *S. carnosus:* 6,30-fach \pm 1,02, p<0,001 zu No8 NaCl; No5 *S. carnosus:* 5,71fach \pm 1,1, p<0,001 zu No5 NaCl). Die Infektion mit *S. aureus* zeigte einen tendenziell stärkeren Effekt in RHE mit Cldn-1 KD, der aber nicht dosis-abhängig war (No 8 *S. aureus:* 14,27-fach \pm 4,2, p<0,001 zu No8 NaCl; No5 *S. aureus:* 16,21-fach \pm 4,7, p<0,001 zu No5 NaCl).

Mit zunehmender Reife der Barriere nahm der Effekt der Infektion ab. An Tag 8 lagen die Expressionslevel von IL-1 β nach Applikation von Bakterien in WT-Modellen bei 2,63-fach ± 0,3 (WT *S. aureus*, p<0,05 zu WT NaCl) und 1,86-fach ± 0,7 (WT *S. carnosus*, nicht signifikant). Die Werte der siRNA-Kontrolle lagen bei 2,83-fach ± 0,5 (siRNA Ktrl *S. aureus*) bzw. 0,89-fach ± 0,1 (siRNA Ktrl *S. carnosus*). In den zur Vergleichbarkeit mit NaCl-behandelten KD-Modellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der IL-1 β Expression durch Behandlung mit siRNA No8 (No8 NaCl: 1,71-fach ± 0,18, p<0,05 zu WT NaCl, bzw. p<0,01 zu siRNA Ktrl NaCl). Kombiniert mit der Infektion mit *S. aureus* zeigte sich lediglich ein leichter zusätzlicher Anstieg der Expression von IL-1 β im Vergleich zur siRNA-Kontrolle (No8 *S. aureus:* 3,53-fach ± 0,6, p<0,05 zu No8 NaCl; No5 *S. aureus:* 3,20-fach ± 1,4, p<0,001 zu No5 NaCl). *S. carnosus* hingegen zeigte einen starken IL-1 β -steigernden Effekt in RHE mit starkem Cldn-1 KD (No8) und einen moderaten Effekt in No5-behandelten Modellen (No8 *S. carnosus:* 4,35-fach ± 0,8, p<0,01 zu No8 NaCl; No5 *S. carnosus:* 1,29-fach ± 0,5, p<0,05 zu No5 NaCl).

Die mittleren Cldn-1 Level nach KD mit siRNA No8 lagen in den hier verwendeten Modellen an Tag 4 bei 0,20-fach \pm 0,02 (No8 NaCl) und 0,62-fach \pm 0,16 (No5 NaCl). An Tag 8 lag die Cldn-1 Expression bei 0,51-fach \pm 0,08 (No8 NaCl) bzw. 0,95-fach \pm 0,12 (No5 NaCl).



Abbildung 3-23: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns (Cldn-1 KD) der Infektion und mit Staphylokokken auf die Genexpression von IL-1ß in RHE. Dargestellt sind die durchschnittlichen relativen Expressionslevel nach Infektion mit $5 \cdot 10^4$ S. aureus oder S. *carnosus* cm⁻² in 5 μ l einer 0,9% igen NaCl-Lösung im Vergleich zu NaClbehandelter RHE an Tag 4 (A) und Tag 8 (B). Zur Normierung der Werte wurde der Wert der NaCl-behandelten Wildtyp-Kontrolle (WT) verwendet. Mittelwert + SEM. No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs CLDN1 5; No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs CLDN1 8; siRNA Ktrl: Transfektion mit AllStars Negative Control siRNA. Signifikanzen: * zu WT NaCl, # zu siRNA Ktrl NaCl, / zu NaCl-Kontrolle innerhalb der Behandlungsgruppe, \setminus zu S. aureusinfizierter RHE innerhalb der Behandlungsgruppe. *, #: p < 0,05; **: p < 0.01. n = 3 verschiedene Spender.

3.7 EINFLUSS VON INFEKTION MIT STAPHYLOKOKKEN UND CLAUDIN-1 KNOCKDOWN AUF DIE BARRIEREFUNKTION

Nachdem kürzlich der Einfluss einer Infektion mit *S. aureus* auf die Hautbarriere in RHE beschrieben wurde (Bäsler *et al.*, 2017), sollte überprüft werden, ob Cldn-1 beim Schutz vor bakterieller Infektion eine Rolle spielt. Für die allgemeine Barrierefunktion der RHE auf Basis der TER-Werte konnte für *S. aureus* eine signifikante Beeinträchtigung der Barrierefunktion ermittelt werden (Abbildung 3-24). So sank der TER nach Infektion mit *S. aureus* an Tag 4 in wildtypischer RHE (67,8 ± 8 %, p<0,05 zu WT NaCl) und in siRNA-Ktrl RHE (26,0 ± 3 %, p<0,01 zu siRNA Ktrl NaCl) signifikant ab.



Abbildung 3-24: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns (Cldn-1 KD) und der Infektion mit Staphylokokken auf den transepithelialen elektrischen Widerstand in RHE. Dargestellt sind die durchschnittlichen relativen TER-Werte nach Infektion mit $5 \cdot 10^4$ *S. aureus* oder *S. carnosus* cm⁻² in 5 µl einer 0,9% igen NaCl-Lösung im Vergleich zu NaCl-behandelter RHE an Tag 4 (A) und Tag 8 (B). Zur Normierung der Werte wurde jeweils der Wert der NaCl-behandelten Wildtyp-Kontrolle verwendet. Mittelwert + SEM. No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA. Signifikanzen: * zu WT NaCl, # zu siRNA Ktrl NaCl, / zu NaCl-Kontrolle innerhalb der Behandlungsgruppe. *, #, /: p < 0,05; **, ##, //: p < 0,01; ***, ///: p<0,001. n = 3 verschiedene Spender.

Der Barriere-schwächende Effekt durch Cldn-1 KD wurde durch eine Infektion nicht verstärkt. Die Infektion mit *S. carnosus* veränderte den TER an Tag 4 nicht. An Tag 8 wurde in WT-Modellen der TER durch Infektion mit *S. aureus* signifikant gesteigert (105 ± 13 %; p=0,003 zu WT NaCl), während die Applikation von *S. carnosus* den gegenteiligen Effekt zeigte ($91,1 \pm 8,4$ %; p=0,001). Im Vergleich zur siRNA Ktrl-RHE war der TER nur noch in den mit siRNA No8-behandelten Modellen signifikant reduziert (NaCl: $51,2 \pm 8,4$ %, p=0,004; *S. aureus*: $48,9 \pm 7,2$ %, p=0,041; *S. carnosus*: $47,2 \pm 5$ %, p=0,015). Weder *S. aureus* noch *S. carnosus* veränderten die TER-Werte nach Cldn-1 Verlust signifikant, aber es war ein leichter Trend zur Herunterregulation zu beobachten.

Die außen-nach-innen Barriere zeigte an Tag 4 in WT-RHE nur eine leichte Beeinträchtigung nach Infektion mit *S. aureus* (Abbildung 3-25A). Die Permeabilität nach Behandlung mit NaCl lag bei 9,48·10⁻⁸ ± 8,8·10⁻⁹ cm/s (WT NaCl) und stieg durch Infektion mit Staphylokokken auf $1,62\cdot10^{-7} \pm 3,7\cdot10^{-8}$ cm/s (WT *S. aureus*, p<0,05) bzw. $1,04\cdot10^{-7} \pm 1,6\cdot10^{-8}$ cm/s (WT *S. carnosus*, nicht signifikant) an. In NaCl-behandelten siRNA-Kontrollmodellen lag die Permeabilität bei $1,81\cdot10^{-7} \pm 3,4\cdot10^{-8}$ cm/s und die Applikation von *S. aureus* führte zu einer Erhöhung der Permeabilität auf $5,30\cdot10^{-7} \pm 2,2\cdot10^{-8}$ cm/s (p<0,001 zu siRNA Ktrl NaCl). Nach Verlust von Cldn-1 war die zusätzliche Beeinträchtigung der Barriere nur nach Behandlung mit No5 tendenziell ausgeprägt (No8 NaCl: $1,14\cdot10^{-6} \pm 2,6\cdot10^{-7}$ cm/s, No8 *S. aureus*: $1,23\cdot10^{-6} \pm 1,9\cdot10^{-7}$ cm/s, No5 NaCl: $5,23\cdot10^{-7} \pm 8,6\cdot10^{-8}$ cm/s, No5 *S. aureus*: $6,89\cdot10^{-7} \pm 1,2\cdot10^{-7}$ cm/s). *S. carnosus* zeigte keinen deutlichen additiven Barriere-schwächenden Effekt.

An Tag 8 lagen die P_{APP} -Werte in den WT-Kontrollen bei $6,72 \cdot 10^{-8} \pm 1,0 \cdot 10^{-8}$ cm/s (WT NaCl), $6,81 \cdot 10^{-8} \pm 2,7 \cdot 10^{-9}$ cm/s (WT *S. aureus*) und $6,17 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$ cm/s (WT S. *carnosus*). Die NaCl-behandelten Modelle der siRNA Ktrl zeigten eine Permeabilität von $6,94 \cdot 10^{-8} \pm 8,2 \cdot 10^{-9}$ cm/s. Nur bei starkem Verlust von Cldn-1 (No8) war die Durchlässigkeit der RHE signifikant verändert (No8 NaCl: $2,11 \cdot 10^{-7} \pm 3,9 \cdot 10^{-8}$ cm/s, p < 0,05 zu WT NaCl, No5 NaCl: $8,13 \cdot 10^{-8} \pm 1,0 \cdot 10^{-8}$ cm/s, nicht signifikant; Abbildung 3-25B). Die Infektion mit *S. aureus* zeigte in allen siRNA-behandelten Modellen eine Tendenz zur erhöhten Permeabilität im Vergleich zur jeweiligen NaCl-behandelten Kontrolle (No8 *S. aureus*: $2,42 \cdot 10^{-7} \pm 4,1 \cdot 10^{-8}$ cm/s, No5 *S. aureus* $1,29 \cdot 10^{-7} \pm 3,5 \cdot 10^{-8}$ cm/s, siRNA Ktrl *S. aureus* $9,81 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-8}$ cm/s) während dies bei *S. carnosus* nur in den *target*-spezifisch behandelten Modellen der Fall war (No8 *S. carnosus*: $2,53 \cdot 10^{-7} \pm 2,3 \cdot 10^{-8}$ cm/s). Zu diesem Zeitpunkt hatte die Infektion mit Staphylokokken also nach wie vor einen geringen zusätzlichen Barriere-schwächenden Effekt nach Cldn-1 Reduktion, der aber nicht signifikant war.



Abbildung 3-25: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns (Cldn-1 KD) und der Infektion mit Staphylokokken auf die außen-nach-innen Barriere in RHE. Dargestellt ist die durchschnittliche Permeabilität für *Lucifer Yellow* (LY) nach Infektion mit $5 \cdot 10^4$ *S. aureus* oder *S. carnosus* cm⁻² in 5 µl einer 0,9% igen NaCl-Lösung im Vergleich zu NaCl-behandelter RHE an Tag 4 (A) und Tag 8 (B). Mittelwert + SEM. No5: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_5; No8: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA. Signifikanzen: * zu WT NaCl, # zu siRNA Ktrl NaCl, / zu NaCl-Kontrolle innerhalb der Behandlungsgruppe, $\langle zu S. aureus$ -infizierter RHE innerhalb der Behandlungsgruppe. *, #, /, $\langle p < 0,05; **, ##: p < 0,01; ***, ///, \langle w > 0,001. n = 3$ verschiedene Spender.

3.8 KNOCKDOWN VON CLAUDIN 4 IN RHE

Für den Knockdown von Cldn-4 wurden ebenfalls zwei target-spezifische siRNAs in einer Konzentration von 80 nM getestet. Nach Behandlung mit Hs CLDN4 7 (No7) und Hs CLDN4 4 (No4) sank das Cldn-4-Proteinlevel in den analysierten Proben eines Vorversuchs an Tag 4 deutlich ab (No7: 1 % bzw. No4: 12 % Restproteinlevel). Der rel. TER reduzierte sich auf 6 % (No7) und 11 % (No4). Zum späten Zeitpunkt war das Proteinlevel nur noch nach Behandlung mit siRNA No7 leicht reduziert (No7: 93 %; No4: 110 %), aber der TER erniedrigt (No7: 14%; No4: 77%). Aufgrund der komplexen weiterhin war Versuchsanordnung wurde im Folgenden nur mit der effizienteren siRNA No7 weitergearbeitet. Auf Ebene der Genexpression sank das auf die unbehandelte Kontrolle normierte Cldn-4 Expressionslevel auf 0,33-fach $\pm 0,09$ (Tag 4, Abbildung 3-26A). Dieser Wert war auf dem Niveau von p<0,001 signifikant niedriger als in WT- und siRNA-Kontrolle. An Tag 8 erreichte die Cldn-4 Expression den 0,45-fachen \pm 0,08 Wert der WT-RHE, was nach wie vor einer signifikanten Verringerung im Vergleich zur siRNA Ktrl (p<0,05) entsprach (Abbildung 3-26B).

3.8.1 CLAUDIN-4 KNOCKDOWN BEEINFLUSST DIE BARRIEREFUNKTION

Die TER-Werte waren nach Cldn-4-spezifischem KD signifikant zu den Kontroll-Modellen erniedrigt (Abbildung 3-26C und D). Zum frühen Zeitpunkt resultierte der Verlust von Cldn-4 in einem TER-Wert von $29,9 \pm 6\%$ (p=0,001 zu WT und siRNA Ktrl) und zum späten Zeitpunkt von $37,0 \pm 8,6\%$ (p<0,01 im Vergleich zu WT).

3.8.2 EINFLUSS AUF ANDERE BARRIERE-ASSOZIIERTE PROTEINE

Auch der Einfluss des KD von Cldn-4 auf andere mit der Barrierefunktion assoziierte Proteine wurde untersucht. Zum einen wurde die Expression von Cldn-1 überprüft. Hierbei ergab sich eine nicht-signifikante Reduktion des Cldn-1 Levels auf das 0,76-fache \pm 0,1 Level der WT-Modelle an Tag 4 bzw. das 0,63-fache \pm 0,11 an Tag 8 (p<0,05 zu WT; Abbildung 3-26E und F). Auf der anderen Seite wurden auch die mit der SC-Bildung assoziierten Proteine Flg und Lor auf Genexpressionsebene analysiert. Diese zeigten wie nach Cldn-1 KD auch nach Verlust von Cldn-4 in RHE eine z.T. deutliche Reduktion. Die Expression von Lor erniedrigte sich an Tag 4 auf den 0,49-fachen \pm 0,17 Wert (p=0,054 zu WT) und lag an Tag 8 signifikant erniedrigt beim 0,42-fachen \pm 0,05 Expressionslevel der WT-Modelle (p<0,001 zu WT bzw. p<0,05 zu siRNA Ktrl, Abbildung 3-26G und H). Für Flg lagen die Expressionslevel bei 0,41-fach \pm 0,17 (Tag 4, p<0,01 zu WT und p<0,05 zu siRNA Ktrl, Abbildung 3-26I) bzw. 0,22-fach \pm 0,03 (Tag 8, p<0,001 zu WT und p<0,05 zu siRNA Ktrl, Abbildung 3-26J).



Abbildung 3-26: Einfluss des Knockdowns von Claudin-4 auf die Genexpression verschiedener Barriere-assoziierter Proteine und auf den transepithelialen elektrischen Widerstand in RHE. Dargestellt sind die durchschnittlichen relativen Expressionslevel an Tag 4 (A, E, G, I) bzw. Tag 8 (B, F, H, J) der genannten Moleküle und der relative TER nach Cldn-4 KD im Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen an Tag 4 (C) bzw. Tag 8 (D). Zur Normierung der Werte wurde jeweils die Wildtyp-Kontrolle (WT) verwendet. Cldn-4 KD: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN4_7; siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA. Mittelwert + SEM. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl. *, #: p < 0.05; **, ##: p < 0.01; ***, ###: p < 0.001. $n \ge 3$ verschiedene Spender.

3.9 ANALYSE DER BARRIEREFUNKTION MITTELS IMPEDANZSPEKTROSKOPIE

Ein weiteres Maß für die Barrierefunktion in humanen Geweben ist ihre elektrische Impedanz (Wechselstromwiderstand). Die Methode der Zwei-Wege-Impedanzspektroskopie erlaubt die Unterscheidung von parazellulärem Widerstand (R^{para}), der durch die TJs entsteht, und transzellulärem Widerstand (R^{api}, R^{bas}, erzeugt durch die apikalen (api) bzw. basalen (bas) Zellmembranen) sowie dem Widerstand durch die SC-Barriere (R^{SC}). Mithilfe von Impedanzund Leitfähigkeitsmessungen wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, welchen Unterschied es in welchem Widerstand der Hautmodelle nach KD der untersuchten Claudine gab. Die Messungen und ihre Interpretation wurden von Prof. Dorothee Günzel und Roman Mannweiler (Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin, DE) an von mir generierten Modellen durchgeführt. Aufgrund der Komplexität von Messung und Interpretation der Werte, sind hier lediglich erste Pilotversuche abgebildet, die auf Basis der in Kapitel 2.11.4 dargestellten Hypothese zum Schaltkreis der Widerstände ausgewertet wurden. In Abbildung 3-27A sind exemplarisch die Nyquist Plots zur Impedanzspektroskopie von Keratinozyten-Donor K1048 in drei unabhängigen Versuchen gezeigt. Die Quantifizierung der Messdaten zeigte, dass sich der epidermale Gesamtwiderstand (Repi) in RHE neben dem RSC noch aus dem von TJs gebildeten parazellulären R^{para} sowie R^{api} und R^{bas} zusammensetzt. Abbildung 3-27B zeigt den relativen Widerstand der einzelnen Komponenten und ihre Beeinflussung durch den Verlust von Cldn-1 oder Cldn-4. Es zeigte sich, dass sich die apikalen und basalen Widerstände in Abhängigkeit von Cldn-1 oder -4 Verlusten reduzierten, wobei vor allem R^{basal} deutlich niedrigere Werte nach Verlust von Cldn-4 und an Tag 8 auch nach Verlust von Cldn-1 zeigte. Hauptsächlich wurden aber R^{SC} und R^{para} negativ verändert nach KD der untersuchten Claudine und werden daher im Folgenden genauer betrachtet. Im Verlauf der Barrierereifung von Tag 4 zu Tag 8 nahm R^{epi} zu. An Tag 4 betrug er durchschnittlich 1296,4 Ω ·cm² in WT-RHE und steigerte sich auf 2921,6 Ω ·cm² an Tag 8. Die Erhöhung des R^{SC} von 147,4 ± 61,1 Ω ·cm² (Tag 4) auf 785,9 \pm 210,1 Ω ·cm² war dabei signifikant (p<0,001; Abbildung 3-27C), während R^{para} nur einen Trend zu Steigerung des Widerstands zeigte (2217,6 ± 964,2 Ω ·cm² (Tag 4). $4971.9 \pm 1751.2 \ \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Tag 8); Abbildung 3-27D). An Tag 4 erreichte der R^{SC} nach Cldn-1 KD im Mittel einen Wert von 111,0 ± 55,4 Ω ·cm² (nicht signifikant) und erhöhte sich bis Tag 8 auf $363,5 \pm 215,8$ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (nicht signifikant; Abbildung 3-27C). R^{para} lag in Cldn-1 KD Modellen an Tag 4 bei 564,5 \pm 304,7 Ω ·cm² (p<0,05 zu WT und p<0,01 zu siRNA Ktrl; Abbildung 3-27D) und zum späten Zeitpunkt war der durchschnittliche Wert $1017,4 \pm 656,0 \ \Omega \cdot cm^2$ (p<0,05 zu WT und siRNA Ktrl; Abbildung 3-27D). Der epidermale Gesamtwiderstand sank nach Cldn-1 KD auf 546,5 Ω·cm² (Tag 4; p=0,06 zu WT bzw. p<0,05

zu siRNA Ktrl; mittleres Cldn-1 mRNA Level: $31,4 \pm 7$ %) bzw. 1112,1 Ω ·cm² (Tag 8; p<0,05 zu WT bzw. p=0,05 zu siRNA Ktrl; mittleres Cldn-1 mRNA Level: $16,9 \pm 5$ %).

Auch der Verlust von Cldn-4 hatte einen negativen Einfluss auf R^{SC} und R^{para}. Der R^{SC} wurde in diesem Fall stärker beeinflusst als nach KD von Cldn-1 und sank auf 40,7 ± 3,5 Ω ·cm² (Tag 4; mittleres Cldn-4 RNA Level 35,9 %) bzw. 234,6 ± 140,9 Ω ·cm² (Tag 8; mittleres Cldn-4 mRNA Level: 60,2 %; Abbildung 3-27C). R^{para} zeigte nach Cldn-4 Verlust Werte von 376,0 ± 315,3 Ω ·cm² (Tag 4) und 1082,8 ± 421,0 Ω ·cm² (Tag 8; Abbildung 3-27D). Aufgrund der geringen Stichprobengröße (n=2) wurde hierfür keine Statistik berechnet.

In Summe lässt sich festhalten, dass die Beeinträchtigung von R^{para} und R^{SC} durch den Verlust der Claudine sowohl deren Einfluss auf die TJ-Barriere für Ionen zeigt als auch die Beeinträchtigung der SC-Barriere widerspiegelt.



Abbildung 3-27: Impedanzmessung in RHE an Tag 4 und Tag 8 nach Claudin-1 oder Claudin-4 Knockdown im Vergleich zu WT- und Kontroll-RHE. A zeigt das exemplarische Ergebnis der Nyquist Plots von Donor K1048. Pro Behandlungsgruppe wurden 3 (Tag 4) bzw. 2 (Tag 8) unabhängige Modelle vermessen. Schwarz: Wildtyp; blau, siRNA Ktrl: Transfektion mit *AllStars Negative Control* siRNA; rot, Cldn-1 KD: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN1_8; grün, Cldn-4 KD: Transfektion mit 80 nM siRNA Hs_CLDN4_7. **B**, Relative Einzelwiderstände in siRNA-behandelter RHE. Zur Normierung wurden die Werte der jeweiligen WT-Kontrolle verwendet. Signifikanzen nach gepaartem T-Test. C, *Stratum corneum*-Widerstand (R^{SC}). **D**, Parazellulärer Widerstand (R^{para}). Mittelwert + SEM. Dunkelblau: Tag 4; hellblau: Tag 8. Signifikanzen nach ungepaartem T-Test. n=3 (WT, siRNA Ktrl und Cldn-1 KD) bzw. 2 (Cldn-4 KD) verschiedene Spender. Signifikanzen: * zu WT, # zu siRNA Ktrl, § zu Tag 4; *, #: p<0,05; §§, ##: p<0,01; §§§: p<0,001.

3.10 EINFLUSS VERSCHIEDENER C-CPE MUTANTEN AUF DIE BARRIEREFUNKTION

Alternativ zur Blockade der Proteinbiosynthese von Cldn-1 und Cldn-4 von Beginn an durch RNA-Interferenz wurden die Auswirkungen des targeting verschiedener Claudine durch die cterminale Domäne von Clostridium perfringens Enterotoxin (cCPE) in Modellen mit bereits entwickelter Barriere analysiert. In dieser Arbeit wurden drei cCPE-Varianten mit unterschiedlich hoher Affinität zu diversen Claudinen getestet: Wildtypisches cCPE (WT) bindet Cldn-3, -4, -6, -7 und mit geringerer Affinität Cldn-1. Die Mutante S305P/S307R/S313H (SSS) zeigt hohe Bindungsaffinitäten zu Cldn-1 bis -9, während L254A/S256A/I258A/D284A (LSID) primär Cldn-4 bindet und eine geringere Affinität zu den übrigen Claudinen zeigt. Zusätzlich wurde eine nicht-bindende Negativkontrolle zum Vergleich eingesetzt (cCPE-Y306A/L315A, YALA). Nach 48stündiger Inkubation der RHE mit 50 µg/ml der cCPE-Varianten wurde der Effekt auf die allgemeine Ionenbarriere (TER) und die außen-nach-innen Barriere (LY Permeabilität) analysiert. Die Behandlung mit den cCPE-Mutanten führte z.T. zu einem Anstieg der parazellulären Permeabilität (Abbildung 3-28). Dies zeigte sich für das WTcCPE durch einen signifikanten Abfall des TER auf $55,4 \pm 6,5$ % (p<0,001 zu unbehandelter RHE (Ø) und p=0.001 zu YALA) und einen signifikanten Anstieg der LY Permeabilität auf 342 ± 25 % (p<0,001 zu Ø und YALA) an Tag 4, während es an Tag 8 nur zu einer leichten Reduktion des TER auf $(75.3 \pm 9.7 \%)$ und zu einer deutlichen Erhöhung der LY Permeabilität kam $(197 \pm 29 \%)$, die beide nicht signifikant waren. Die Triple-Mutante SSS hatte an Tag 4 einen etwas größeren Einfluss auf die Ionenbarriere (TER: $48,5 \pm 4,3$ %, p<0,001 zu Ø und YALA) und einen signifikant größeren Einfluss auf die außen-nach-innen Barriere als WTcCPE (LY Permeabilität: 526 ± 46 %, p<0,001 zu Ø und YALA bzw. p<0,05 zu WT). Auch an Tag 8 war der TER nach Behandlung mit SSS noch signifikant verringert (73,5 \pm 6,7 %, p<0,05 zu Ø), während der Permeabilitäts-Assay nur eine Tendenz für eine erhöhte außen-nach-innen Passage des Tracermoleküls zeigte (178 ± 35 %). Die cCPE-Mutante LSID zeigte weder zum frühen noch zum späten Zeitpunkt einen Einfluss auf die Ionenbarriere. Die Permeabilität für LY wurde durch die Bindung von LSID an Tag 4 mäßig aber signifikant erhöht (138 ± 5 %, p<0,01 zu Ø). Der Unterschied zu den mit WT-cCPE oder SSS behandelten RHE-Modellen war zu diesem Zeitpunkt ebenfalls signifikant (p<0,001), wohingegen sich die Erhöhung auf 148 ± 30 % an Tag 8 nicht signifikant von den Werten der anderen Modelle unterschied.

Um die Effektgröße der verschiedenen cCPE-Varianten auf Basis der Expression der in der Haut relevanten Claudine bewerten zu können, wurden Claudin-1, -3, -4 und -7 auf Genexpressionsebene analysiert. Claudin-6 wurde bisher nicht in humaner Epidermis beschrieben und daher von den Analysen ausgenommen. Die Expressionslevel von Cldn-3 und

Cldn-7 waren mit C_T-Werten von >32 bzw. ~28 im Vergleich zu GAPDH (ca. 19), Cldn-1 (ca. 21) und Cldn-4 (ca. 23) sehr niedrig. Durch Inkubation mit den cCPE-Varianten wurde die Expression von Cldn-1, -3, -4 und -7 in den RHE-Modellen weder zum frühen noch zum späten Zeitpunkt verändert. Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass die Barrierefunktion in RHE auch durch nachträgliche Entfernung von Claudin-Molekülen beeinträchtigt wird.



Abbildung 3-28: Einfluss von Mutanten der c-terminalen Domäne von *Clostridium perfrigens* Enterotoxin auf den transepithelialen elektrischen Widerstand (A) und die Lucifer Yellow Permeabilität (B) in RHE. Dargestellt sind der durchschnittliche relative transepitheliale elektrische Widerstand (TER) bzw. die relative Permeabilität nach 48stündiger Inkubation mit 50 µg/ml cCPE (WT), cCPE-SSS (S305P/S307R/S313H) und cCPE-LSID (L254A/S256A/I258A/D284A) im Vergleich zu YALA(Y306A/L315A)-behandelter RHE und zur unbehandelten Kontrolle (Ø) an Tag 4 und Tag 8 nach Wechsel auf *Air-Liquid-Interface*. Alle Werte wurden auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normiert. Signifikanzen: * zu Ø, # zu YALA, • zu WT, § zu LSID. *, •: p<0,05; **, ##: p<0,01; ***, ###, §§§: p<0,001. n=3 (LSID Tag 4), 5 (TER Tag 8) bzw. 6 verschiedene Spender.

4 DISKUSSION

Die Tight Junctions waren lange als Teil der Hautbarriere umstritten. Diese Arbeit konnte ihre Bedeutung für die Barriere in RHE durch die Analyse der Relevanz von Claudin-1 und Claudin-4 unterstreichen. Sowohl die außen-nach-innen als auch die innen-nach-außen Barriere für molekulare Tracer der humanen Epidermis sind in ihrer Funktionalität von der Expression von Claudinen abhängig. Neben dem langfristigen Effekt durch die dauerhaft reduzierte Expression nach siRNA-Behandlung, sorgte auch eine nachträgliche Entfernung der Claudine aus den TJs durch die cCPE-Behandlung für eine Barriereschwächung. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass der epidermale Widerstand neben einem Anteil des *Stratum corneums* einen parazellulären Anteil hat. Die gegenseitige Beeinflussung einzelner Hautbarrierekomponenten wurde bereits vielfach untersucht (Bäsler *et al.*, 2016). Im Rahmen dieser Arbeit gelang der Nachweis über die Beeinflussung des SC durch den Verlust der TJ Proteine Claudin-1 und Claudin-4. Außerdem konnte für Claudin-1 eine Rolle in der Keratinozyten-autonomen inflammatorischen Antwort (auch nach Infektion mit Staphylokokken) nachgewiesen werden und somit als potentielles Ziel für zukünftige Behandlungsansätze bei Atopischer Dermatitis bestätigt werden.

4.1 CLAUDIN-1 ZEIGT EINEN DOSIS-ABHÄNGIGEN EINFLUSS AUF DIE EPIDERMALE BARRIEREFUNKTION

Kürzlich konnte in überflutet kultivierten murinen Keratinozyten eine dosis-abhängige Beeinflussung der epidermalen Barriere durch Claudin-1 nachgewiesen werden (Tokumasu *et al.*, 2016). Für humane Zellen fehlte diese Korrelation von verschiedenen Claudin-1 Leveln und der epidermalen Barrierefunktion bislang. Im Rahmen dieser Arbeit gelang in RHE, in der siRNA-vermittelt die Claudin-1 Menge unterschiedlich stark reduziert wurde, der Nachweis, dass sowohl die TJ-Barriere als auch die Gesamtbarriere eine Dosisabhängigkeit von Claudin-1 zeigen. Das verwendete RHE-Modell ermöglichte es dabei, die Auswirkungen einer veränderten Expression deutlich näher am humanen System zu analysieren als das in Monolayer-Kulturen möglich wäre. Bisherige Studien, die die Relevanz von Claudin-1 für die epidermale Hautbarriere dargelegt haben wurden im Mausmodell oder an überflutet kultivierten Zellen durchgeführt (De Benedetto *et al.*, 2011, Furuse *et al.*, 2002, Kirschner *et al.*, 2013, Sugawara *et al.*, 2013). Dabei wurde aber nur selten zwischen der Gesamtbarriere, die sich aus SC- und TJ-Barriere zusammensetzt, und dem separaten Anteil der TJ-Barriere unterschieden. Außerdem wurde nicht explizit untersucht, welche Proteinmenge mit welcher TJ-Barrierefunktion korreliert. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass die Quantität nicht der
einzige ausschlaggebende Faktor für die Barrierefunktion ist. Auch die Lokalisation und die Interaktion mit anderen Proteinen sind entscheidend für eine funktionelle Hautbarriere (Bäsler *et al.*, 2017, Kirschner *et al.*, 2013, Yuki *et al.*, 2007).

Während dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Reifegrade der SC-Barriere analysiert. Modelle von Tag 4 repräsentierten dabei die Epidermis während der Regeneration bzw. in der späteren Entwicklung. Das SC war zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig ausgereift, was sich zum einen durch die Zunahme an SC-Schichten und zum anderen durch den Anstieg des absoluten TER bis zu Tag 8 zeigte. Mit den Modellen von Tag 4 wird folglich der Zustand von Haut mit beeinträchtigter Barrierefunktion wie z.B. in AD-Läsionen oder in einer frühen Heilungsphase nach Verwundung, nicht aber der Zustand in gesunder Haut nachgestellt. RHE-Modelle von Tag 8 wurden verwendet, um die Situation in gesunder Epidermis mit entwickelter Barriere abzubilden. Zu diesem Zeitpunkt war die Entwicklung der Modelle weiter fortgeschritten und sie zeigten ein ausgeprägtes SC. Neben dem erhöhten TER spricht auch die Reduktion der Lucifer Yellow-Permeabilität für eine erfolgte Reifung der Gesamtbarriere. Niehues et al. publizierten 2017 in einem ähnlichen epidermalen 3D Modell, dass am 8. Tag der Kultivierung an der Air-Liquid-Interface (ALI) die optimale Stratifizierung der Epidermis erreicht wird (Niehues et al., 2017). Zu späteren Zeitpunkten war die Anzahl an SC-Schichten stark erhöht und aufgrund der fehlenden Abschuppung im Zellkulturmodell entsprach dieser Zustand nicht mehr humaner in vivo-Epidermis, so dass spätere Zeitpunkt für die Analysen verworfen wurden.

4.1.1 CLAUDIN-1 BEEINFLUSST DIE TIGHT JUNCTION-BARRIERE

Der Verlust von Claudin-1 reduzierte in RHE die Anzahl der funktionellen TJs signifikant. Dies konnte durch die verringerte Anzahl an Stopps für alle drei verwendeten Biotinmoleküle an Tag 4 und Tag 8 (bei starkem *Knockdown*) und anhand der Lanthanpenetration über das SG2 hinaus an Tag 4 gezeigt werden. In der Haut konnte die TJ-Barriere bereits für Lanthan (Hashimoto, 1971), Biotin-556 (Furuse *et al.*, 2002, Kirschner *et al.*, 2010, Yuki *et al.*, 2011a) und in Maus auch für größere Biotinmoleküle (Yokouchi *et al.*, 2015) nachgewiesen werden. Mit Biotin die Funktionalität der innen-nach-außen TJ-Barriere zu visualisieren ist eine etablierte Methode, die sowohl in 3D Modellen als auch in Haut (*in vivo* und *ex vivo*) universell eingesetzt werden kann (Furuse *et al.*, 2002, Kirschner *et al.*, 2010, Yokouchi *et al.*, 2015, Yuki *et al.*, 2011a). Die hier generierten Ergebnisse für die drei verwendeten Biotine konnten eine gute Korrelation zwischen dem Claudin-1 Level und der Funktion der TJ-Barriere in RHE an Tag 4 nachweisen. Dieser Zusammenhang konnte jeweils durch eine logarithmische Kurve dargestellt werden.

großen Veränderungen der TJ-Barriere führt, die Barrierefunktion aber unterhalb eines gewissen Grenzwertes nicht mehr aufrechterhalten werden kann. Diese Korrelation existiert auch in humaner Haut und wurde im Zusammenhang mit Claudin-1 Verlust in läsionaler Haut von AD-Patienten beschrieben (Daten der AG Brandner in Bergmann *et al.*, in Vorbereitung). In AD-Patienten wurde häufig eine eindeutig schlechtere TJ-Barriere für Biotin-556 in läsionaler Haut gefunden bei gleichzeitig höherem transepidermalen Wasserverlust (TEWL, von engl. *transepidermal water loss*) (Batista *et al.*, 2014, Gruber *et al.*, 2015, Kezic *et al.*, 2014, Yuki *et al.*, 2016). In von diesem Barriereverlust betroffenen Hautarealen wurde auch ein starker Verlust von Claudin-1 festgestellt, aber bisher nicht direkt mit der Barrierefunktion korreliert. Wenn die von AD betroffene Haut hingegen ein ähnliches Level an Claudin-1 enthielt wie gesunde oder nicht-läsionale Haut, war die Barrierefunktion nicht beeinträchtigt (Yoshida *et al.*, 2014). Dies spricht dafür, dass die TJ-Barriere hauptsächlich durch den Claudin-1 Verlust beeinträchtigt wird und nicht von anderen Faktoren der AD.

Die Hypothese bezüglich eines Claudin-1 Grenzwertes bis zu dem die Barrierefunktion unbeeinträchtigt bleibt, wird auch von den hier generierten Daten der unbehandelten Modelle gestützt. Diese Modelle zeigten hohe intraindividuelle Schwankungen im Cldn-1 mRNA-Level (vgl. Abbildung 3-5 WT) ohne dass die Barriere beeinflusst wurde. Diese Donor-Variabilität des Cldn-1 Levels wurde in der AG Brandner auch bei einer *in vivo* Studie zum Vergleich von gesunder mit nicht-läsionaler und läsionaler Haut von AD-Patienten beobachtet (Bergmann *et al.,* in Vorbereitung). Dort zeigten Immunfluoreszenzintensitätsmessungen, dass in gesunder Haut die Cldn-1 Intensität auf bis zu 50 % (bezogen auf die Probe mit der intensivsten Färbung) absinken kann, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion kommt. Daher lässt sich vermuten, dass die Haut bis zu einem Verlust von etwa 50 % Cldn-1 die Barrierefunktion durch kompensierende Mechanismen wie z.B. Hochregulation oder Re-Lokalisation anderer TJ-Proteine wie sie in Versuchen mit NHEKs und aus der Haut von AD Patienten beschrieben wurden aufrechthalten kann (Gruber *et al.*, 2015, Kirschner *et al.*, 2013).

Die Barrierefunktion von RHE für das größte Biotinmolekül (Biotin-5000, ~5 kDa) war weniger Cldn-1 abhängig als die Barriere für die beiden kleineren Moleküle, zeigte aber ebenfalls deutliche Beeinträchtigungen nach Cldn-1 *Knockdown* (KD). Dies widerspricht Studien aus NHEKs, wo eine Beeinflussung der parazellulären Barriere durch Claudin-1 KD bis 40 kDa beobachtet werden konnte (Kirschner *et al.*, 2013). Bei allergischer Inflammation in Flg-KO Mäusen wurde ebenfalls eine größen-abhängige Beeinflussung der TJ-Barriere berichtet. Dort war allerdings die Barriere erst für größere Moleküle (> 30 kDa) gestört (Yokouchi *et al.*, 2015). Die Diskrepanzen in den Ergebnissen lassen sich mit den verschiedenen Testsystemen erklären, mithilfe derer die Daten generiert wurden. Im Gegensatz zu den für diese Arbeit genutzten RHE-Modellen aus differenzierten Keratinozyten bilden überflutet kultivierte NHEKs kein funktionales SC aus und ähneln eher Schleimhautzellen. Möglicherweise ist es daher für sie besonders wichtig, auch gegenüber größeren Molekülen eine Barriere zu etablieren. In der Maus hingegen können auch Keratinozyten-unabhängige Mechanismen die Barriere unterstützen. Wichtig für die Barrierefunktion ist immer auch der Gesamtkontext und muss daher beim Vergleich von Daten aus verschiedenen Testsystem beachtet werden.

Möglicherweise ist Claudin-1 für die Zusammensetzung der epidermalen TJ-Barriere für kleine Moleküle entscheidender als für die Barriere für große Moleküle. Grund für die veränderte Größenselektivität könnten fehlende Interaktionen von Claudinen gegenüberliegender Zellen sein. Die molekularen Grundlagen der Interaktion von einzelnen Claudinen und ihre Rolle für die Blockade oder Passage von Makromolekülen über den parazellulären Weg ist bisher nicht genau aufgeklärt (Günzel und Yu, 2013). Es ist aber bekannt, dass Claudin-1 sowohl homophile als auch heterophile Interaktionen eingehen kann und allein die Anwesenheit von Claudin-1 reicht, um TJ-Stränge aufzubauen (Furuse et al., 1998, Krause et al., 2008, Sonoda et al., 1999). Auf der anderen Seite sind auch Interaktionen von Claudin-1 und Claudin-3 in murinen Fibroblasten beschrieben, die Einfluss auf die Barrierefunktion haben könnten (Coyne et al., 2003). Für größere Moleküle wurde außerdem ein Weg über die Zellzwischenräume von drei aneinandergrenzenden Zellen postuliert (Günzel und Yu, 2013, Staehelin, 1973). Aufgrund des quantitativ geringeren Auftretens dieser trizellulären Grenzen wirken sich möglicherweise erst große Einbußen von Claudin-1 so auf deren Funktion aus, dass es anhand des Biotinassays in RHE sichtbar wird, zumal eine direkte Beteiligung von Claudinen an trizellulären Grenzen in *vivo* bisher nicht beschrieben ist.

Nach Claudin-1 Verlust kam es in RHE zur Penetration des Ionentracers Lanthan über die TJs im SG2 hinaus. Dies bekräftigt den Einfluss von Claudin-1 auf die innen-nach-außen TJ-Barriere. Die generierten Daten passen zu Beobachtungen von Baek *et al.* aus muriner Haut, die nach mechanischer Beeinträchtigung des SC durch *Tape stripping*, was mit einer Reduktion von Claudin-1 einherging, eine Lanthan-Penetration bis ins SG1 beobachten konnten (Baek *et al.*, 2013). Auch bei Patienten mit *Ichtyosis vulgaris* konnte bereits gezeigt werden, dass die parazelluläre innen-nach-außen Passage von Lanthan durch Veränderungen der TJ-Zusammensetzung beeinflusst wird (Gruber *et al.*, 2011).

An Tag 8 war die Anzahl der Biotinstopps bei starkem Cldn-1 KD nach wie vor signifikant erniedrigt, während eine moderate Reduktion keinen Einfluss mehr auf die TJ-Barriere zeigte

(vgl. Abbildung 3-17). Darüber hinaus waren die Korrelationen für Biotin-556 und Biotin-1500 deutlich geringer und für Biotin-5000 ergab sich kein Zusammenhang zum Cldn-1 Level. Dieser weniger deutliche Zusammenhang zwischen Claudin-1 Menge und Funktionalität der innen-nach-außen Barriere an Tag 8 überraschte zunächst. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine Kompensation des Claudin-1 Verlustes durch Hochregulation der Expression anderer TJ- oder Barriere-assoziierter Proteine sein. Während dieser Arbeit zeigte sich diese kompensierende Regulation für Claudin-4. Während es an Tag 4 in Cldn-1 KD Modellen noch signifikant reduziert exprimiert war, zeigte sich an Tag 8 keine Reduktion in der Expression mehr. Auf Proteinebene ergab sich an Tag 8 bei starkem Cldn-1 KD eine tendenzielle, aber nicht signifikante Steigerung von Cldn-4. Diese Erhöhung auf Gen- und Proteinebene könnte eine kompensierende Hochregulation anzeigen. JAM-A, Ocln und ZO-1 als Vertreter der anderen TJ-assoziierten Proteinklassen waren in ihrer Expression nicht verändert. In vorausgegangenen Studien mit NHEKs konnten ebenfalls keine relevanten Veränderungen in der Expression anderer TJ-assoziierter Proteine nach Claudin-1, Claudin-4 oder Ocln KD nachgewiesen werden (Kirschner et al., 2013, Volksdorf et al., 2017). Nach Verlust von ZO-1 in NHEKs zeigte sich lediglich ein leichter Anstieg im Claudin-1 Level (Kirschner et al., 2013).

Am wahrscheinlichsten ist es, dass es zu Re-Lokalisationen und Umstrukturierungen innerhalb der TJs kam, die zum späten Zeitpunkt die parazelluläre Passage von Molekülen wieder besser kontrollieren konnten. Dies könnte unter anderem damit zusammenhängen, dass insgesamt an Tag 8 wieder mehr Claudin-1 in den siRNA-behandelten RHE-Modellen exprimiert wird. Die Tatsache, dass sich die KD-Effizienz über die Zeit verringerte, erklärt sich aus der fortschreitenden Proliferation der Keratinozyten. Bei jeder Zellteilung wird die initial eingebrachte siRNA reduziert, so dass die Expression von Claudin-1 nicht mehr in gleicher Effizienz unterbunden werden kann. Außerdem war an Tag 8 auch mehr Claudin-4 in den Modellen vorhanden, was zur Barrierebildung innerhalb der TJs durch ein verbessertes Mischungsverhältnis der exprimierten Claudine beitragen konnte.

4.1.2 CLAUDIN-1 HAT EINFLUSS AUF DIE EPIDERMALE GESAMTBARRIERE

Neben der TJ-Barriere trägt auch das *Stratum corneum* (SC) zur Hautbarriere bei. Da die SC-Barriere nicht separat in einem Barriereassay im Modell untersucht werden kann, behilft man sich mit Messungen zur Gesamtbarriere. Es wurde schon vielfach publiziert, dass der Hautwiderstand, der den Ionenfluss bzw. den Zellwiderstand in allen Schichten misst, durch veränderte Expression oder Lokalisation von TJ-Proteinen gestärkt oder geschwächt wird (Bäsler *et al.*, 2017, Furuse *et al.*, 2002, Kirschner *et al.*, 2013). Der relative TER, der auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle normiert ist, war in Cldn-1 KD RHE-Modellen zu beiden untersuchten Zeitpunkten dosis-abhängig reduziert. Es ergab sich jeweils ein linearer Zusammenhang zum Claudin-1 Level. Dies deutet auf eine unterschiedliche Beeinflussung der Barriere für Ionen und für molekulare *Tracer* hin. Dafür spricht auch der im Vergleich zu dem der Biotinbarriere deutlich niedrigere Korrelationskoeffizient, wodurch gleichzeitig jedoch der Einfluss des SCs auf die Ionenbarriere unterstrichen wird. Wie erwartet zeigte sich an Tag 8 aufgrund des höheren Einflusses des reifen SCs eine noch niedrigere Korrelation zwischen den TER-Werten und Claudin-1.

Den Einfluss des SCs bestätigen indirekt auch die Daten von Tokumasu *et al.*, die in überflutet kultivierten murinen Zellen ohne funktionales SC eine sehr gute Korrelation zwischen TER und Claudin-1 Level fanden. Für die außen-nach-innen Permeabilität eines 4 kDa großen *Tracers* zeigten sie in überflutet kultivierten murinen Keratinozyten ebenfalls einen starken Zusammenhang zum Cldn-1 mRNA Level (Tokumasu *et al.*, 2016). Auch während dieser Arbeit ergab sich in RHE eine deutliche Korrelation von LY Permeabilität und Cldn-1 Expression. Die in RHE gleichzeitig beobachtete hohe Korrelation der LY Permeabilität zum TER spricht für einen ähnlichen Anteil des SCs und der TJs an der Barriere für Moleküle auf ihrer Passage von außen-nach-innen und für den Ionenfluss.

Weder für den TER noch für die LY Permeabilität konnte die höhere Anzahl an SC-Schichten zum späten Zeitpunkt die Barrierefunktion nach Cldn-1 Verlust auf das Niveau der Kontroll-Modelle anheben. Neben der Möglichkeit, dass sich vom Cldn-1 Verlust induziert der Ionenund Tracerfluss so stark erhöht haben, dass auch deutlich mehr funktionale SC-Schichten dies nicht mehr kompensieren könnten, ist es auch denkbar, dass die SC-Funktionalität selbst durch den Cldn-1 Verlust so stark beeinträchtigt ist, dass das SC den Funktionsverlust der TJ-Barriere nicht ausgleichen kann. Für Letzteres sprechen auch die Ergebnisse der Zwei-Wege-Impedanzmessung. Diese Messung ist in der Lage, den Widerstand in Einzelkomponenten aufzuteilen. So konnte zum einen gezeigt werden, dass die Ionenbarriere in RHE einen parazellulären Anteil (R^{para)} und einen SC-Anteil (R^{SC)} haben muss und zum anderen wurde deutlich, dass beide Widerstände durch den KD von Cldn-1 verringert wurden. Diese Analyse basiert allerdings bisher nur auf wenigen Daten und ist auf eine vorläufige Hypothese zum möglichen Schaltkreis gestützt. Sie muss daher durch weitere Messungen verifiziert werden.

Um mögliche Gründe für die Veränderungen der SC-Barriere aufzuklären, wurden Morphologie, Proliferation und Differenzierung der RHE-Modelle genauer analysiert.

Im Unterschied zu veröffentlichten Studien, ergab sich keine Veränderung der Proliferation nach Claudin-1 KD. Sowohl für Haarfollikel-Keratinozyten als auch in Wundheilungsassays

mit primären Keratinozyten zeigte sich eine Abnahme der Proliferation nach Cldn-1 Reduktion (Volksdorf et al., 2017, Zorn-Kruppa et al., 2016). Auch Zellen verschiedener Krebsarten sowie bei Asthma veränderte Zellen der glatten Atemwegsmuskulatur zeigten einen negativen Einfluss des Claudin-1 KDs auf die Proliferation, wobei hier eine zusätzliche Wirkung von pathologisch verändertem Cell Signalling als Ursache in Betracht gezogen werden muss (Fortier et al., 2013, Fujita et al., 2011, Huang et al., 2015). De Benedetto et al. zeigten, dass der Verlust von Claudin-1 in Keratinozyten auch zu einer erhöhten Proliferation führen kann (De Benedetto et al., 2011). Dieser Effekt zeigte sich auch in murinen AD Ekzemen (Gruber et al., 2015). Die Diskrepanzen in den Ergebnissen lassen sich mit den verschiedenen Testsystemen erklären. Während in der hier vorliegenden Arbeit mit einem Modell mit differenzierten Keratinozyten unter Hochcalciumbedingungen unter Air Liquid Interface-Bedingungen gearbeitet wurde, analysierten Volksdorf et al. den Effekt auf die Proliferation in durch Verwundung gestressten, undifferenzierten Zellen im Monolayer. De Benedetto et al. verwendeten unverwundete differenzierte Keratinozyten in calcium-armem, FCS-haltigen Medium und die Studien an Haarfollikel-Keratinozyten wurden unter Zugabe von Calcium in überfluteten Kulturen durchgeführt (Zorn-Kruppa et al., 2016). So konnte in diesen Ansätzen kein funktionales SC entstehen. Die Proliferation im atopischen Mausmodell könnte zusätzlich durch das die Keratinozyten umgebende inflammatorische Milieu beeinflusst worden sein. Wichtig für den jeweiligen Effekt auf die Proliferation ist also der Gesamtkontext, so dass sowohl Proliferations-steigernde als auch Proliferations-senkende Wirkungen durch den Verlust von Claudin-1 ausgelöst werden können. Möglicherweise gleichen sich diese positiven und negativen Effekte im verwendeten Modell gegenseitig aus oder werden durch eine zusätzliche Beeinflussung der Differenzierung verändert.

Im AD-Mausmodell konnte der Verlust von Claudin-1 mit der Abwesenheit von Keratin 10 und einer damit einhergehenden veränderten Differenzierung korreliert werden (Gruber *et al.*, 2015). Dieser Zusammenhang konnte in RHE nach Claudin-1 KD nicht beobachtet werden, was ebenfalls durch den Einfluss des gesamten Organismus und der dermalen Inflammation im Mausmodell im Vergleich zu Keratinozyten-autonomen Effekten in RHE erklärt werden kann. Wie die Lokalisation von CK10, Involucrin (Inv), Loricrin (Lor) und Filaggrin (Flg) zeigt, die zu beiden untersuchten Zeitpunkten derjenigen in gesunder Haut entsprach, wurde die zeitliche und örtliche Abfolge der Keratinozyten-Differenzierung in RHE durch den Verlust von Claudin-1 nicht stark verändert. Neben der Lokalisation ist aber auch die Quantität für die Funktionalität von Proteinen von entscheidender Bedeutung. Für die SC-assoziierten Proteine Inv, Flg und Lor sowie Repetin (Rptn) ergaben die Quantifizierungen mittels *Western Blot* bzw. qPCR Veränderungen nach Verlust von Claudin-1 zum frühen Zeitpunkt. Für Lor und Flg waren die beobachteten Effekte auf die Expression bzw. Proteinmenge und für Inv der Effekt auf die Genexpression nach Behandlung mit siRNA No5 am stärksten. Daher ist es fragwürdig, ob der Claudin-1 Verlust alleine für diese Veränderungen verantwortlich ist und man sollte berücksichtigen, dass unspezifische "*off-target*"-Effekte aufgetreten sein könnten, die möglicherweise den Effekt verstärkt oder verändert haben. Dies würde auch zur Beobachtung passen, dass die Menge an Inv und Lor in CEs von Claudin-1 KO-Mäusen nicht verändert wurde (Furuse *et al.*, 2002). In reifer RHE war nur das Flg-Level Claudin-1 abhängig reduziert.

Die signifikante Erhöhung des Proteinlevels bzw. die tendenzielle Erhöhung der Genexpression von Inv zum frühen Zeitpunkt passt zu Daten von humanen Keratinozyten nach Claudin-1 KD (Gruber *et al.*, 2015, Kirschner *et al.*, 2013). Im Gegensatz dazu wurden für differenzierte murine Zellen mit Claudin-1 Defizit verringerte Inv-Level beschrieben (Kirschner *et al.*, 2011). Auch nach Ocln-Verlust in einem 3D Hautmodell ließ die Inv-Expression nach (Rachow *et al.*, 2013). Die Hypothese, dass die Veränderung der Inv-Level eine Reaktion zur Kompensation der Funktionalität der TJ-Barriere mittels Stärkung der SC-Barriere sein könnte, muss daher in Zukunft genauer analysiert werden, um einen möglichen Zusammenhang aufzuklären.

Bei Patienten mit AD wurde zwar eine verfrühte Expression von Inv im mittleren SSP, aber eine gleichzeitige Reduktion der Intensität beobachtet (Jensen *et al.*, 2004). Für die Genexpressionsebene hingegen sind widersprüchliche Daten publiziert. Auf der einen Seite gibt es Studien, die eine tendenzielle Erhöhung der Inv Expression in läsionaler Haut zeigen und auf der anderen Seite wird eine reduzierte Expression von Inv postulieret (Suarez-Farinas *et al.*, 2011, Sugiura *et al.*, 2005).

In RHE konnte während dieser Arbeit aufgrund von technischen Schwierigkeiten die Proteinebene von Flg nicht mittels *Western Blot* analysiert werden. Auf mRNA-Ebene zeigten sich verringerte Flg-Level nach siRNA-Behandlung. Die Reduktion von Flg an Tag 4 war dabei nur in der Gruppe der mit siRNA No5 behandelten Modelle signifikant auf ca. 40 % reduziert. Für die Modelle, die die höchste KD-Effizienz für Claudin-1 zeigten (No8), ergab sich aber ebenfalls eine deutliche Reduktion im Flg-Level auf etwa 60 %. Zum späten Zeitpunkt zeigten nur noch die Modelle mit dem geringsten Claudin-1 Level eine signifikante Reduktion von Flg (ca. 70 %). Im von De Benedetto *et al.* verwendeten Ansatz mit überflutet kultivierten humanen Keratinozyten mit Claudin-1 KD ergab sich eine leichte Tendenz zur Hochregulation von Flg (De Benedetto *et al.*, 2011). Ähnliches zeigten humane Keratinozyten zu späten Zeitpunkten der Differenzierung auf mRNA-Ebene (Gruber *et al.*, 2015). Auch hier ist der Einfluss der

unterschiedlichen Kulturbedingungen möglicherweise ursächlich für die andersgearteten Ergebnisse. Der Zusammenhang von Cldn-1 Verlust und Flg-Veränderungen in der Epidermis konnte in einem KO-Mausmodell bereits gezeigt werden. Der KO von Claudin-1 führte in den Tieren zu Änderungen der Flg-Prozessierung (Sugawara *et al.*, 2013). Da die korrekte Prozessierung von Flg für die korrekte SC-Entstehung entscheidend ist, sollten weitere Untersuchungen im humanen 3D-System nach Cldn-1 KD folgen, um den genauen Zusammenhang zwischen Cldn-1 und Flg aufzuklären (Kezic und Jakasa, 2016, Sandilands *et al.*, 2009).

In Cldn-1-defizienter RHE kam es außerdem zu einer tendenziellen Reduktion von Lor. Dies steht im Widerspruch zu Beobachtungen bei überflutet kultivierten humanen Keratinozyten, in denen der Cldn-1 KD eine Zunahme der Lor-Expression auslöste (Kirschner *et al.*, 2013). Pendaries *et al.* hingegen fanden ähnliche Ergebnisse nach Flg-KD in rekonstruierter humaner Epidermis (Pendaries *et al.*, 2014). In einem epidermalen 3D-Modell mit humanen Flg-defizienten Keratinozyten kam es ebenfalls zu einer tendenziell reduzierten Lor-Expression (Niehues *et al.*, 2017). Dies passt zum einen zur *in vivo* Situation von AD Patienten (Guttman-Yassky *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2008, Sugiura *et al.*, 2005) und zum anderen zu Beobachtungen in HaCaT Zellen mit Flg KD (Yoneda *et al.*, 2012).

Die Reduktion von Lor löste in Mäusen eine Hochregulation von Rptn aus, was als Rettungsmechanismus zur Wiederherstellung der Hautbarriere diskutiert wird (Koch *et al.*, 2000). In der Tat konnte auch in RHE mit Claudin-1 KD eine signifikante Erhöhung der Rptn-Genexpression nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass die Steigerung von Rptn in den meisten siRNA-Gruppen entsprechend dem Verlust von Lor auftrat. Daher lässt sich vermuten, dass die Veränderung der Rptn -Expression nicht in direktem Zusammenhang mit dem Claudin-1 Level steht, sondern es sich dabei um einen sekundären Effekt aufgrund der Beeinflussung der Lor -Expression handelt.

In der Immunfluoreszenzfärbung ist die Veränderung der Proteinmengen bisweilen nicht eindeutig zu erkennen. Das Flg-positive Signal beispielsweise zeigte sich an Tag 8 nicht eindeutig reduziert aber mit punktförmigen Signalen wie zu früheren Zeitpunkten in unbehandelten Kontrollmodellen und insgesamt war der Flg-positive Bereich nach KD etwas schmaler, was für eine verzögerte Prozessierung sprechen könnte. Mögliche Erklärungen für die Diskrepanz zwischen mRNA-Level und IF-Färbung sind, dass die an Tag 8 sichtbaren Proteine bereits vorher synthetisiert wurden und somit kein direkter Rückschluss zur mRNA-Expression zum gleichen Zeitpunkt gezogen werden kann. Außerdem könnte neben einer quantitativen Reduktion auch eine Konformationsänderung die Zugänglichkeit des Antikörpers zum Zielprotein und dessen Lokalisation im SG und damit die Signalintensität verbessert haben, so dass ein falsch-positives Bild entsteht. Auch eine vermehrte Rekrutierung zum SG ausgelöst durch den KD vom Zielprotein zum SG bei unveränderter Gesamtproteinmenge ist denkbar.

Nichtsdestotrotz sprechen die durchgeführten Analysen zur Differenzierung für einen langfristigen negativen Effekt des Claudin-1 Verlustes auf die SC-Bildung in humaner Epidermis. Zur genaueren Untersuchung dieses Effektes wurden elektronenmikroskopische Bilder angefertigt. In den Aufnahmen ist zu erkennen, dass das SC an Tag 4 nach Claudin-1 Verlust dosis-abhängig an Kompaktheit verliert und die Keratinisierung gestört wird (vgl. Abbildung 3-7). Dazu passt die Beobachtung, dass sich Korneozyten von Claudin-1 KO Mäusen morphologisch von denen in WT-Tieren unterscheiden (Sugawara et al., 2013). Nach Behandlung mit cCPE wurde ein dickeres SC beschrieben, das auf der Vergrößerung des individuellen Ausmaßes von Korneozyten nicht aber einer erhöhten Anzahl an SC-Schichten basiert (Yuki et al., 2013). Eine mögliche Erklärung für die fehlerhafte Bildung der Korneozyten ist, dass das Flüssigkeits-Milieu an der Grenze zwischen SG und SC durch eine erhöhte Passage von wasserlöslichen Molekülen durch Claudin-1-negative TJs verändert ist oder zum sauren pH beitragende natürliche Feuchtigkeitsfaktoren wie Urocaninsäure aufgrund der fehlenden Flg-Prozessierung abwesend sind, so dass die terminale Differenzierung der Korneozyten durch einen zu hohen pH-Wert gestört wird (Furuse et al., 2002, Krien und Kermici, 2000, Sugawara et al., 2013). Auch wenn die Lokalisation von CK10 in Claudin-1 KD RHE unverändert erschien, könnte eine Veränderung der Keratine oder ihrer Zusammensetzung durch den Verlust von Claudin-1 zu einer veränderten SC-Bildung geführt haben. Der Verlust der Kompaktheit von Korneozyten im SC ist z.B. ebenfalls von K1/K10-Knockout Mäusen bekannt (Wallace et al., 2012).

Da das SC von Claudin-1 KO Mäusen Auffälligkeiten in der Lipidzusammensetzung zeigte, wurden während dieser Arbeit auch die Auswirkungen des Claudin-1 KD auf die SC-assoziierten Lipide bzw. auf die ihre Vorläufer enthaltenen *Lamellar Bodies* untersucht (Sugawara *et al.*, 2013). RHE mit Claudin-1 KD zeigte dabei eine signifikante Verkürzung der Lipidlamellenlänge pro 1000 nm² Interzellularraum im mittleren SC bei gleichzeitig erhöhter Standardabweichung. Yuki *et al.* beschrieben zuvor disaggregierte und desorganisierte Lipidlamellen im SC von RHS nach Verlust von Claudinen durch cCPE-Behandlung (Yuki *et al.*, 2013). Die Verkürzung der interzellulären Lipidlamellen ist auch bei AD-Patienten beschrieben worden (Dähnhardt-Pfeiffer *et al.*, 2012). Darüber hinaus konnten Janssens *et al.*

ebenfalls Veränderungen der Lipidlamellen und eine hohe Variabilität zwischen einzelnen Proben von Atopikern zeigen (Janssens *et al.*, 2011).

Um den zugrundeliegenden Mechanismus für die Veränderung der Lipidlamellen aufzuklären, wurde in elektronenmikroskopischen Untersuchungen die Ausschleusung der Lamellar Bodies sowie deren Fusion mit der Zellmembran am Übergang zwischen SG und SC analysiert. Die verfrühte Ausschleusung der LBs im SSP zeugte dabei von einem Verlust der Polarisation innerhalb der Keratinozyten. Der in nicht manipulierten Zellen nur apikal stattfindende Prozess der LB Sekretion war in Claudin-1 KD-Zellen auch basal zu finden. Ähnliche Beobachtungen machten Kirschner et al. in der Epidermis von CD44 KO Mäusen, bei denen auch die Claudin-1 Expression reduziert war. In isolierten murinen CD44 KO Keratinozyten konnte eine unvollständige Polarisierung als Grundlage für diese fehlerhafte LB Sekretion gezeigt werden (Kirschner et al., 2011). Außerdem konnten Mildner et al. in rekonstruierter humaner Haut nach Flg-Verlust eine veränderte LB Bildung beobachten (Mildner et al., 2010). In siRNAbehandelter RHE war nach Claudin-1 KD auch die Fusion der LBs mit der Zellmembran zwischen SG und SC gestört, so dass zu vermuten ist, dass die in ihnen enthaltenen Lipide und Enzyme, die für die korrekte Lipidzusammensetzung und -prozessierung im SC essentiell benötigt werden, nicht oder nur in verringerten Mengen in den Interzellularraum gelangen konnten. Neben den Lipidlamellen im SC könnten durch die fehlerhafte LB Sekretion auch die Lipide des CEs negativ beeinflusst werden, was sich zusätzlich negativ auf die Barrierefunktion der Haut auswirken könnte (Epp et al., 2007, Krieg et al., 2013, Menon et al., 2014).

In Zusammenhang mit dem NISCH-Syndrom wurde ein verdicktes SC beschrieben (Baala *et al.*, 2002, Feldmeyer *et al.*, 2006, Furuse *et al.*, 2002, Hadj-Rabia *et al.*, 2004, Kirchmeier *et al.*, 2014). Dieser Kompensationsversuch der Haut, der auch bei *Ichtyosis vulgaris* beschrieben ist (Kezic und Jakasa, 2016, Sandilands *et al.*, 2009), führt aber nicht zwangsläufig zu einer verbesserten Barrierefunktion. Die beschriebenen Veränderungen der SC-assoziierten Proteine und der SC-Lipide könnten dafür sorgen, dass die Funktionalität der SC-Schichten so stark beeinträchtigt ist, dass auch eine deutlich höhere Anzahl an SC-Schichten die Barrierefunktion

Es ist allerdings zu beachten, dass es auch bei der Behandlung mit der siRNA Kontrolle zu fehlerhaften Fusionen und verkürzten Lipidlamellen kam, die Folgen hier aber weniger stark ausgeprägt waren. Es scheint also durch die Lipid-vermittelte Transfektion bereits zu Problemen in der LB Prozessierung zu kommen. Durch *Knockdown* Studien mit alternativen Ansätzen zur Proteinreduktion in Keratinozyten (z.B. shRNA-vermittelt oder durch CRISPR-Cas) sollte zukünftig eine unspezifische Beeinflussung der Lipide ausgeschlossen werden, um

eindeutig den Zusammenhang zwischen Claudin-1 Level und Lipidsynthese belegen zu können. In sich anschließenden Studien sollte außerdem eine genaue Analyse der Lipidzusammensetzung im SC oder in LBs von RHE mit und ohne Claudin-1 KD z.B. mittels Flüssigchromatographie gekopppelt mit Massenspektrometrie erfolgen. So könnte man auf der einen Seite einen Vergleich zur *in vivo* Situation humaner Epidermis für die weitere Charakterisierung des Modellsystems ziehen und auf der anderen Seite über den Mechanismus, über den Claudin-1 und die SC-Lipide miteinander verbunden sind, Aufschluss bekommen.

Die bis hierhin diskutierten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Claudin-1 ein entscheidender Faktor für die Barrierefunktion humaner Epidermis ist, der dosis-abhängig direkt durch die Beteiligung an funktionellen TJs und indirekt durch Veränderung anderer Hautbarrierebestandteile (wie z.B. dem SC) wirkt.

4.2 CLAUDIN-4 VERLUST BEEINTRÄCHTIGT DIE BARRIEREFUNKTION IN RHE

Der Knockdown von Claudin-4 veränderte die Hautbarriere in RHE. Der signifikant reduzierte TER in Verbindung mit Lor- und Flg-Verlust, lässt dabei ebenfalls auf einen zugrundliegenden das SC-beeinflussenden Mechanismus schließen. Im Vergleich zum Verlust von Claudin-1 war die Expression der SC-assoziierten Proteine hier zum späten Zeitpunkt stärker beeinträchtigt als an Tag 4. Die mRNA Level von Flg und Lor lagen nach Cldn-4 KD außerdem unterhalb derer nach Cldn-1 KD. Dies weist auf einen prominenteren Einfluss auf das SC durch die Reduktion von Claudin-4 hin. Dies zeigen auch erste Tendenzen der Impedanzmessung, nach denen der R^{SC} durch Cldn-4 KD stärker reduziert wurde als durch Cldn-1 KD. Der parazelluläre Widerstand hingegen war tendenziell weniger beeinflusst. Aufgrund von hohen Standardabweichungen und bisher lediglich 2 verwendeten Spendern für die Impedanzmessungen nach Cldn-4 KD sind weitere Messungen nötig, um diese Hypothesen zu verifizieren. Wichtig ist bei diesen Ergebnissen auch zu beachten, dass es gleichzeitig zu einer moderaten Reduktion von Claudin-1 in den Modellen kam, die ebenfalls zur Störung der Gesamtbarriere beiträgt. Andererseits kam es auch nach Cldn-1 KD zu Cldn-4 Verlusten, die wiederum dort einen Einfluss auf die Barriere gehabt haben können. Die nach Cldn-1 KD beobachteten Veränderungen der SC-Proteine könnten dort möglicherweise durch die Reduktion von Cldn-4 an Tag 4 induziert worden sein, höchstwahrscheinlich wurden sie zumindest durch die erniedrigten Cldn-4 Level verstärkt.

Für überflutet kultivierte NHEKs mit Cldn-4 KD sind bisher keine Änderungen in Lokalisation oder Expression von Claudin-1, Ocln und ZO-1 beschrieben worden, aber auch hier reduzierte sich R^{para} nach Cldn-4 Verlust. In diesem Modell wurde außerdem bereits der Nachweis

erbracht, dass Claudin-4 auch die TJ-Barriere für Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ und verschiedene molekulare Tracer bis 4 kDa beeinflusst (Kirschner *et al.*, 2013). Dies ist auch aus der submandibularen Speicheldrüse bekannt, bei der die Barriere für Ionen und Makromoleküle bis 70 kDa deutlich durch die Expression von Claudin-4 gestärkt wird (Michikawa *et al.*, 2008). Die Zugabe von Ochratoxin A, einem Mykotoxin, führte zu einer verringerten Expression von Claudin-4 in NHEKs. Dies resultierte ebenfalls in einem erniedrigten TER und einer erhöhten Permeabilität für einen 4 kDa Tracer (Yuki *et al.*, 2007).

Auf Basis der für Keratinozyten erzeugten Daten verwundert es, dass bei Claudin-4 KO Mäusen kein pathologischer Haut-Phänotyp auftritt. Die Mäuse entwickeln aber in anderen TJenthaltenen Epithelien Auffälligkeiten. So zeigten sie eine erhöhte Anfälligkeit für experimentell induzierte Lungenschädigungen und eine nach etwa 12 Monaten Lebenszeit einsetzende letale Hydronephrose (Fujita et al., 2012, Kage et al., 2014). Außerdem war das Urothel verdickt und der parazelluläre Ionenfluss erhöhte sich für Ca²⁺ und Cl⁻ (Fujita *et al.*, 2012). Die Permeabilität von Alveolarepithelzellen für Ionen wurde durch den Verlust von Cldn-4 hingegen nicht verändert (Kage et al., 2014). Die Anfälligkeit für Lungenschädigungen erst nach einem experimentell gesetzten Reiz könnte dafürsprechen, dass Claudin-4 vor allem wichtig ist für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion eines bereits leicht geschädigten Epithels. Wenn erst durch einen solchen Reiz eine phänotypische Veränderung ausgelöst werden kann, sollte dies auch in der Haut von Cldn-4 KO Mäusen mit mechanischer oder bakterieller Provokation getestet werden, um zu beobachten wie die anschließende Aufrechterhaltung und/oder Wiederherstellung der Barriere unter Claudin-4 Mangel gelingt. Möglicherweise zeigt sich erst im Anschluss daran, dass auch die Hautbarriere in diesen Tieren negativ beeinträchtigt ist. Grundsätzlich ist zur Diskrepanz zwischen den Ergebnissen des Mausmodells und der Zellkulturversuche zu sagen, dass bei genetischer Manipulation im Tier Möglichkeit besteht, dass immer die Kompensationsmechanismen während der Embryonalentwicklung den Verlust eines Proteins ausgleichen. Dies ist bei in vitro Ansätzen kurzfristig nicht im gleichen Maße erreichbar. Auf der anderen Seite könnte allein die Kultivierung in RHE von den Keratinozyten als Reiz wahrgenommen und so die Barrierebeeinträchtigung ausgelöst worden sein.

Für Claudin-4 ist bei AD eine Reduktion in läsionaler Haut beschrieben worden (Bergmann *et al.*, in Vorbereitung, Gruber *et al.*, 2015). Eine Hochregulation in nicht-läsionaler Haut wie sie auch nach mechanischer Zerstörung des SC beobachtet wird, wird als Rettungsmechanismus für die Barriere diskutiert (Baek *et al.*, 2013, Bergmann *et al.*, in Vorbereitung, Gruber *et al.*, 2015, Kirschner *et al.*, 2013). Dieses Rettungssystem ist auch in anderen Organen beschrieben.

So kommt es bei akuter Lungeninsuffizienz zu einer erhöhten Cldn-4 Expression (Wray *et al.*, 2009).

Untersuchungen der SC-Lipide und zur Sekretion von LBs in RHE mit Cldn-4 KD sollten dieser Arbeit folgen, um Ähnlichkeiten und Unterschiede zum Verlust von Cldn-1 herausstellen zu können.

4.3 UNTERSCHIED ZWISCHEN DEN EFFEKTEN NACH KNOCKDOWN UND TARGETING

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der untersuchten Claudine nach *Knockdown* während der Bildung der Hautbarriere zu großen Verlusten in der Funktion führt. Alternativ wurde ein Ansatz gewählt, bei dem die Claudine durch die Bindung von cCPE-Varianten nachträglich aus den TJs entfernt wurden, um so den kurzfristigen Effekt von Veränderungen in TJs auf die Gesamtbarriere zu zeigen. Der Vergleich der Effekte von KD und *Targeting* zeigt eindeutig, dass ein Fehlen der Claudine während der Barrierebildung bzw. Regeneration einen stärkeren Einfluss auf die Hautbarriere hat, aber auch die nachträgliche Entfernung der TJ-Proteine die Barrierefunktion maßgeblich beeinträchtigt.

Während dieser Arbeit zeigte sich die signifikante Schwächung der epidermalen Barriere durch den Verlust der Claudine in RHE nach Behandlung mit cCPE sowohl für die Ionen- als auch für die außen-nach-innen Barriere (LY Permeabilität) zum frühen, aber nicht zum späten Zeitpunkt (Abbildung 3-28). Die Behandlung mit WT-cCPE entfernt Cldn-3, -4, -6, -7, -8, -14 und mit deutlich geringerer Affinität Cldn-1 aus TJs (Veshnyakova et al., 2010). Dass dies die parazelluläre Barriere für Ionen und Makromoleküle beeinträchtigt, konnte bereits verschiedentlich gezeigt werden (Kondoh et al., 2005, Sonoda et al., 1999, Yuki et al., 2013). Die Beeinträchtigung der RHE zum frühen Zeitpunkt passt zu den Ergebnissen aus rekonstruierter humaner Haut, die Yuki et al. 2012 publizierten. Dort wurden zu Beginn der SC-Entstehung, was in diesem Testsystem an Tag 7 der ALI-Kultivierung lag, 10 oder 50 µg/ml cCPE zum Medium gegeben. Nach 4tägiger Inkubation mit cCPE wurde eine signifikant erhöhte LY Permeabilität gemessen. Im SC wurden außerdem morphologische und biochemische Veränderungen gefunden. So hatten die Korneozyten eine veränderte Form und der pH-Wert war erhöht (Yuki et al., 2013). Änderungen im SC aufgrund von cCPE sind auch im während dieser Arbeit verwendeten RHE-Modell nicht auszuschließen und sollten in weiteren Studien analysiert werden, aber die kürzere Inkubationszeit und der Beginn der Behandlung nach Entstehung mehrerer funktioneller SC-Schichten macht große Effekte unwahrscheinlich.

Das *Targeting* mit der Cldn-1 affineren cCPE-Mutante SSS, die an Claudin-1 bis -9 bindet und daher einen starken Barriere-schwächenden Effekt haben sollte (Protze *et al.*, 2015, Takahashi

et al., 2012), führte an Tag 4 zu einer signifikanten Reduktion des TER und der LY Permeabilität. Dieser Effekt war im Vergleich zu WT-cCPE erhöht, was auf einen entscheidenden Beitrag des hier stärker gebundenen Claudin-1 schließen lässt. Die an Tag 8 signifikant niedrigeren TER-Werte zeigen, dass der Verlust von Claudinen aus den TJs die Ionenbarriere trotz gut entwickeltem SC beeinträchtigt.

Für Claudin-4 konnte durch die Behandlung mit der cCPE-Mutante LSID, die primär Cldn-4 bindet (Veshnyakova *et al.*, 2012), kein entscheidender Einfluss auf die Barrierefunktion gezeigt werden. Während der KD den TER zu beiden Zeitpunkten drastisch senkte, zeigte die nachträgliche Entfernung trotz guter Expressionsmengen (C_T-Wert ca. 23) keinen Einfluss auf die allgemeine Ionenbarriere und nur an Tag 4 eine leichte Steigerung der Permeabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Möglicherweise war Cldn-4 in RHE nicht für die Mutante zugänglich oder sie war nicht voll funktionsfähig. Die Barrierestörung nach KD könnte aber auch hauptsächlich mit den bereits oben beschriebenen Effekten auf die Expression von SC-assoziierten Proteinen (vgl. Kapitel 4.2), nicht aber mit dem absoluten Cldn-4 Level an TJs zusammenhängen.

Die Tatsache, dass die Effekte an Tag 8 schwächer waren als an Tag 4, obwohl die cCPE-Mutanten basal appliziert wurden und somit nicht vom reifen SC aufgehalten wurden, könnte auf der einen Seite eine schlechtere Zugänglichkeit der Claudine im mehrschichtigen Epithel widerspiegeln. Denn wenn die extrazellulären Schleifen der Claudine in TJs bereits in *trans*-Interaktionen involviert sind, kann cCPE aus sterischen Gründen vermutlich nur an freie Claudine binden (Krause *et al.*, 2015). Da gezeigt werden konnte, dass der Effekt nach Claudin-1 KD dosis-abhängig war, wäre es für zukünftige Untersuchungen spannend, quantifizieren zu können, wie viele der Claudin-Moleküle in TJs durch die Behandlung mit verschiedenen cCPEs entfernt bzw. in ihrer Funktion behindert werden. Denn durch die insgesamt gestiegene Claudin-Menge an Tag 8 könnte eine höhere Konzentration von cCPE nötig sein, um das gleiche Verhältnis von Claudin- und cCPE-Molekülen und damit den gleichen Effekt wie zum frühen Zeitpunkt erreichen zu können. Auf der anderen Seite könnte der reduzierte Effekt eine insgesamt weniger starke Beteiligung der TJs an der Hautbarriere bei intaktem SC dokumentieren. Dies passt auch zu den Daten nach Cldn-1 KD, die zum späten Zeitpunkt weniger starke Korrelationen zwischen Gesamtbarriere und Claudin-1 Level zeigten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass Claudine eine entscheidende Rolle für die TJ-Integrität und Barrierefunktion in humaner Epidermis spielen. Auch die kurzzeitige Entfernung einzelner Claudine führt zur Öffnung der TJs in der Epidermis. Modulationen durch spezifische cCPE- Mutanten könnten zukünftig bei der Applikation von Medikamenten dazu genutzt werden, eine bessere Zugänglichkeit der Epidermis zu erreichen.

4.4 CLAUDIN-1 VERLUST INDUZIERT EINE KERATINOZYTEN-AUTONOME ENTZÜNDUNGSREAKTION UND BEGÜNSTIGT DIE INFLAMMATION BEI BAKTERIELLER KOLONISATION

Wie bereits in vorhergehenden Kapiteln beschrieben, existieren im Kontext von Atopischer Dermatitis und der damit einhergehenden Einschränkung der Barrierefunktion bereits einige Daten bezüglich der Expression von Claudin-1. Neben den Unterschieden zwischen dem Expressionslevel von Claudin-1 in läsionaler und nicht-läsionaler Haut wurde kürzlich publiziert, dass AD-Patienten eine Korrelation zwischen den Claudin-1 Leveln und einer erhöhten Anzahl von Makrophagen in läsionaler Haut aufweisen (Tokumasu *et al.*, 2016). Außerdem wurde im murinen Mausmodell mit unterschiedlichen Claudin-1 Leveln ein dosisabhängiger Effekt auf verschiedene Merkmale der Inflammation wie z.B. den Anstieg der IL- 1β Expression gezeigt (Tokumasu *et al.*, 2016).

Auf Basis dieser Daten ist eine Relevanz von Claudin-1 für die Inflammationsreaktion bei AD sehr wahrscheinlich und so wurde der Einfluss verschiedener Claudin-1 Level auf die Entzündungsreaktion im humanen System im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

In der Tat hat der KD von Claudin-1 in RHE an Tag 4 dosis-abhängig eine Keratinozytenautonome Steigerung der IL-1 β Expression induziert. Dieses pro-inflammatorische Cytokin spielt bei der Pathogenese von AD eine entscheidende Rolle. Durch die Barrierestörung bei AD werden Keratinozyten dazu angeregt, Chemokine und Cytokine der angeborenen Immunantwort wie z.B. IL-1 β , IL-33 und Thymisches stromales Lymphopoietin (TSLP) zu exprimieren. Diese können wiederum die Immunantworten von dendritischen Zellen und Th2-Helferzellen aktivieren, was zu einer erhöhten Produktion von IL-4 und -13 sowie Immunglobulin E (IgE) durch B-Lymphozyten führt (Punnonen et al., 1997, Weidinger et al., 2018). Als Antwort auf die Cytokine IL-4, -13 und - 25 bzw. IL-4 oder -33 wurde in NHEKs eine reduzierte Expression von Flg beschrieben, die die Hautbarriere zusätzlich negativ beeinträchtigt (Pellerin et al., 2013, Seltmann et al., 2015). Die Inkubation mit IL-4 und/oder -13 reduzierte die Expression von Lor und Inv (Kim et al., 2008). In einer Studie an RHE-Modellen führte die Stimulation mit IL-4 und -13 zur einer Reduktion von Proteinen der epidermalen Differenzierung (u.a. Lor, Inv, TGM-1, Caspase 14) und von TJ-Proteinen (Cldn-1, Cldn-4, Ocln) (Niehues et al., 2017). Auch nach Behandlung mit IL-4, -13 und -31 konnte in RHE eine Reduktion von Claudin-1 beobachtet werden (Gruber et al., 2015). In einem weiteren RHE-Modell konnte auch ein Einfluss von IL-4 auf die Ceramid-Zusammensetzung des SCs nachgewiesen werden (Sawada *et al.*, 2012).

Um nicht außer Acht zu lassen, dass möglicherweise nicht der Claudin-1 Verlust allein, sondern auch die der Methode geschuldete Provokation der Keratinozyten und dadurch induzierte IL- 1β Erhöhung der Auslöser und nicht nur Multiplikator für die in RHE mit Cldn-1 KD beobachtete Barriereschwächung ist, sollte zum einen die zeitliche Entwicklung der Cytokin-Expression genauer untersucht werden. Zum anderen sollte dieser indirekte Zusammenhang in IL- 1β -defizienten Modellen analysiert werden. Hierfür eigneten sich z.B. IL- 1β -defiziente Mäuse, bei denen die lokale Inflammationsreaktion unterdrückt ist (Fantuzzi und Dinarello, 1996).

Der durch die gestörte Barriere in AD Läsionen begünstigte Eintritt von Pathogenen sorgt für eine erhöhte Rekrutierung von Makrophagen an den Ort der Inflammation. Diese initiieren und regulieren u.a. durch die Ausschüttung von IL-1 β die Abwehrreaktionen des Körpers und tragen so ebenfalls zu den erhöhten IL-1 β Leveln bei AD bei (Kasraie und Werfel, 2013, Valledor *et al.*, 2010). Auch die Histamin-Ausschüttung der Mastzellen, die durch den vermehrten Eintritt von Allergenen und die dadurch gestiegenen IgE-Level induziert wird, ist in den Teufelskreis der AD involviert (Weidinger *et al.*, 2018). Der durch Histamin ausgelöste Juckreiz führt zu einer erneuten Verletzung des SC und die Barriere wird zusätzlich geschwächt. Die erhöhten Histaminlevel bei Entzündung beeinflussen aber auch die TJs. Die Gabe von Histamin führte in RHS zu einem Verlust von Cldn-1, -4, Ocln und ZO-1 und zu einer damit einhergehenden erhöhten Permeabilität für ein 557 Da großes Tracermolekül (Gschwandtner *et al.*, 2013).

Wenn also die Barriere durch die von Claudin-1 ausgelösten Entzündungsreaktionen gestört wird, kommt es im Umkehrschluss erneut zu erhöhter Penetration von Allergenen und entzündungsauslösenden Substanzen sowie zu Veränderungen der Barriere-assoziierten Proteine und der Teufelskreis der AD schließt sich. Nicht nur die Inflammation kann folglich eine Reduktion von Claudin-1 und damit eine Barrierestörung auslösen, sondern auch die Claudin-1 Reduktion selbst kann offenbar Startpunkt der Inflammation durch gesteigerte IL-1 β Expression sein und so die Pathogenese der AD verschlimmern. Der Schweregrad der Krankheit konnte bei AD-Patienten mit erhöhten IL-1 β Leveln im Blutserum korreliert werden (Nutan *et al.*, 2012).

Während man an Tag 4 in RHE eine dosis-abhängige Erhöhung der Cytokin-Expression sah, ergab sich an Tag 8 kein verändertes IL-1 β Level mehr nach Cldn-1 KD. Auch im murinen System konnten Tokumasu *et al.* zeigen, dass in der Haut von 1-2 Wochen alten in spezifischpathogen freier Umgebung aufgezogenen Mäusen mit Claudin-1 KD die IL-1 β Level erhöht waren, während sich in adulten Mäusen keine Veränderungen der Expression zeigten (Tokumasu *et al.*, 2016). Da bei Patienten mit AD auch in chronischen Phasen der Erkrankung erhöhte IL-1 β Level auftreten (Szegedi *et al.*, 2015), ist es wahrscheinlich, dass dann kein Keratinozyten-autonomer Effekt, sondern entweder die Interaktion von Keratinozyten mit Immunzellen oder die Reaktion auf vermehrt einwandernde Allergene und/oder Pathogene für die späte IL-1 β Expression verantwortlich sind (Renne *et al.*, 2010). Dabei spielt möglicherweise NLRP3 (von engl. *nucleotide-binding domain like receptor protein*) eine entscheidende Rolle. Für durch Nickel ausgelöste Kontaktdermatitis wurde beispielsweise beschrieben, dass das Allergen von NLRP3 in der Epidermis erkannt und so das Inflammasom aktiviert wird, was in einer Sekretion von IL-1 β kulminiert (Li und Zhong, 2014). Die Aktivierung des Inflammasoms kann auch durch Pathogene geschehen und so eine Verschlimmerung der Dermatitis auslösen (Abramovits *et al.*, 2013, Krause *et al.*, 2012).

Simanski *et al.* konnten allerdings zeigen, dass nur die Sekretion, nicht aber die Expression von IL-1 β in Keratinozyten nach Infektion mit *S. aureus* von den Inflammasom-Komponenten Caspase-1 und ASC (*apoptosis- associated speck-like protein containing a Caspase recruitment domain*) abhängig ist (Simanski *et al.*, 2016). IL-1 β spielt bei der Verteidigung gegen *S. aureus* eine wichtige Rolle. In HaCaT Zellen konnte gezeigt werden, dass IL-1 β die Zellen vor der von *S. aureus* sekretierten Protease V8 und den durch sie ausgelösten Zellschäden schützt, es aber dennoch zu einer Reduktion von Claudin-1 kommt (Wang *et al.*, 2017). Auf der anderen Seite zeigte sich in IL-1 β -defizienten Mäusen, dass die Inflammasom-vermittelte Produktion von IL-1 β entscheidend für die Rekrutierung von Neutrophilen und die Vermeidung von Hautläsionen ist (Miller et al 2007). Daher ist zu vermuten, dass auch der Claudin-1 abhängige Anstieg der Cytokin-Expression in Hinblick auf die häufigen bakteriellen Infektionen bei AD Patienten von großer Bedeutung ist.

Anders als in den Modellen, in denen allein die Reaktion auf den Cldn-1 KD in Bezug auf die IL-1 β -Expression untersucht wurde, ergab sich in den für die Analysen im Kontext bakterieller Kolonisation verwendeten NaCl-Kontrollmodellen auch an Tag 8 eine erhöhte Cytokin-Expression nach KD mit siRNA No8 (vgl. Abbildung 3-22 und Abbildung 3-23). Dies könnte eine Reaktion auf die zusätzliche Behandlung mit NaCl-Lösung sein, die als Lösungsmittelkontrolle diente. Daher darf man nicht außer Acht lassen, dass offenbar schon geringe Manipulationen in RHE mit durch Cldn-1 KD geschwächter Barriere zu einer gesteigerten IL-1 β -Expression führen und die hier beobachteten Ergebnisse nicht ausschließlich Cldn-1 abhängig sein müssen.

Das Mikrobiom von AD Patienten ist oft deutlich zu Gunsten von *S. aureus* verschoben (Kong *et al.*, 2012). Ob dies primär der Auslöser von AD oder ein sekundärer Effekt durch die Barrierestörung und erhöhte Immunantwort ist, ist bisher unklar (Weidinger *et al.*, 2018). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine vorausgegangene Barriereschwächung durch Claudin-1 Verlust die Reaktion der Keratinozyten im Kontext von bakterieller Besiedelung verändert. Dabei wurde *S. aureus* als Vertreter der pathogenen Bakterien gewählt, während *S. carnosus* als Beispiel für die Besiedelung mit apathogenen Bakterien diente. Dieser bietet sich an, weil er anders als der sonst häufig verwendete *S. epidermidis*, der opportunistisch-pathogen ist, fast keine Virulenzfaktoren bildet und so die Möglichkeit bietet, den Effekt auf nichts anderes als die Kolonisation zu begutachten (Löfblom *et al.*, 2017).

Es zeigte sich eine erhöhte IL-1 β -Expression in RHE nach Infektion mit *S. aureus*, die aber weder zum frühen noch zum späten Zeitpunkt vom Claudin-1 Level abhängig war. Die Infektion mit *S. carnosus* führte ebenfalls zu einer erhöhten Cytokin-Expression, die an Tag 8 zusätzlich eine Abhängigkeit von der Cldn-1 Expression zeigte.

Die Hautbarriere von RHE zeigte an Tag 4 eine Beeinträchtigung durch *S. aureus* in WT- und siRNA Ktrl-RHE, aber es kam zu keinem additiven Effekt in Modellen mit Claudin-1 KD. Zum späten Zeitpunkt war keine Beeinträchtigung der Barriere mehr sichtbar. Die Infektion mit *S. carnosus* hingegen reduzierte die Barrierefunktion an Tag 8 nur sehr leicht in WT-RHE.

Dass eine zusätzliche deutliche Beeinträchtigung der Gesamtbarriere und der außen-nach-innen Barriere im hier verwendeten Modell ausblieb, könnte daran liegen, dass der Cldn-1 KD die Barriere bereits so stark beeinträchtigt hat, dass eine Infektion diesen Effekt nicht noch steigern kann. Im Zusammenhang mit *S. aureus* ist außerdem bereits bekannt, dass die Barriereschwächung dort mit einer Internalisierung von Cldn-1 und Cldn-4 an TJs in NHEKs und RHE bzw. mit einer Reduktion von Cldn-1 in Haut einhergeht (Bäsler *et al.*, 2017, Ohnemus *et al.*, 2008). Der KD-induzierte vorgelagerte Verlust der Claudine könnte diesen Angriffspunkt offenbar entschärft haben.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine durch den Verlust von TJ-Proteinen geschwächte Hautbarriere anfälliger ist für eine Bakterien-induzierte Inflammation und in der Folge auch nicht-pathogene Keime ohne Virulenzfaktoren eine verstärkte Inflammationsreaktion in der Haut auslösen können. Dieser Effekt kann sich dann erneut negativ auf die Barrierefunktion auswirken.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Reduktion von Claudin-1 die Expression des pro-inflammatorischen Cytokins IL-1 β induziert, das Auftreten von Inflammationsreaktionen in Gegenwart von Staphylokokken (auch apathogenen) begünstigt und somit zum Teufelskreis

der AD beiträgt. Dies macht das TJ-Protein zu einem potentiellen zukünftigen Ansatzpunkt für die AD-Therapie.

4.5 AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Expression von einzelnen TJ-Proteinen der Claudin-Familie nicht nur für die Funktion von TJs selber von essentieller Bedeutung ist, sondern durch sie auch andere Barriere-assoziierte Prozesse in humaner Haut beeinflusst werden. Das hier verwendete Modell und seine Charakterisierung bilden eine ideale Grundlage für zukünftige Studien, die sich tiefergehend mit den folgenden Aspekten beschäftigen sollten: Claudin-1 sollte als potentielles *target* in der AD-Therapie noch genauer charakterisiert werden. Interessant wäre es dafür, das Claudin-1 Proteinlevel genau quantifizieren zu können, um einen absoluten Grenzwert bestimmen zu können, der für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion in humaner Epidermis nötig ist. Mögliche Ansätze könnten Quantifizierungen mittels Enzymelinked Immunosorbent Assay oder Western Blots mit genau definierten Mengen rekombinanten Proteins oder HPLC-Analysen gekoppelt mit der Massenspektrometrie beinhalten. Außerdem sollten die Claudin-Claudin-Interaktionen und ihre Relevanz für die Aufrechterhaltung der Barriere genauer untersucht werden. Mit Claudin-1 spezifischen cCPE-Mutanten und Claudin-Mimetikpeptiden könnte man den Einfluss auf die TJ-Barriere auf der einen und auf die weiteren Barrieren auf der anderen Seite durch akkurate Modulationen noch spezifischer analysieren (Zwanziger et al., 2012). Insbesondere spezifische Untersuchungen zur Lipidzusammensetzung des SCs sollten erfolgen, um die Auswirkungen der gegenseitigen Beeinflussungen im Teufelskreis der AD verstehen zu lernen.

Erste Ansätze, die auf die Erhöhung der Cldn-1 Mengen in Haut als Therapieansatz bei AD zielen, wurden bereits publiziert. So zeigte die topische Applikation von Bortezomib, einem Proteasom-Inhibitor, der zur Therapie des multiplen Myeloms eingesetzt wird, in HaCaT-Zellen und einem murinen AD-Modell eine Claudin-1 steigernde Wirkung, die in den Mäusen mit einer Linderung der AD-Symptome einherging (Kim *et al.*, 2017). Der zugehörige Wirkmechanismus hängt damit zusammen, dass Cldn-1 nicht mehr im Ubiquitin-Proteasom abgebaut wird und es zur Inhibition von NF-κB kommt. Ein weiterer Ansatz zur Therapie von AD, der zukünftig relevant werden könnte, ist der Einsatz von Calycosin. Dieses Isoflavonoid des Extraktes aus der Astragaluswurzel (*Radix Astragali*) ist in der chinesischen Medizin zur Behandlung von Entzündungen schon lange bekannt. Es inhibiert die Expression pro-inflammatorischer Cytokine, so dass Inflammationsreaktionen verhindert werden (Gao *et al.*, 2014). Jia *et al.* konnten *in vitro* (in HaCaT-Zellen) und *in vivo* (in der Maus) nachweisen, dass durch die Behandlung neben Cldn-1 auch Ocln und ZO-1 stärker exprimiert werden (Jia *et al.*,

2018). Zukünftige Studien sollten analysieren, ob dies auch mit einer Verbesserung der Barrierefunktion einhergeht.

Eine Überprüfung weiterer Inflammationsmarker (IL-4, IL-13, Il-33, u.a.) könnte zusätzliche Erkenntnisse über die Rolle der Claudine in der Initiierung der Keratinozyten-autonomen Inflammationsreaktion liefern. Außerdem wäre es spannend, die Auswirkungen einer nachträglichen Entfernung von Claudinen aus den TJs durch cCPE mit bakterieller Infektion zu kombinieren, um Rückschlüsse auf den kurzfristigen Effekt der TJ-Störung begutachten zu können.

Im Übrigen wäre auch eine Analyse der beteiligten Signalwege interessant. Dafür kommt u.a. der PKC-MAPK-NF-κB Signalweg in Frage, von dem bereits bekannt ist, dass er TJ-Proteine und die Barrierefunktion in verschiedenen Organen und Zellen beeinflusst (Takano *et al.*, 2014).

Ein limitierender Faktor des während dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbaus war wie in vielen ähnlichen Studien die begrenzte Verfügbarkeit von Probenmaterial und die Generierung einer gleichbleibend stabilen Reduktion des Zielproteins. Als alternativer Ansatz könnte daher auf der einen Seite zukünftig die Verwendung anderer Transfektionsreagenzien oder anderer Knockdown Methoden in Betracht gezogen werden. Die Verwendung von shRNA wurde im Rahmen der Modelletablierung während dieser Arbeit in Betracht gezogen, konnte aber in RHE keinen Vorteil bringen und wurde daher verworfen. Auch CRISPR-Cas9 (von engl. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated protein 9, dt. etwa: gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen und CRISPRassoziiertes Protein 9) könnte als alternativer Ansatz zur Veränderung der Genexpression herangezogen werden, um Keratinozyten mit vollständigem und dauerhaftem Verlust von Claudinen herzustellen oder um Mutationen in die DNA einzubringen, so dass die Funktion von Claudinen ganz oder teilweise beeinträchtigt wird (Liang et al., 2015, Mali et al., 2013). Für diesen Ansatz wäre die Verwendung von N/TERT-Zellen alternativ zu primären Keratinozyten nötig. Diese immortalisierten Keratinozyten bilden gute Epidermismodelle mit normaler Differenzierung und SC und sind für langwierige serielle Passagen und Selektionen in der Zellkultur gut geeignet (Smits et al., 2017). Auch Methoden, die eine zeitlich verzögerte Induktion des Knockdowns ermöglichen (z.B. durch IPTG (isopropyl-ß-D-thio-galactoside)oder Tetrazyklin-induzierbare Vektoren), sollten in Betracht gezogen werden, könnten sie doch die Analyse der Auswirkungen von reduzierten Claudin-Leveln zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Barriereentwicklung zusätzlich vereinfachen (Kappel et al., 2007, Wu et al., 2007).

Spannend wäre es außerdem, Keratinozyten und Hautproben von NISCH-Patienten untersuchen zu können, um den Einfluss des Claudin-1 Verlustes auf die Hautbarriere direkt im menschlichen Organismus aufklären zu können.

Abschließend lässt sich sagen, dass diese Arbeit frühere Erkenntnisse über die Funktion der Tight Junction Proteine Claudin-1 und Claudin-4 in der humanen Hautbarriere wesentlich erweitert. Nachfolgende Studien können hier direkt anschließen und in immer komplexer werdenden Modellsystemen die Ergebnisse validieren und somit für die medizinische Anwendung nutzbar machen.

KURZFASSUNG

Die Tight Junctions sind ein zentrales Element der epidermalen Hautbarriere. Sie bilden eine mechanische Barriere und kontrollieren die parazelluläre Passage von Ionen und molekularen Tracern innerhalb der Epidermis. Claudine haben dabei eine elementare Bedeutung für die Funktionalität der Tight Junction-Barriere. In Mäusen wurde gezeigt, dass der vollständige Verlust von Claudin-1 zu einer letalen Schädigung der Hautbarriere führt und der Verlust von Claudin-1 die Expression des pro-inflammatorischen Cytokins IL-1 β erhöht. Außerdem korreliert die Barrierefunktion in überflutet kultivierten murinen Keratinozyten mit der Expression von Claudin-1. Im humanen Organismus sind Veränderungen der Claudin-1 Expression in der Haut von verschiedenen Erkrankungen, die mit einer Barrierebeeinträchtigung einhergehen, bekannt. Eine dieser Krankheiten ist die Atopische Dermatitis (AD). Bei dieser entzündlichen Erkrankung kommt es wiederholt zur Bildung von Ekzemen, in denen es u.a. zu einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust kommt. Der Schweregrad der Krankheit konnte bei AD-Patienten mit erhöhten IL-1 β Leveln in Zusammenhang gebracht werden.

Bislang fehlte eine Korrelation zwischen der Barrierefunktion und der Expression von Claudin-1 im humanen System. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Claudin-1 Level auf die epidermale Barriere in rekonstruierter humaner Epidermis (RHE) analysiert. Es zeigte sich eine negative Beeinflussung der Barriere für Ionen und für molekulare Tracer durch den Verlust von Claudin-1. Für die Ionenbarriere ergab sich ein linearer Zusammenhang zur Claudin-1 Expression. Die außen-nach-innen und innen-nach-außen Barriere für molekulare Tracer hingegen blieb über einen gewissen Bereich der Claudin-1 Level stabil und zeigte erst bei stärkerem Claudin-1 Verlust eine deutliche Beeinträchtigung. Auf molekularer Ebene ergaben sich durch den Verlust von Claudin-1 Veränderungen in der Expression verschiedener mit dem *Stratum corneum*-assoziierten Strukturproteine sowie in der Morphologie der *Stratum corneum* Lipide.

Darüber hinaus konnte eine Steigerung der IL-1 β Expression in Abhängigkeit des Claudin-1 *Knockdowns* in RHE gezeigt werde. Dies spricht für eine Keratinozyten-autonome Induktion der epidermalen Entzündungsreaktion durch den Verlust von Claudin-1.

Da ein Merkmal der AD die erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit *Staphylococcus aureus* ist, wurde überprüft, ob der Verlust von Claudin-1 auch die Reaktion auf eine bakterielle Kolonisation und die damit einhergehende Barrierebeeinträchtigung verändert. Dabei wurde deutlich, dass der Verlust von Claudin-1 die inflammatorische Umgebung in der Epidermis durch die Expression von IL-1 β sowohl nach Kontakt mit dem pathogenen *S. aureus* als auch

nach Besiedelung durch den apathogenen *S. carnosus* verstärkt. Hinsichtlich der Barrierefunktion kam es hingegen nicht zu einer additiven negativen Beeinflussung.

Claudin-4 ist ein weiteres prominentes Tight Junction-Protein. Auch hier führte der Verlust des Proteins zu einem reduzierten transepithelialen elektrischen Widerstand. Außerdem kam es im Vergleich zur Claudin-1 Reduktion zu stärker verminderten Expressionsleveln verschiedener Strukturproteine des *Stratum corneums*.

Als Alternative zur langfristigen Reduktion der untersuchten Claudine mittels siRNA-Transfektion im Prozess der Barrierebildung, wurde durch *Targeting* der Proteine mit verschiedenen Mutanten der c-terminalen Domäne von *Clostridium perfringens* Enterotoxin (cCPE) eine kurzfristige Entfernung aus funktionellen TJs erreicht. Die Behandlung mit dem cCPE-Wildtyp führte zu einer deutlichen Erhöhung der parazellulären Passage von Ionen und einem molekularen Tracer in RHE. Die Applikation der cCPE-Mutante S305P/S307R/S313H (SSS), die eine höhere Affinität zu Claudin-1 hat, verstärkte diesen Effekt, während die Claudin-4 affinere cCPE-Mutante cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A (LSID) die Barrierefunktion kaum veränderte.

Es lässt sich daher zusammenfassend festhalten, dass Claudin-1 und Claudin-4 wichtige Funktionen in der Hautbarriere einnehmen, sich ein Verlust aber unterschiedlich auf die Barrierekomponenten Tight Junctions und *Stratum corneum* auswirkt. Der Effekt von Claudin-4 manifestiert sich lediglich bei langfristigem Mangel während der Barrierebildung, wohingegen bei Claudin-1 auch die nachträgliche kurzfristige Entfernung des Proteins aus den Tight Junctions zu erheblichen Einbußen in der Hautbarriere führt. Darüber hinaus ist Claudin-1 in die Inflammationsreaktion der Haut involviert und bietet sich daher als potentieller zukünftiger Ansatzpunkt für die AD-Therapie an.

ABSTRACT

Tight junctions are an essential component of the epidermal skin barrier. They provide mechanical barrier function and thereby control the paracellular passage of ions and solutes within the epidermis. Claudins play a major role for the functionality of the tight junction barrier. In mice, complete loss of claudin-1 leads to a lethal impairment of the skin barrier and reduction of claudin-1 increases the expression of the pro-inflammatory cytokine IL-1 β . Additionally, the barrier function of submerged murine keratinocytes is correlated with the expression of claudin-1. Alterations of the claudin-1 expression in human skin are known from different skin diseases which show decreased barrier function. Atopic dermatitis (AD), a chronic inflammatory disease with relapsing eczematous eruptions showing increased transepidermal water loss, is one of them. Severity of AD could be correlated with augmented expression of IL-1 β .

Up to now, a correlation of barrier function and expression of claudin-1 in humans was missing. Hence, the influence of different claudin-1 levels on the epidermal barrier was analysed in reconstructed human epidermis (RHE) within this study. The barrier to ions (i.e. transepithelial electrical resistance, TER) as well as the barrier to molecular tracers was negatively affected by claudin-1 knock-down. TER exhibited a linear correlation with the expression of claudin-1. Outside-to-inside and inside-to-outside penetration of molecular tracers was stable within a certain range of claudin-1 levels and only a stronger loss of claudin-1 increased it. On a molecular level, claudin-1 loss resulted in changes of the expression of *stratum corneum* associated structural proteins as well as altered morphology of *stratum corneum* lipids.

Additionally, a claudin-1 knock-down-dependent increase of the IL-1 β expression was observed in RHE. This indicates a keratinocyte-autonomous induction of the inflammatory epidermal response due to the loss of claudin-1.

Because AD patients often suffer from infections with *Staphylococcus aureus*, it was tested whether the reduction of claudin-1 influences the reaction to bacterial colonisation and the connected barrier impairment. Indeed, diminished claudin-1 levels led to an enhancement of the inflammatory environment via IL-1 β expression when combined with the application of the pathogenic *S. aureus* or the apathogenic *S. carnosus*. However, barrier function showed no additional negative damage.

Claudin-4 is another prominent tight junction protein. Its loss led also to reduced TER. The alterations in the expression of structural *stratum corneum* proteins in RHE were more intense due to claudin-4 deficiency than after loss of claudin-1.

As an alternative to decreasing the expression of claudins via siRNA during the process of barrier assembly, targeting of the proteins with the c-terminal domain of *Clostridium perfrigens* enterotoxin (cCPE) can remove them temporary from functional tight junctions. Treatment of RHE with wildtype cCPE increased the paracellular passage of ions and a molecular tracer. Applying the cCPE-mutant S305P/S307R/S313H (SSS) which exhibits a higher affinity to claudin-1 clearly augmented this effect. The cCPE-variant cCPE-L254A/S256A/I258A/D284A (LSID) showing higher affinity to claudin-4 changed the barrier function only slightly.

In conclusion, claudin-1 and claudin-4 fulfill important functions within the skin barrier but their loss influences the skin barrier differently via the components of tight junctions and *stratum corneum*. Whereas the effect of low claudin-4 levels only manifests in the course of long-term absence during barrier assembly, also short-term removal of claudin-1 from tight junctions leads to substantial damage of the skin barrier. As claudin-1 is further involved in the epidermal inflammatory response it could be a target for AD therapy in future.

PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

in Vorbereitung

Bergmann, S., von Bünau, B., Vidal-y-Sy, S., Haftek, M., Wladykowski, E., Houdek, P., Lezius, S., Duplan, H., Bäsler, K., Dähnhardt-Pfeiffer, S., Gorzelanny, C., Schneider, S.
W., Rodriguez, E., Stölzl, D., Weidinger, S., Brandner, J. M., *Claudin-1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions*.

veröffentlicht

Bäsler, K., Galliano, M., Bergmann, S., Rohde, H., Wladykowski, E., Vidal-y-Sy, S., Guiraud, B., Houdek, P., Schüring, G., Volksdorf, T., Caruana, A., Bessou-Touya, S., Schneider, S. W., Duplan, H., Brandner, J. M. (2017), *Biphasic influence of Staphylococcus aureus on human epidermal tight junctions*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1405: 53-70. doi:10.1111/nyas.13418

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Schematischer Querschnitt humaner Haut
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Aufbaus humaner Epidermis (A) und Lokalisation von
Differenzierungsmarkern und Tight Junction Proteinen in humaner Epidermis (B)14
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Hauptkomponenten von Tight Junctions.
Abbildung 1-4: Schematisches Modell der Claudin-Struktur23
Abbildung 1-5: Schematische Darstellung der verschiedenen epidermalen Hautbarrieren und ihrer Interaktion
mit den Tight Junctions
Abbildung 1-6: Flussdiagramm der Doktorarbeit35
Abbildung 2-1: Verwendeter Proteinstandard "Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder" für SDS-
PAGEs
Abbildung 2-2: Hypothese zum Schaltkreis in rekonstruierter humaner Epidermis für die Zwei-Wege-
Impedanzspektroskopie und Schema zur lokalen Einordnung innerhalb der Epidermis.
Abbildung 3-1: Lokalisation von Differenzierungsmarkern und Hämalaun Eosin (HE)-Färbung in rekonstruierter
humaner Epidermis
Abbildung 3-2: Lokalisation von Occludin und Biotin-556 Stopps in rekonstruierter humaner Epidermis an Tag 4
(A) und Tag 8 (B)
Abbildung 3-3: Einfluss der verschiedenen siRNA-Behandlungen auf das Proteinlevel von Claudin-1 (Cldn-1) in
RHE an Tag 4 bzw. Tag 870
Abbildung 3-4: Korrelation zwischen relativen mRNA- und Proteinleveln an Tag 4 (A) bzw. Tag 8 (B)72
Abbildung 3-5: Boxplots der normierten mRNA-Level nach verschiedenen siRNA-Behandlungen
Abbildung 3-6: Immunfluoreszenzfärbung von Claudin-1 in rekonstruierter humaner Epidermis nach
verschiedenen siRNA-Behandlungen im Vergleich zu unbehandelter RHE (WT) und humaner Haut73
Abbildung 3-7: Ultrastrukturelle Aufnahmen der WT und siRNA-behandelten RHE an Tag 474
Abbildung 3-8: Lokalisation von Differenzierungsmarkern in RHE nach Claudin-1 Knockdown75
Abbildung 3-9: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns auf die Genexpression und das Proteinlevel anderer Tight
Junction-assoziierter Proteine
Abbildung 3-10: Einfluss des Claudin-1 Levels auf den transepithelialen elektrischen Widerstand in RHE an Tag
4
Abbildung 3-11: Ultrastrukturelle Aufnahmen zur Lanthanpenetration an Tag 4 in RHE nach Claudin-1
Knockdown im Vergleich zu siRNA-behandelter RHE80
Abbildung 3-12: Lokalisation von Claudin-1 und Biotin-556 Stopps in rekonstruierter humaner Epidermis und
Tracerpenetration nach Knockdown von Claudin-1 an Tag 481
Abbildung 3-13: Einfluss des Claudin-1 Levels auf die innen-nach-außen Barriere für Biotintracermoleküle
verschiedener Größe an Tag 4
Abbildung 3-14: Einfluss des Claudin-1 Levels auf die außen-nach-innen Barriere an Tag 4
Abbildung 3-15: Einfluss des Claudin-1 Levels auf den transepithelialen elektrischen Widerstand in RHE an Tag
8

Abbildung 3-16: Lokalisation von Claudin-1 und Biotin-556 Stopps in rekonstruierter humaner Epidermis nach
Knockdown von Claudin-1 im Vergleich mit Wildtyp-RHE an Tag 887
Abbildung 3-17: Einfluss des Claudin-1 Levels auf die innen-nach-außen Barriere für Biotintracermoleküle
verschiedener Größe an Tag 8
Abbildung 3-18: Einfluss des Claudin-1 Levels auf die außen-nach-innen Barriere an Tag 8
Abbildung 3-19: Einfluss des Cldn-1 Knockdowns auf die Genexpression und das Proteinlevel von Stratum
corneum-assoziierten Proteinen
Abbildung 3-20: Quantifizierung der Lipidlamellenlänge im Interzellularraum des Stratum corneum in RHE93
Abbildung 3-21: Elektronenmikroskopische Bilder des Areals zwischen Stratum spinosum (SSP) und Stratum
corneum (SC) in RHE an Tag 8
Abbildung 3-22: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns (Cldn-1 KD) auf die Genexpression von IL-1 eta in RHE im
Vergleich zu WT- und siRNA-Kontrollen an Tag 4 und Tag 895
Abbildung 3-23: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns (Cldn-1 KD) und der Infektion mit Staphylokokken auf die
Genexpression von IL-1β in RHE97
Abbildung 3-24: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns (Cldn-1 KD) und der Infektion mit Staphylokokken auf den
transepithelialen elektrischen Widerstand in RHE98
Abbildung 3-25: Einfluss des Claudin-1 Knockdowns (Cldn-1 KD) und der Infektion mit Staphylokokken auf die
außen-nach-innen Barriere in RHE100
Abbildung 3-26: Einfluss des Knockdowns von Claudin-4 auf die Genexpression verschiedener Barriere-
assoziierter Proteine und auf den transepithelialen elektrischen Widerstand in RHE
Abbildung 3-27: Impedanzmessung in RHE an Tag 4 und Tag 8 nach Claudin-1 oder Claudin-4 Knockdown im
Vergleich zu WT- und Kontroll-RHE105
Abbildung 3-28: Einfluss von c-terminalen Clostridium perfrigens Enterotoxin Varianten auf den
transepithelialen elektrischen Widerstand (A) und die Lucifer Yellow Permeabilität (B) in RHE

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2-1: Übersicht über verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien	36
Tabelle 2-2: Übersicht über verwendete Chemikalien und Reagenzien.	39
Tabelle 2-3: Übersicht über verwendete Software, deren Anwendung und Hersteller	42
Tabelle 2-4: Übersicht über die verwendeten Antikörper	43
Tabelle 2-5: Verwendete Bakterienstämme	46
Tabelle 2-6: Verwendete siRNAs	47
Tabelle 2-7: Verwendete qPCR-Primer	49

LITERATURVERZEICHNIS

- ABRAMOVITS, W., RIVAS BEJARANO, J. J. & VALDECANTOS, W. C. 2013. Role of interleukin 1 in atopic dermatitis. *Dermatol Clin*, 31, 437-44.
- AKIYAMA, T., NIYONSABA, F., KIATSURAYANON, C., NGUYEN, T. T., USHIO, H., FUJIMURA, T., UENO, T., OKUMURA, K., OGAWA, H. & IKEDA, S. 2014. The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function. *J Innate Immun*, 6, 739-53.
- AMASHEH, S., MEIRI, N., GITTER, A. H., SCHONEBERG, T., MANKERTZ, J., SCHULZKE, J. D. & FROMM, M. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci*, 115, 4969-76.
- ANDERSON, J. M. 2001. Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci*, 16, 126-30.
- ANDERSON, J. M. & VAN ITALLIE, C. M. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a002584.
- ANDERSON, J. M., VAN ITALLIE, C. M. & FANNING, A. S. 2004. Setting up a selective barrier at the apical junction complex. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 140-145.
- ANGELOW, S., AHLSTROM, R. & YU, A. S. 2008. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295, F867-76.
- ASAD, S., WINGE, M. C., WAHLGREN, C. F., BILCHA, K. D., NORDENSKJOLD, M., TAYLAN, F. & BRADLEY, M. 2016. The tight junction gene Claudin-1 is associated with atopic dermatitis among Ethiopians. J Eur Acad Dermatol Venereol, 30, 1939-1941.
- BAALA, L., HADJ-RABIA, S., HAMEL-TEILLAC, D., HADCHOUEL, M., PROST, C., LEAL, S. M., JACQUEMIN, E., SEFIANI, A., DE PROST, Y., COURTOIS, G., MUNNICH, A., LYONNET, S. & VABRES, P. 2002. Homozygosity mapping of a locus for a novel syndromic ichthyosis to chromosome 3q27-q28. *J Invest Dermatol*, 119, 70-6.
- BAEK, J. H., LEE, S. E., CHOI, K. J., CHOI, E. H. & LEE, S. H. 2013. Acute modulations in stratum corneum permeability barrier function affect claudin expression and epidermal tight junction function via changes of epidermal calcium gradient. *Yonsei Med J*, 54, 523-8.
- BARONI, A., BUOMMINO, E., DE GREGORIO, V., RUOCCO, E., RUOCCO, V. & WOLF, R. 2012. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*, 30, 257-62.
- BARRESI, C., STREMNITZER, C., MLITZ, V., KEZIC, S., KAMMEYER, A., GHANNADAN, M., POSA-MARKARYAN, K., SELDEN, C., TSCHACHLER, E. & ECKHART, L. 2011. Increased sensitivity of histidinemic mice to UVB radiation suggests a crucial role of endogenous urocanic acid in photoprotection. J Invest Dermatol, 131, 188-94.
- BÄSLER, K., BERGMANN, S., HEISIG, M., NAEGEL, A., ZORN-KRUPPA, M. & BRANDNER, J. M. 2016. The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release*, 242, 105-118.
- BÄSLER, K. & BRANDNER, J. M. 2017. Tight junctions in skin inflammation. *Pflugers Arch*, 469, 3-14.
- BÄSLER, K., GALLIANO, M. F., BERGMANN, S., ROHDE, H., WLADYKOWSKI, E., VIDAL, Y. S. S., GUIRAUD, B., HOUDEK, P., SCHURING, G., VOLKSDORF, T., CARUANA, A., BESSOU-TOUYA, S., SCHNEIDER, S. W., DUPLAN, H. & BRANDNER, J. M. 2017. Biphasic influence of Staphylococcus aureus on human epidermal tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 1405, 53-70.

- BATISTA, D. I., PEREZ, L., ORFALI, R. L., ZANIBONI, M. C., SAMORANO, L. P., PEREIRA, N. V., SOTTO, M. N., ISHIZAKI, A. S., OLIVEIRA, L. M., SATO, M. N. & AOKI, V. 2014. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol, 29, 1091-5.
- BATISTA, D. I., PEREZ, L., ORFALI, R. L., ZANIBONI, M. C., SAMORANO, L. P., PEREIRA, N. V., SOTTO, M. N., ISHIZAKI, A. S., OLIVEIRA, L. M., SATO, M. N. & AOKI, V. 2015. Profile of skin barrier proteins (filaggrin, claudins 1 and 4) and Th1/Th2/Th17 cytokines in adults with atopic dermatitis. J Eur Acad Dermatol Venereol, 29, 1091-5.
- BERKING, C., TAKEMOTO, R., BINDER, R. L., HARTMAN, S. M., RUITER, D. J., GALLAGHER, P. M., LESSIN, S. R. & HERLYN, M. 2002. Photocarcinogenesis in human adult skin grafts. *Carcinogenesis*, 23, 181-7.
- BIKLE, D. D. & PILLAI, S. 1993. Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocr Rev*, 14, 3-19.
- BIKLE, D. D., XIE, Z. & TU, C. L. 2012. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 7, 461-472.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- BRAFF, M. H., BARDAN, A., NIZET, V. & GALLO, R. L. 2005. Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol*, 125, 9-13.
- BRANDNER, J. M. 2009. Tight junctions and tight junction proteins in mammalian epidermis. *Eur J Pharm Biopharm*, 72, 289-94.
- BRANDNER, J. M., KIEF, S., GRUND, C., RENDL, M., HOUDEK, P., KUHN, C., TSCHACHLER, E., FRANKE, W. W. & MOLL, I. 2002. Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur J Cell Biol*, 81, 253-63.
- BRANDNER, J. M., KIEF, S., WLADYKOWSKI, E., HOUDEK, P. & MOLL, I. 2006. Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol Physiol*, 19, 71-7.
- BRANDNER, J. M., ZORN-KRUPPA, M., YOSHIDA, T., MOLL, I., BECK, L. A. & DE BENEDETTO, A. 2015. Epidermal tight junctions in health and disease. *Tissue Barriers*, 3, e974451.
- BYRD, A. L., BELKAID, Y. & SEGRE, J. A. 2018. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*, 16, 143-155.
- CANDI, E., SCHMIDT, R. & MELINO, G. 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 328-40.
- CLAUSEN, M. L. & AGNER, T. 2016. Antimicrobial Peptides, Infections and the Skin Barrier. *Curr Probl Dermatol*, 49, 38-46.
- COHEN, J. 1988. Statistical Power Analysis for the Behavioral sciences.
- COLEGIO, O. R., VAN ITALLIE, C., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2003. Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284, C1346-54.
- COLEGIO, O. R., VAN ITALLIE, C. M., MCCREA, H. J., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2002. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283, C142-7.
- CORDING, J., BERG, J., KADING, N., BELLMANN, C., TSCHEIK, C., WESTPHAL, J. K., MILATZ, S., GUNZEL, D., WOLBURG, H., PIONTEK, J., HUBER, O. & BLASIG, I. E. 2013. In tight junctions, claudins regulate the interactions between occludin, tricellulin and marvelD3, which, inversely, modulate claudin oligomerization. *J Cell Sci*, 126, 554-64.

- CORK, M. J., DANBY, S. G., VASILOPOULOS, Y., HADGRAFT, J., LANE, M. E., MOUSTAFA, M., GUY, R. H., MACGOWAN, A. L., TAZI-AHNINI, R. & WARD, S. J. 2009. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol*, 129, 1892-908.
- COYNE, C. B., GAMBLING, T. M., BOUCHER, R. C., CARSON, J. L. & JOHNSON, L. G. 2003. Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 285, L1166-78.
- DÄHNHARDT-PFEIFFER, S., SURBER, C., WILHELM, K. P., DÄHNHARDT, D., SPRINGMANN, G., BOETTCHER, M. & FÖLSTER-HOLST, R. 2012. Noninvasive stratum corneum sampling and electron microscopical examination of skin barrier integrity: pilot study with a topical glycerin formulation for atopic dermatitis. *Skin Pharmacol Physiol*, 25, 155-61.
- DE BENEDETTO, A., RAFAELS, N. M., MCGIRT, L. Y., IVANOV, A. I., GEORAS, S. N., CHEADLE, C., BERGER, A. E., ZHANG, K., VIDYASAGAR, S., YOSHIDA, T., BOGUNIEWICZ, M., HATA, T., SCHNEIDER, L. C., HANIFIN, J. M., GALLO, R. L., NOVAK, N., WEIDINGER, S., BEATY, T. H., LEUNG, D. Y., BARNES, K. C. & BECK, L. A. 2011. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 127, 773-86 e1-7.
- DENECKER, G., OVAERE, P., VANDENABEELE, P. & DECLERCQ, W. 2008. Caspase-14 reveals its secrets. *J Cell Biol*, 180, 451-8.
- DOUCET, J., POTTER, A., BALTENNECK, C. & DOMANOV, Y. A. 2014. Micron-scale assessment of molecular lipid organization in human stratum corneum using microprobe X-ray diffraction. *J Lipid Res*, 55, 2380-8.
- DOWNING, D. T. 1992. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res*, 33, 301-13.
- ECKHART, L., DECLERCQ, W., BAN, J., RENDL, M., LENGAUER, B., MAYER, C., LIPPENS, S., VANDENABEELE, P. & TSCHACHLER, E. 2000. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol*, 115, 1148-51.
- ECKHART, L., LIPPENS, S., TSCHACHLER, E. & DECLERCQ, W. 2013. Cell death by cornification. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3471-3480.
- ELIAS, P. M. & MENON, G. K. 1991. Structural and Lipid Biochemical Correlates of the Epidermal Permeability Barrier. *In:* ELIAS, P. M. (ed.) *Advances in Lipid Research*. Elsevier.
- EPP, N., FURSTENBERGER, G., MULLER, K., DE JUANES, S., LEITGES, M., HAUSSER, I., THIEME, F., LIEBISCH, G., SCHMITZ, G. & KRIEG, P. 2007. 12R-lipoxygenase deficiency disrupts epidermal barrier function. *J Cell Biol*, 177, 173-82.
- FANTUZZI, G. & DINARELLO, C. A. 1996. The inflammatory response in interleukin-1 betadeficient mice: comparison with other cytokine-related knock-out mice. *J Leukoc Biol*, 59, 489-93.
- FARQUHAR, M. G. & PALADE, G. E. 1963. Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, 17, 375-412.
- FELDMEYER, L., HUBER, M., FELLMANN, F., BECKMANN, J. S., FRENK, E. & HOHL, D. 2006. Confirmation of the origin of NISCH syndrome. *Human mutation*, 27, 408-10.
- FENNER, J. & CLARK, R. 2016. Anatomy, Physiology, Histology, and Immunohistochemistry of Human Skin.
- FLUHR, J. W. & ELIAS, P. M. 2002. Stratum corneum pH: Formation and Function of the 'Acid Mantle'. *Exogenous Dermatology*, 1, 163-175.
- FORTIER, A. M., ASSELIN, E. & CADRIN, M. 2013. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem*, 288, 11555-71.

- FRITSCH, P. 2009. Dermatologie und Venerologie für das Studium ; mit 113 Tabellen, Heidelberg, Springer.
- FROMM, M., KRUG, S. M., ZEISSIG, S., RICHTER, J. F., ROSENTHAL, R., SCHULZKE, J. D. & GUNZEL, D. 2009. High-resolution analysis of barrier function. *Ann N Y Acad Sci*, 1165, 74-81.
- FRÜHBECK, G., GOMEZ-AMBROSI, J., MURUZABAL, F. J. & BURRELL, M. A. 2001. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280, E827-47.
- FUJITA, H., CHALUBINSKI, M., RHYNER, C., INDERMITTE, P., MEYER, N., FERSTL, R., TREIS, A., GOMEZ, E., AKKAYA, A., O'MAHONY, L., AKDIS, M. & AKDIS, C. A. 2011. Claudin-1 expression in airway smooth muscle exacerbates airway remodeling in asthmatic subjects. *J Allergy Clin Immunol*, 127, 1612-21 e8.
- FUJITA, H., HAMAZAKI, Y., NODA, Y., OSHIMA, M. & MINATO, N. 2012. Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis. *PLoS One*, 7, e52272.
- 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, 1099-111.
- FURUSE, M., HIRASE, T., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S., TSUKITA, S. & TSUKITA, S. 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *The Journal of Cell Biology*, 123, 1777-1788.
- FURUSE, M., SASAKI, H., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1998. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*, 143, 391-401.
- FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2006. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol*, 16, 181-8.
- FYHRQUIST, N., SALAVA, A., AUVINEN, P. & LAUERMA, A. 2016. Skin Biomes. Curr Allergy Asthma Rep, 16, 40.
- GAO, J., LIU, Z. J., CHEN, T. & ZHAO, D. 2014. Pharmaceutical properties of calycosin, the major bioactive isoflavonoid in the dry root extract of Radix astragali. *Pharm Biol*, 52, 1217-22.
- GENUIS, S. J., BIRKHOLZ, D., RODUSHKIN, I. & BEESOON, S. 2011. Blood, urine, and sweat (BUS) study: monitoring and elimination of bioaccumulated toxic elements. *Arch Environ Contam Toxicol*, 61, 344-57.
- GONZALEZ-MARISCAL, L., BETANZOS, A., NAVA, P. & JARAMILLO, B. E. 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, 81, 1-44.
- GONZÁLEZ-MARISCAL, L., GARAY, E. & QUIROS, M. 2010. Regulation of Claudins by Posttranslational Modifications and Cell-Signaling Cascades.
- GREEN, H. 1977. Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. *Cell*, 11, 405-16.
- GRUBER, R., BORNCHEN, C., ROSE, K., DAUBMANN, A., VOLKSDORF, T., WLADYKOWSKI, E., VIDAL, Y. S. S., PETERS, E. M., DANSO, M., BOUWSTRA, J. A., HENNIES, H. C., MOLL, I., SCHMUTH, M. & BRANDNER, J. M. 2015. Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis. *Am J Pathol*, 185, 2777-89.
- GRUBER, R., ELIAS, P. M., CRUMRINE, D., LIN, T. K., BRANDNER, J. M., HACHEM, J. P., PRESLAND, R. B., FLECKMAN, P., JANECKE, A. R., SANDILANDS, A., MCLEAN, W. H., FRITSCH, P. O., MILDNER, M., TSCHACHLER, E. & SCHMUTH, M. 2011. Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function. *Am J Pathol*, 178, 2252-63.

- GSCHWANDTNER, M., MILDNER, M., MLITZ, V., GRUBER, F., ECKHART, L., WERFEL, T., GUTZMER, R., ELIAS, P. M. & TSCHACHLER, E. 2013. Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model. *Allergy*, 68, 37-47.
- GUDJONSSON, J. E., JOHNSTON, A., DYSON, M., VALDIMARSSON, H. & ELDER, J. T. 2007. Mouse models of psoriasis. *J Invest Dermatol*, 127, 1292-308.
- GUILLEMOT, L., PASCHOUD, S., PULIMENO, P., FOGLIA, A. & CITI, S. 2008. The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 601-13.
- GÜNZEL, D. & YU, A. S. 2013. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev*, 93, 525-69.
- GUTTMAN, J. A. & FINLAY, B. B. 2009. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 832-41.
- GUTTMAN-YASSKY, E., SUAREZ-FARINAS, M., CHIRICOZZI, A., NOGRALES, K. E., SHEMER, A., FUENTES-DUCULAN, J., CARDINALE, I., LIN, P., BERGMAN, R., BOWCOCK, A. M. & KRUEGER, J. G. 2009. Broad defects in epidermal cornification in atopic dermatitis identified through genomic analysis. *J Allergy Clin Immunol*, 124, 1235-1244 e58.
- HAAKE, A., SCOTT, G. A. & HOLBROOK, K. 2001. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. *In:* FREINKEL, R. K., WOODLEY, D.T. (ed.) *The Biology of the Skin.*
- HADJ-RABIA, S., BAALA, L., VABRES, P., HAMEL-TEILLAC, D., JACQUEMIN, E., FABRE, M., LYONNET, S., DE PROST, Y., MUNNICH, A., HADCHOUEL, M. & SMAHI, A. 2004. Claudin-1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease. *Gastroenterology*, 127, 1386-90.
- HÄNEL, K. H., CORNELISSEN, C., LUSCHER, B. & BARON, J. M. 2013. Cytokines and the skin barrier. *Int J Mol Sci*, 14, 6720-45.
- HARDING, C. R., WATKINSON, A., RAWLINGS, A. V. & SCOTT, I. R. 2000. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. *Int J Cosmet Sci*, 22, 21-52.
- HASHIMOTO, K. 1971. Intercellular Spaces of the Human Epidermis as Demonstrated with Lanthanum. *J Invest Dermatol*, 57, 17-31.
- HATTORI, F., KIATSURAYANON, C., OKUMURA, K., OGAWA, H., IKEDA, S., OKAMOTO, K. & NIYONSABA, F. 2014. The antimicrobial protein S100A7/psoriasin enhances the expression of keratinocyte differentiation markers and strengthens the skin's tight junction barrier. *Br J Dermatol*, 171, 742-53.
- HEENEN, M., THIRIAR, S., NOEL, J. C. & GALAND, P. 1998. Ki-67 immunostaining of normal human epidermis: comparison with 3H-thymidine labelling and PCNA immunostaining. *Dermatology*, 197, 123-6.
- HEIDERMANNS, C., HEINZ, E. & NETTER, H. 1956. *Physiologie Der Exkretion. Wasserhaushalt*, Walter De Gruyter Incorporated.
- HENNINGS, H., MICHAEL, D., CHENG, C., STEINERT, P., HOLBROOK, K. & YUSPA, S. H. 1980. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19, 245-54.
- HERBIG, M. E., HOUDEK, P., GORISSEN, S., ZORN-KRUPPA, M., WLADYKOWSKI, E., VOLKSDORF, T., GRZYBOWSKI, S., KOLIOS, G., WILLERS, C., MALLWITZ, H., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2015. A custom tailored model to investigate skin penetration in porcine skin and its comparison with human skin. *Eur J Pharm Biopharm*, 95, 99-109.
- HILLIGES, M., WANG, L. & JOHANSSON, O. 1995. Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *J Invest Dermatol*, 104, 134-7.

- HOAGLIN, D. C. & IGLEWICZ, B. 1987. Fine-Tuning Some Resistant Rules for Outlier Labeling. J Am Stat Assoc, 82, 1147-1149.
- HOLICK, M. F., MACLAUGHLIN, J. A., CLARK, M. B., HOLICK, S. A., POTTS, J. T., JR., ANDERSON, R. R., BLANK, I. H., PARRISH, J. A. & ELIAS, P. 1980. Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science*, 210, 203-5.
- HORSBURGH, M. J., WHARTON, S. J., COX, A. G., INGHAM, E., PEACOCK, S. & FOSTER, S. J. 2002. MntR modulates expression of the PerR regulon and superoxide resistance in Staphylococcus aureus through control of manganese uptake. *Mol Microbiol*, 44, 1269-86.
- HOU, J., RENIGUNTA, A., GOMES, A. S., HOU, M., PAUL, D. L., WALDEGGER, S. & GOODENOUGH, D. A. 2009. Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 15350-5.
- HOU, J., RENIGUNTA, A., YANG, J. & WALDEGGER, S. 2010. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 18010-5.
- HOUBEN, E., DE PAEPE, K. & ROGIERS, V. 2007. A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol Physiol*, 20, 122-32.
- HUANG, J., ZHANG, L., HE, C., QU, Y., LI, J., ZHANG, J., DU, T., CHEN, X., YU, Y., LIU,
 B. & ZHU, Z. 2015. Claudin-1 enhances tumor proliferation and metastasis by regulating cell anoikis in gastric cancer. *Oncotarget*, 6, 1652-65.
- HUBER, M., SIEGENTHALER, G., MIRANCEA, N., MARENHOLZ, I., NIZETIC, D., BREITKREUTZ, D., MISCHKE, D. & HOHL, D. 2005. Isolation and characterization of human repetin, a member of the fused gene family of the epidermal differentiation complex. *J Invest Dermatol*, 124, 998-1007.
- IGAWA, S., KISHIBE, M., MURAKAMI, M., HONMA, M., TAKAHASHI, H., IIZUKA, H. & ISHIDA-YAMAMOTO, A. 2011. Tight junctions in the stratum corneum explain spatial differences in corneodesmosome degradation. *Exp Dermatol*, 20, 53-7.
- INAI, T., KOBAYASHI, J. & SHIBATA, Y. 1999. Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol*, 78, 849-55.
- ISHIDA-YAMAMOTO, A., KISHIBE, M., MURAKAMI, M., HONMA, M., TAKAHASHI, H. & IIZUKA, H. 2012. Lamellar granule secretion starts before the establishment of tight junction barrier for paracellular tracers in mammalian epidermis. *PLoS One*, 7, e31641.
- ITOH, M., FURUSE, M., MORITA, K., KUBOTA, K., SAITOU, M. & TSUKITA, S. 1999. Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*, 147, 1351-63.
- JAKASA, I., DE JONGH, C. M., VERBERK, M. M., BOS, J. D. & KEZIC, S. 2006. Percutaneous penetration of sodium lauryl sulphate is increased in uninvolved skin of patients with atopic dermatitis compared with control subjects. *Br J Dermatol*, 155, 104-9.
- JAKASA, I., VERBERK, M. M., ESPOSITO, M., BOS, J. D. & KEZIC, S. 2007. Altered penetration of polyethylene glycols into uninvolved skin of atopic dermatitis patients. *J Invest Dermatol*, 127, 129-34.
- JANSSENS, M., VAN SMEDEN, J., GOORIS, G. S., BRAS, W., PORTALE, G., CASPERS, P. J., VREEKEN, R. J., KEZIC, S., LAVRIJSEN, A. P. & BOUWSTRA, J. A. 2011. Lamellar lipid organization and ceramide composition in the stratum corneum of patients with atopic eczema. *J Invest Dermatol*, 131, 2136-8.
- JENSEN, J. M., FOLSTER-HOLST, R., BARANOWSKY, A., SCHUNCK, M., WINOTO-MORBACH, S., NEUMANN, C., SCHUTZE, S. & PROKSCH, E. 2004. Impaired

sphingomyelinase activity and epidermal differentiation in atopic dermatitis. J Invest Dermatol, 122, 1423-31.

- JIA, Z., WANG, X., WANG, X., WEI, P., LI, L., WU, P. & HONG, M. 2018. Calycosin alleviates allergic contact dermatitis by repairing epithelial tight junctions via down-regulating HIF-1alpha. *J Cell Mol Med*, 22, 4507-4521.
- KAGE, H., FLODBY, P., GAO, D., KIM, Y. H., MARCONETT, C. N., DEMAIO, L., KIM, K.-J., CRANDALL, E. D. & BOROK, Z. 2014. Claudin 4 knockout mice: normal physiological phenotype with increased susceptibility to lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307, L524-L536.
- KALININ, A. E., KAJAVA, A. V. & STEINERT, P. M. 2002. Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays*, 24, 789-800.
- KAPPEL, S., MATTHESS, Y., KAUFMANN, M. & STREBHARDT, K. 2007. Silencing of mammalian genes by tetracycline-inducible shRNA expression. *Nat Protoc*, 2, 3257-69.
- KASRAIE, S. & WERFEL, T. 2013. Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Mediators Inflamm*, 2013, 942375.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2006. Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunol*, 7, 131.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*, 21, 317-37.
- KEZIC, S. & JAKASA, I. 2016. Filaggrin and Skin Barrier Function. *Curr Probl Dermatol*, 49, 1-7.
- KEZIC, S., NOVAK, N., JAKASA, I., JUNGERSTED, J. M., SIMON, M., BRANDNER, J. M., MIDDELKAMP-HUP, M. A. & WEIDINGER, S. 2014. Skin barrier in atopic dermatitis. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19, 542-56.
- KHAVARI, P. A. 2006. Modelling cancer in human skin tissue. Nat Rev Cancer, 6, 270-80.
- KIATSURAYANON, C., NIYONSABA, F., SMITHRITHEE, R., AKIYAMA, T., USHIO, H., HARA, M., OKUMURA, K., IKEDA, S. & OGAWA, H. 2014. Host defense (Antimicrobial) peptide, human beta-defensin-3, improves the function of the epithelial tight-junction barrier in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 134, 2163-2173.
- KIM, B. E., LEUNG, D. Y., BOGUNIEWICZ, M. & HOWELL, M. D. 2008. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by Th2 cytokines through STAT-6. *Clin Immunol*, 126, 332-7.
- KIM, Y. E., CHO, N., CHEON, S. & KIM, K. K. 2017. Bortezomib, a proteasome inhibitor, alleviates atopic dermatitis by increasing claudin 1 protein expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 493, 744-750.
- KIMURA, J., ABE, H., KAMITANI, S., TOSHIMA, H., FUKUI, A., MIYAKE, M., KAMATA, Y., SUGITA-KONISHI, Y., YAMAMOTO, S. & HORIGUCHI, Y. 2010. Clostridium perfringens enterotoxin interacts with claudins via electrostatic attraction. *J Biol Chem*, 285, 401-8.
- KIRCHMEIER, P., SAYAR, E., HOTZ, A., HAUSSER, I., ISLEK, A., YILMAZ, A., ARTAN, R. & FISCHER, J. 2014. Novel mutation in the CLDN1 gene in a Turkish family with neonatal ichthyosis sclerosing cholangitis (NISCH) syndrome. *Br J Dermatol*, 170, 976-8.
- KIRSCHNER, N. & BRANDNER, J. M. 2012. Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci*, 1257, 158-66.
- KIRSCHNER, N., HAFTEK, M., NIESSEN, C. M., BEHNE, M. J., FURUSE, M., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2011. CD44 regulates tight-junction assembly and barrier function. *J Invest Dermatol*, 131, 932-43.
- KIRSCHNER, N., HOUDEK, P., FROMM, M., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2010. Tight junctions form a barrier in human epidermis. *Eur J Cell Biol*, 89, 839-42.
- KIRSCHNER, N., POETZL, C., VON DEN DRIESCH, P., WLADYKOWSKI, E., MOLL, I., BEHNE, M. J. & BRANDNER, J. M. 2009. Alteration of tight junction proteins is an early event in psoriasis: putative involvement of proinflammatory cytokines. *Am J Pathol*, 175, 1095-106.
- KIRSCHNER, N., ROSENTHAL, R., FURUSE, M., MOLL, I., FROMM, M. & BRANDNER, J. M. 2013. Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 133, 1161-9.
- KOBAYASHI, M., YOSHIKI, R., SAKABE, J., KABASHIMA, K., NAKAMURA, M. & TOKURA, Y. 2009. Expression of toll-like receptor 2, NOD2 and dectin-1 and stimulatory effects of their ligands and histamine in normal human keratinocytes. *Br J Dermatol*, 160, 297-304.
- KOCH, P. J., DE VIRAGH, P. A., SCHARER, E., BUNDMAN, D., LONGLEY, M. A., BICKENBACH, J., KAWACHI, Y., SUGA, Y., ZHOU, Z., HUBER, M., HOHL, D., KARTASOVA, T., JARNIK, M., STEVEN, A. C. & ROOP, D. R. 2000. Lessons from loricrin-deficient mice: compensatory mechanisms maintaining skin barrier function in the absence of a major cornified envelope protein. *J Cell Biol*, 151, 389-400.
- KOHLER, K. & ZAHRAOUI, A. 2005. Tight junction: a co-ordinator of cell signalling and membrane trafficking. *Biol Cell*, 97, 659-65.
- KONDOH, M., MASUYAMA, A., TAKAHASHI, A., ASANO, N., MIZUGUCHI, H., KOIZUMI, N., FUJII, M., HAYAKAWA, T., HORIGUCHI, Y. & WATANBE, Y. 2005. A novel strategy for the enhancement of drug absorption using a claudin modulator. *Mol Pharmacol*, 67, 749-56.
- KONG, H. H., OH, J., DEMING, C., CONLAN, S., GRICE, E. A., BEATSON, M. A., NOMICOS, E., POLLEY, E. C., KOMAROW, H. D., PROGRAM, N. C. S., MURRAY, P. R., TURNER, M. L. & SEGRE, J. A. 2012. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res*, 22, 850-9.
- KOVAL, M. 2013. Differential pathways of claudin oligomerization and integration into tight junctions. *Tissue Barriers*, 1, e24518.
- KRAUSE, G., PROTZE, J. & PIONTEK, J. 2015. Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures. *Semin Cell Dev Biol*, 42, 3-12.
- KRAUSE, G., WINKLER, L., MUELLER, S. L., HASELOFF, R. F., PIONTEK, J. & BLASIG, I. E. 2008. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*, 1778, 631-45.
- KRAUSE, K., METZ, M., MAKRIS, M., ZUBERBIER, T. & MAURER, M. 2012. The role of interleukin-1 in allergy-related disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12, 477-84.
- KRIEG, P., ROSENBERGER, S., DE JUANES, S., LATZKO, S., HOU, J., DICK, A., KLOZ, U., VAN DER HOEVEN, F., HAUSSER, I., ESPOSITO, I., RAUH, M. & SCHNEIDER, H. 2013. Aloxe3 knockout mice reveal a function of epidermal lipoxygenase-3 as hepoxilin synthase and its pivotal role in barrier formation. *J Invest Dermatol*, 133, 172-80.
- KRIEN, P. M. & KERMICI, M. 2000. Evidence for the existence of a self-regulated enzymatic process within the human stratum corneum -an unexpected role for urocanic acid. *J Invest Dermatol*, 115, 414-20.
- KUBO, T., SUGIMOTO, K., KOJIMA, T., SAWADA, N., SATO, N. & ICHIMIYA, S. 2014. Tight junction protein claudin-4 is modulated via DeltaNp63 in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 455, 205-11.
- KUO, I. H., CARPENTER-MENDINI, A., YOSHIDA, T., MCGIRT, L. Y., IVANOV, A. I., BARNES, K. C., GALLO, R. L., BORKOWSKI, A. W., YAMASAKI, K., LEUNG, D.

Y., GEORAS, S. N., DE BENEDETTO, A. & BECK, L. A. 2013. Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function: implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J Invest Dermatol*, 133, 988-98.

- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAI, Y., COGEN, A. L., RADEK, K. A., PARK, H. J., MACLEOD, D. T., LEICHTLE, A., RYAN, A. F., DI NARDO, A. & GALLO, R. L. 2010. Activation of TLR2 by a small molecule produced by Staphylococcus epidermidis increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *J Invest Dermatol*, 130, 2211-21.
- LAI, Y. & GALLO, R. L. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*, 30, 131-41.
- LAMPE, M. A., BURLINGAME, A. L., WHITNEY, J., WILLIAMS, M. L., BROWN, B. E., ROITMAN, E. & ELIAS, P. M. 1983. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipid Res*, 24, 120-30.
- LANDMANN, L. 1986. Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granuledisks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. J Invest Dermatol, 87, 202-9.
- LI, X. & ZHONG, F. 2014. Nickel induces interleukin-1beta secretion via the NLRP3-ASC-caspase-1 pathway. *Inflammation*, 37, 457-66.
- LIANG, P., XU, Y., ZHANG, X., DING, C., HUANG, R., ZHANG, Z., LV, J., XIE, X., CHEN, Y., LI, Y., SUN, Y., BAI, Y., SONGYANG, Z., MA, W., ZHOU, C. & HUANG, J. 2015. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell*, 6, 363-372.
- LINGARAJU, A., LONG, T. M., WANG, Y., AUSTIN, J. R., 2ND & TURNER, J. R. 2015. Conceptual barriers to understanding physical barriers. *Semin Cell Dev Biol*, 42, 13-21.
- LÖFBLOM, J., ROSENSTEIN, R., NGUYEN, M. T., STAHL, S. & GOTZ, F. 2017. Staphylococcus carnosus: from starter culture to protein engineering platform. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101, 8293-8307.
- MADISON, K. C. 2003. Barrier Function of the Skin: "La Raison d'être" of the Epidermis. J Invest Dermatol, 121, 231-241.
- MADISON, K. C., SWARTZENDRUBER, D. C., WERTZ, P. W. & DOWNING, D. T. 1987. Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper Layers of the Stratum Corneum. *J Invest Dermatol*, 88, 714-718.
- MADISON, K. C., SWARTZENDRUBER, D. C., WERTZ, P. W. & DOWNING, D. T. 1988. Lamellar granule extrusion and stratum corneum intercellular lamellae in murine keratinocyte cultures. *J Invest Dermatol*, 90, 110-6.
- MADISON, K. C., SWARTZENDRUBER, D. C., WERTZ, P. W. & DOWNING, D. T. 1989. Murine keratinocyte cultures grown at the air/medium interface synthesize stratum corneum lipids and "recycle" linoleate during differentiation. *J Invest Dermatol*, 93, 10-7.
- MALI, P., YANG, L., ESVELT, K. M., AACH, J., GUELL, M., DICARLO, J. E., NORVILLE, J. E. & CHURCH, G. M. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 823-6.
- MANGONI, M. L., MCDERMOTT, A. M. & ZASLOFF, M. 2016. Antimicrobial peptides and wound healing: biological and therapeutic considerations. *Exp Dermatol*, 25, 167-73.
- MAREKOV, L. N. & STEINERT, P. M. 1998. Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem*, 273, 17763-70.
- MATSUKI, M., YAMASHITA, F., ISHIDA-YAMAMOTO, A., YAMADA, K., KINOSHITA, C., FUSHIKI, S., UEDA, E., MORISHIMA, Y., TABATA, K., YASUNO, H., HASHIDA, M., IIZUKA, H., IKAWA, M., OKABE, M., KONDOH, G., KINOSHITA, T., TAKEDA, J. & YAMANISHI, K. 1998. Defective stratum

corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1044-9.

- MATTER, K., AIJAZ, S., TSAPARA, A. & BALDA, M. S. 2005. Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr Opin Cell Biol*, 17, 453-8.
- MENON, G. K., GRAYSON, S. & ELIAS, P. M. 1985. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *J Invest Dermatol*, 84, 508-12.
- MENON, G. K. & KLIGMAN, A. M. 2009. Barrier functions of human skin: a holistic view. *Skin Pharmacol Physiol*, 22, 178-89.
- MENON, G. K., LEE, S. E. & LEE, S. H. 2018. An overview of epidermal lamellar bodies: Novel roles in biological adaptations and secondary barriers. *J Dermatol Sci.*
- MENON, G. K., ORSO, E., ASLANIDIS, C., CRUMRINE, D., SCHMITZ, G. & ELIAS, P. M. 2014. Ultrastructure of skin from Refsum disease with emphasis on epidermal lamellar bodies and stratum corneum barrier lipid organization. *Arch Dermatol Res*, 306, 731-7.
- MERTENS, A. E., RYGIEL, T. P., OLIVO, C., VAN DER KAMMEN, R. & COLLARD, J. G. 2005. The Rac activator Tiam1 controls tight junction biogenesis in keratinocytes through binding to and activation of the Par polarity complex. *J Cell Biol*, 170, 1029-37.
- MESTAS, J. & HUGHES, C. C. 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, 172, 2731-8.
- MICHIKAWA, H., FUJITA-YOSHIGAKI, J. & SUGIYA, H. 2008. Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res*, 334, 255-64.
- MILDNER, M., BALLAUN, C., STICHENWIRTH, M., BAUER, R., GMEINER, R., BUCHBERGER, M., MLITZ, V. & TSCHACHLER, E. 2006. Gene silencing in a human organotypic skin model. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 76-82.
- MILDNER, M., JIN, J., ECKHART, L., KEZIC, S., GRUBER, F., BARRESI, C., STREMNITZER, C., BUCHBERGER, M., MLITZ, V., BALLAUN, C., STERNICZKY, B., FODINGER, D. & TSCHACHLER, E. 2010. Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model. J Invest Dermatol, 130, 2286-94.
- MINETA, K., YAMAMOTO, Y., YAMAZAKI, Y., TANAKA, H., TADA, Y., SAITO, K., TAMURA, A., IGARASHI, M., ENDO, T., TAKEUCHI, K. & TSUKITA, S. 2011. Predicted expansion of the claudin multigene family. *FEBS Lett*, 585, 606-12.
- MOLL, I. 2016. Dermatologie, Stuttgart, Thieme.
- MOLL, R., DIVO, M. & LANGBEIN, L. 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol*, 129, 705-33.
- MORITA, K., ITOH, M., SAITOU, M., ANDO-AKATSUKA, Y., FURUSE, M., YONEDA, K., IMAMURA, S., FUJIMOTO, K. & TSUKITA, S. 1998. Subcellular distribution of tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, ZO-2) in rodent skin. J Invest Dermatol, 110, 862-6.
- MORITA, K., TSUKITA, S. & MIYACHI, Y. 2004. Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease. *Br J Dermatol*, 151, 328-34.
- NIEHUES, H., BOUWSTRA, J. A., EL GHALBZOURI, A., BRANDNER, J. M., ZEEUWEN, P. & VAN DEN BOGAARD, E. H. 2018. 3D skin models for 3R research: The potential of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. *Exp Dermatol*, 27, 501-511.

- NIEHUES, H., SCHALKWIJK, J., VAN VLIJMEN-WILLEMS, I., RODIJK-OLTHUIS, D., VAN ROSSUM, M. M., WLADYKOWSKI, E., BRANDNER, J. M., VAN DEN BOGAARD, E. H. J. & ZEEUWEN, P. 2017. Epidermal equivalents of filaggrin null keratinocytes do not show impaired skin barrier function. *J Allergy Clin Immunol*, 139, 1979-1981 e13.
- NIESSEN, C. M. 2007. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. J Invest Dermatol, 127, 2525-32.
- NITTA, T., HATA, M., GOTOH, S., SEO, Y., SASAKI, H., HASHIMOTO, N., FURUSE, M. & TSUKITA, S. 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5deficient mice. *J Cell Biol*, 161, 653-60.
- NUNBHAKDI-CRAIG, V., MACHLEIDT, T., OGRIS, E., BELLOTTO, D., WHITE, C. L., 3RD & SONTAG, E. 2002. Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J Cell Biol*, 158, 967-78.
- NUTAN, F. N., KANWAR, A. J. & PARSAD, D. 2012. The effect of topically applied corticosteroids on interleukin 1beta levels in patients with atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 26, 1020-2.
- OHNEMUS, U., KOHRMEYER, K., HOUDEK, P., ROHDE, H., WLADYKOWSKI, E., VIDAL, S., HORSTKOTTE, M. A., AEPFELBACHER, M., KIRSCHNER, N., BEHNE, M. J., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2008. Regulation of epidermal tightjunctions (TJ) during infection with exfoliative toxin-negative Staphylococcus strains. *J Invest Dermatol*, 128, 906-16.
- OMORI-MIYAKE, M., YAMASHITA, M., TSUNEMI, Y., KAWASHIMA, M. & YAGI, J. 2014. In vitro assessment of IL-4- or IL-13-mediated changes in the structural components of keratinocytes in mice and humans. *J Invest Dermatol*, 134, 1342-1350.
- PAGANELLI, M., STEPHENNE, X., GILIS, A., JACQUEMIN, E., HENRION CAUDE, A., GIRARD, M., GONZALES, E., REVENCU, N., REDING, R., WANTY, C., SMETS, F. & SOKAL, E. M. 2011. Neonatal ichthyosis and sclerosing cholangitis syndrome: extremely variable liver disease severity from claudin-1 deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 53, 350-4.
- PAPPAS, A. 2014. Lipids and Skin Health, Cham, Imprint: Springer.
- PASPARAKIS, M., HAASE, I. & NESTLE, F. O. 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 14, 289-301.
- PELLERIN, L., HENRY, J., HSU, C. Y., BALICA, S., JEAN-DECOSTER, C., MECHIN, M. C., HANSMANN, B., RODRIGUEZ, E., WEINDINGER, S., SCHMITT, A. M., SERRE, G., PAUL, C. & SIMON, M. 2013. Defects of filaggrin-like proteins in both lesional and nonlesional atopic skin. *J Allergy Clin Immunol*, 131, 1094-102.
- PELTONEN, S., RIEHOKAINEN, J., PUMMI, K. & PELTONEN, J. 2007. Tight junction components occludin, ZO-1, and claudin-1, -4 and -5 in active and healing psoriasis. Br J Dermatol, 156, 466-72.
- PENDARIES, V., MALAISSE, J., PELLERIN, L., LE LAMER, M., NACHAT, R., KEZIC, S., SCHMITT, A. M., PAUL, C., POUMAY, Y., SERRE, G. & SIMON, M. 2014. Knockdown of filaggrin in a three-dimensional reconstructed human epidermis impairs keratinocyte differentiation. *J Invest Dermatol*, 134, 2938-2946.
- PIONTEK, J., FRITZSCHE, S., CORDING, J., RICHTER, S., HARTWIG, J., WALTER, M., YU, D., TURNER, J. R., GEHRING, C., RAHN, H. P., WOLBURG, H. & BLASIG, I.
 E. 2011. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci*, 68, 3903-18.
- POUMAY, Y., DUPONT, F., MARCOUX, S., LECLERCQ-SMEKENS, M., HERIN, M. & COQUETTE, A. 2004. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in vitro studies. *Arch Dermatol Res*, 296, 203-11.

- PROKSCH, E., BRANDNER, J. M. & JENSEN, J. M. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol*, 17, 1063-72.
- PROTZE, J., EICHNER, M., PIONTEK, A., DINTER, S., ROSSA, J., BLECHARZ, K. G., VAJKOCZY, P., PIONTEK, J. & KRAUSE, G. 2015. Directed structural modification of Clostridium perfringens enterotoxin to enhance binding to claudin-5. *Cell Mol Life Sci*, 72, 1417-32.
- PRUNIERAS, M., REGNIER, M. & WOODLEY, D. 1983. Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol*, 81, 28s-33s.
- PUMMI, K., MALMINEN, M., AHO, H., KARVONEN, S. L., PELTONEN, J. & PELTONEN, S. 2001. Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and in vitro differentiating keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 117, 1050-8.
- PUNNONEN, J., YSSEL, H. & DE VRIES, J. E. 1997. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 100, 792-801.
- RACHOW, S., ZORN-KRUPPA, M., OHNEMUS, U., KIRSCHNER, N., VIDAL-Y-SY, S., VON DEN DRIESCH, P., BORNCHEN, C., EBERLE, J., MILDNER, M., VETTORAZZI, E., ROSENTHAL, R., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2013. Occludin is involved in adhesion, apoptosis, differentiation and Ca2+-homeostasis of human keratinocytes: implications for tumorigenesis. *PLoS One*, 8, e55116.
- RAHN, E., THIER, K., PETERMANN, P., RUBSAM, M., STAEHELI, P., IDEN, S., NIESSEN, C. M. & KNEBEL-MORSDORF, D. 2017. Epithelial Barriers in Murine Skin during Herpes Simplex Virus 1 Infection: The Role of Tight Junction Formation. *J Invest Dermatol*, 137, 884-893.
- RASSNER, G. 2009. Dermatologie, München, Elsevier, Urban & Fischer.
- RAWLINGS, A. V. 2014. Molecular basis for stratum corneum maturation and moisturization. *Br J Dermatol*, 171 Suppl 3, 19-28.
- RAYMOND, A. A., GONZALEZ DE PEREDO, A., STELLA, A., ISHIDA-YAMAMOTO, A., BOUYSSIE, D., SERRE, G., MONSARRAT, B. & SIMON, M. 2008. Lamellar bodies of human epidermis: proteomics characterization by high throughput mass spectrometry and possible involvement of CLIP-170 in their trafficking/secretion. *Mol Cell Proteomics*, 7, 2151-75.
- RENNE, J., SCHAFER, V., WERFEL, T. & WITTMANN, M. 2010. Interleukin-1 from epithelial cells fosters T cell-dependent skin inflammation. *Br J Dermatol*, 162, 1198-205.
- ROSENSTEIN, R., NERZ, C., BISWAS, L., RESCH, A., RADDATZ, G., SCHUSTER, S. C.
 & GOTZ, F. 2009. Genome analysis of the meat starter culture bacterium Staphylococcus carnosus TM300. *Appl Environ Microbiol*, 75, 811-22.
- ROSENTHAL, R., MILATZ, S., KRUG, S. M., OELRICH, B., SCHULZKE, J. D., AMASHEH, S., GUNZEL, D. & FROMM, M. 2010. Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci*, 123, 1913-21.
- ROSNER, B. 1983. Percentage Points for a Generalized ESD Many-Outlier Procedure. *Technometrics*, 25, 165-172.
- ROSS-HANSEN, K., LINNEBERG, A., JOHANSEN, J. D., HERSOUG, L. G., BRASCH-ANDERSEN, C., MENNE, T. & THYSSEN, J. P. 2013. The role of glutathione Stransferase and claudin-1 gene polymorphisms in contact sensitization: a cross-sectional study. *Br J Dermatol*, 168, 762-70.
- ROTHMAN, S. & FLESCH, P. 1944. The Physiology of the Skin. Annual Review of Physiology, 6, 195-224.
- SANDILANDS, A., SUTHERLAND, C., IRVINE, A. D. & MCLEAN, W. H. 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*, 122, 1285-94.

- SANFORD, J. A. & GALLO, R. L. 2013. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol*, 25, 370-7.
- SAWADA, E., YOSHIDA, N., SUGIURA, A. & IMOKAWA, G. 2012. Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: an implication for the disrupted barrier mechanism in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 68, 25-35.
- SCHAEFER, H., ZESCH, A. & STUTTGEN, G. 1977. Penetration, permeation, and absorption of triamcinolone acetonide in normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res*, 258, 241-9.
- SCHALLREUTER, K. U. & WOOD, J. M. 1995. The human epidermis. Proc Nutr Soc, 54, 191-5.
- SCHITTEK, B., PAULMANN, M., SENYUREK, I. & STEFFEN, H. 2008. The role of antimicrobial peptides in human skin and in skin infectious diseases. *Infect Disord Drug Targets*, 8, 135-43.
- SCHNEEBERGER, E. E. & LYNCH, R. D. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, C1213-C1228.
- SCHURER, N. Y. & ELIAS, P. M. 1991. The biochemistry and function of stratum corneum lipids. *Adv Lipid Res*, 24, 27-56.
- SELTMANN, J., ROESNER, L. M., VON HESLER, F. W., WITTMANN, M. & WERFEL, T. 2015. IL-33 impacts on the skin barrier by downregulating the expression of filaggrin. *J Allergy Clin Immunol*, 135, 1659-61 e4.
- SHANI, J., BARAK, S., LEVI, D., RAM, M., SCHACHNER, E. R., SCHLESINGER, T., ROBBERECHT, H., VAN GRIEKEN, R. & AVRACH, W. W. 1985. Skin penetration of minerals in psoriatics and guinea-pigs bathing in hypertonic salt solutions. *Pharmacol Res Commun*, 17, 501-12.
- SHEN, L., WEBER, C. R., RALEIGH, D. R., YU, D. & TURNER, J. R. 2011. Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo. *Annu Rev Physiol*, 73, 283-309.
- SIMANSKI, M., RADEMACHER, F., SCHRODER, L., GLASER, R. & HARDER, J. 2016. The Inflammasome and the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Are Involved in the Staphylococcus aureus-Mediated Induction of IL-1alpha and IL-1beta in Human Keratinocytes. *PLoS One*, 11, e0147118.
- SIMPSON, C. L., PATEL, D. M. & GREEN, K. J. 2011. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 565-80.
- SMITS, J. P. H., NIEHUES, H., RIKKEN, G., VAN VLIJMEN-WILLEMS, I. M. J. J., VAN DE ZANDE, G. W. H. J. F., ZEEUWEN, P. L. J. M., SCHALKWIJK, J. & VAN DEN BOGAARD, E. H. 2017. Immortalized N/TERT keratinocytes as an alternative cell source in 3D human epidermal models. *Scientific Reports*, 7, 11838.
- SONODA, N., FURUSE, M., SASAKI, H., YONEMURA, S., KATAHIRA, J., HORIGUCHI, Y. & TSUKITA, S. 1999. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol*, 147, 195-204.
- STAEHELIN, L. A. 1973. Further Observations on the Fine Structure of Freeze-Cleaved Tight Junctions. *J Cell Sci*, 13, 763-786.
- STEINSTRAESSER, L., KOEHLER, T., JACOBSEN, F., DAIGELER, A., GOERTZ, O., LANGER, S., KESTING, M., STEINAU, H., ERIKSSON, E. & HIRSCH, T. 2008. Host defense peptides in wound healing. *Mol Med*, 14, 528-37.
- SUAREZ-FARINAS, M., TINTLE, S. J., SHEMER, A., CHIRICOZZI, A., NOGRALES, K., CARDINALE, I., DUAN, S., BOWCOCK, A. M., KRUEGER, J. G. & GUTTMAN-YASSKY, E. 2011. Nonlesional atopic dermatitis skin is characterized by broad

terminal differentiation defects and variable immune abnormalities. J Allergy Clin Immunol, 127, 954-64 e1-4.

- SUGAWARA, T., IWAMOTO, N., AKASHI, M., KOJIMA, T., HISATSUNE, J., SUGAI, M. & FURUSE, M. 2013. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J Dermatol Sci*, 70, 12-8.
- SUGIURA, H., EBISE, H., TAZAWA, T., TANAKA, K., SUGIURA, Y., UEHARA, M., KIKUCHI, K. & KIMURA, T. 2005. Large-scale DNA microarray analysis of atopic skin lesions shows overexpression of an epidermal differentiation gene cluster in the alternative pathway and lack of protective gene expression in the cornified envelope. *Br J Dermatol*, 152, 146-9.
- SULTANA, R., MCBAIN, A. J. & O'NEILL, C. A. 2013. Strain-dependent augmentation of tight-junction barrier function in human primary epidermal keratinocytes by Lactobacillus and Bifidobacterium lysates. *Appl Environ Microbiol*, 79, 4887-94.
- SYBERT, V. P., DALE, B. A. & HOLBROOK, K. A. 1985. Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. *J Invest Dermatol*, 84, 191-4.
- SZEGEDI, K., LUTTER, R., RES, P. C., BOS, J. D., LUITEN, R. M., KEZIC, S. & MIDDELKAMP-HUP, M. A. 2015. Cytokine profiles in interstitial fluid from chronic atopic dermatitis skin. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 29, 2136-44.
- SZEPETOWSKI, S., LACOSTE, C., MALLET, S., ROQUELAURE, B., BADENS, C. & FABRE, A. 2017. [NISCH syndrome, a rare cause of neonatal cholestasis: A case report]. *Arch Pediatr*, 24, 1228-1234.
- TABACHNICK, J. 1957. Urocanic acid, the major acid-soluble, ultraviolet-absorbing compound in guinea pig epidermis. *Arch Biochem Biophys*, 70, 295-8.
- TAKAHASHI, A., KONDOH, M., MASUYAMA, A., FUJII, M., MIZUGUCHI, H., HORIGUCHI, Y. & WATANABE, Y. 2005. Role of C-terminal regions of the Cterminal fragment of Clostridium perfringens enterotoxin in its interaction with claudin-4. J Control Release, 108, 56-62.
- TAKAHASHI, A., SAITO, Y., KONDOH, M., MATSUSHITA, K., KRUG, S. M., SUZUKI, H., TSUJINO, H., LI, X., AOYAMA, H., MATSUHISA, K., UNO, T., FROMM, M., HAMAKUBO, T. & YAGI, K. 2012. Creation and biochemical analysis of a broadspecific claudin binder. *Biomaterials*, 33, 3464-74.
- TAKAHASHI, H., TSUJI, H., MINAMI-HORI, M., MIYAUCHI, Y. & IIZUKA, H. 2014. Defective barrier function accompanied by structural changes of psoriatic stratum corneum. *J Dermatol*, 41, 144-8.
- TAKANO, K., KOJIMA, T., SAWADA, N. & HIMI, T. 2014. Role of tight junctions in signal transduction: an update. *EXCLI J*, 13, 1145-62.
- TAMURA, A., HAYASHI, H., IMASATO, M., YAMAZAKI, Y., HAGIWARA, A., WADA, M., NODA, T., WATANABE, M., SUZUKI, Y. & TSUKITA, S. 2011. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na+ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology*, 140, 913-23.
- TOKUMASU, R., YAMAGA, K., YAMAZAKI, Y., MUROTA, H., SUZUKI, K., TAMURA, A., BANDO, K., FURUTA, Y., KATAYAMA, I. & TSUKITA, S. 2016. Dosedependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, E4061-8.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4354.

- TROY, T. C., RAHBAR, R., ARABZADEH, A., CHEUNG, R. M. & TURKSEN, K. 2005. Delayed epidermal permeability barrier formation and hair follicle aberrations in Inv-Cldn6 mice. *Mech Dev*, 122, 805-19.
- TSUKITA, S., FURUSE, M. & ITOH, M. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 285-93.
- TURKSEN, K. & TROY, T. C. 2002. Permeability barrier dysfunction in transgenic mice overexpressing claudin 6. *Development*, 129, 1775-84.
- VALLEDOR, A. F., COMALADA, M., SANTAMARIA-BABI, L. F., LLOBERAS, J. & CELADA, A. 2010. Macrophage proinflammatory activation and deactivation: a question of balance. *Adv Immunol*, 108, 1-20.
- VAN ITALLIE, C., RAHNER, C. & ANDERSON, J. M. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 107, 1319-27.
- VAN ITALLIE, C. M. & ANDERSON, J. M. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*, 68, 403-29.
- VAN ITALLIE, C. M., FANNING, A. S. & ANDERSON, J. M. 2003. Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins. *Am J Physiol Renal Physiol*, 285, F1078-84.
- VAN ITALLIE, C. M., GAMBLING, T. M., CARSON, J. L. & ANDERSON, J. M. 2005. Palmitoylation of claudins is required for efficient tight-junction localization. *J Cell Sci*, 118, 1427-36.
- VAN ITALLIE, C. M., HOLMES, J., BRIDGES, A., GOOKIN, J. L., COCCARO, M. R., PROCTOR, W., COLEGIO, O. R. & ANDERSON, J. M. 2008. The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci*, 121, 298-305.
- VAN SMEDEN, J., JANSSENS, M., GOORIS, G. S. & BOUWSTRA, J. A. 2014. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta*, 1841, 295-313.
- VESHNYAKOVA, A., PIONTEK, J., PROTZE, J., WAZIRI, N., HEISE, I. & KRAUSE, G. 2012. Mechanism of Clostridium perfringens enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J Biol Chem*, 287, 1698-708.
- VESHNYAKOVA, A., PROTZE, J., ROSSA, J., BLASIG, I. E., KRAUSE, G. & PIONTEK, J. 2010. On the interaction of Clostridium perfringens enterotoxin with claudins. *Toxins* (*Basel*), 2, 1336-56.
- VOLKSDORF, T., HEILMANN, J., EMING, S. A., SCHAWJINSKI, K., ZORN-KRUPPA, M., UECK, C., VIDAL, Y. S. S., WINDHORST, S., JUCKER, M., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2017. Tight Junction Proteins Claudin-1 and Occludin Are Important for Cutaneous Wound Healing. *Am J Pathol*, 187, 1301-1312.
- WALLACE, L., ROBERTS-THOMPSON, L. & REICHELT, J. 2012. Deletion of K1/K10 does not impair epidermal stratification but affects desmosomal structure and nuclear integrity. J Cell Sci, 125, 1750-8.
- WANG, B., MCHUGH, B. J., QURESHI, A., CAMPOPIANO, D. J., CLARKE, D. J., FITZGERALD, J. R., DORIN, J. R., WELLER, R. & DAVIDSON, D. J. 2017. IL-1beta-Induced Protection of Keratinocytes against Staphylococcus aureus-Secreted Proteases Is Mediated by Human beta-Defensin 2. *J Invest Dermatol*, 137, 95-105.
- WATKINS, L. R., MAIER, S. F. & GOEHLER, L. E. 1995. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain*, 63, 289-302.

- WATSON, R., PODDAR, R., WALKER, J., MCGUILL, I., HOARE, L., GRIFFITHS, C. & O'NEILL, C. 2007. Altered claudin expression is a feature of chronic plaque psoriasis. *The Journal of pathology*, 212, 450-458.
- WEERHEIM, A. & PONEC, M. 2001. Determination of stratum corneum lipid profile by tape stripping in combination with high-performance thin-layer chromatography. *Arch Dermatol Res*, 293, 191-9.
- WEIDINGER, S., BECK, L. A., BIEBER, T., KABASHIMA, K. & IRVINE, A. D. 2018. Atopic dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*, 4, 1.
- WEYRICH, L. S., DIXIT, S., FARRER, A. G., COOPER, A. J. & COOPER, A. J. 2015. The skin microbiome: Associations between altered microbial communities and disease. *Australas J Dermatol*, 56, 268-74.
- WINKLER, L., GEHRING, C., WENZEL, A., MULLER, S. L., PIEHL, C., KRAUSE, G., BLASIG, I. E. & PIONTEK, J. 2009. Molecular determinants of the interaction between Clostridium perfringens enterotoxin fragments and claudin-3. *J Biol Chem*, 284, 18863-72.
- WONG, V. W., SORKIN, M., GLOTZBACH, J. P., LONGAKER, M. T. & GURTNER, G. C. 2011. Surgical approaches to create murine models of human wound healing. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 969618.
- WOOD, L. C., JACKSON, S. M., ELIAS, P. M., GRUNFELD, C. & FEINGOLD, K. R. 1992. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. *J Clin Invest*, 90, 482-7.
- WRAY, C., MAO, Y., PAN, J., CHANDRASENA, A., PIASTA, F. & FRANK, J. A. 2009. Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 297, L219-27.
- WU, R. H., CHENG, T. L., LO, S. R., HSU, H. C., HUNG, C. F., TENG, C. F., WU, M. P., TSAI, W. H. & CHANG, W. T. 2007. A tightly regulated and reversibly inducible siRNA expression system for conditional RNAi-mediated gene silencing in mammalian cells. J Gene Med, 9, 620-34.
- WYSOCKI, A. B. 1995. A review of the skin and its appendages. *Adv Wound Care*, 8, 53-4, 56-62, 64 passim.
- YA-XIAN, Z., SUETAKE, T. & TAGAMI, H. 1999. Number of cell layers of the stratum corneum in normal skin relationship to the anatomical location on the body, age, sex and physical parameters. *Arch Dermatol Res*, 291, 555-9.
- YOKOUCHI, M., KUBO, A., KAWASAKI, H., YOSHIDA, K., ISHII, K., FURUSE, M. & AMAGAI, M. 2015. Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. *J Dermatol Sci*, 77, 28-36.
- YONEDA, K., NAKAGAWA, T., LAWRENCE, O. T., HUARD, J., DEMITSU, T., KUBOTA, Y. & PRESLAND, R. B. 2012. Interaction of the profilaggrin N-terminal domain with loricrin in human cultured keratinocytes and epidermis. *J Invest Dermatol*, 132, 1206-14.
- YOSHIDA, K., KUBO, A., FUJITA, H., YOKOUCHI, M., ISHII, K., KAWASAKI, H., NOMURA, T., SHIMIZU, H., KOUYAMA, K., EBIHARA, T., NAGAO, K. & AMAGAI, M. 2014. Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*, 134, 856-64.
- YOSHIDA, K., YOKOUCHI, M., NAGAO, K., ISHII, K., AMAGAI, M. & KUBO, A. 2013. Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci*, 71, 89-99.

- YOSHIDA, Y., MORITA, K., MIZOGUCHI, A., IDE, C. & MIYACHI, Y. 2001. Altered expression of occludin and tight junction formation in psoriasis. *Arch Dermatol Res*, 293, 239-44.
- YU, H. S., KANG, M. J., KWON, J. W., LEE, S. Y., LEE, E., YANG, S. I., JUNG, Y. H., HONG, K., KIM, Y. J., LEE, S. H., KIM, H. J., KIM, H. Y., SEO, J. H., KIM, B. J., KIM, H. B. & HONG, S. J. 2015. Claudin-1 polymorphism modifies the effect of mold exposure on the development of atopic dermatitis and production of IgE. *J Allergy Clin Immunol*, 135, 827-30 e5.
- YUKI, T., HACHIYA, A., KUSAKA, A., SRIWIRIYANONT, P., VISSCHER, M. O., MORITA, K., MUTO, M., MIYACHI, Y., SUGIYAMA, Y. & INOUE, S. 2011a. Characterization of tight junctions and their disruption by UVB in human epidermis and cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 131, 744-52.
- YUKI, T., HARATAKE, A., KOISHIKAWA, H., MORITA, K., MIYACHI, Y. & INOUE, S. 2007. Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol*, 16, 324-30.
- YUKI, T., KOMIYA, A., KUSAKA, A., KUZE, T., SUGIYAMA, Y. & INOUE, S. 2013. Impaired tight junctions obstruct stratum corneum formation by altering polar lipid and profilaggrin processing. *J Dermatol Sci*, 69, 148-58.
- YUKI, T., TOBIISHI, M., KUSAKA-KIKUSHIMA, A., OTA, Y. & TOKURA, Y. 2016. Impaired Tight Junctions in Atopic Dermatitis Skin and in a Skin-Equivalent Model Treated with Interleukin-17. *PLoS One*, 11, e0161759.
- YUKI, T., YOSHIDA, H., AKAZAWA, Y., KOMIYA, A., SUGIYAMA, Y. & INOUE, S. 2011b. Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *J Immunol*, 187, 3230-7.
- ZHANG, L.-J., GUERRERO-JUAREZ, C. F., HATA, T., BAPAT, S. P., RAMOS, R., PLIKUS, M. V. & GALLO, R. L. 2015. Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection. *Science*, 347, 67-71.
- ZORN-KRUPPA, M., VOLKSDORF, T., UECK, C., ZOLLER, E., REINSHAGEN, K., RIDDERBUSCH, I., BRUNING, G., HOUDEK, P., MOLL, I. & BRANDNER, J. M. 2016. Major cell biological parameters of keratinocytes are predetermined by culture medium and donor source. *Exp Dermatol*, 25, 242-4.
- ZWANZIGER, D., HACKEL, D., STAAT, C., BOCKER, A., BRACK, A., BEYERMANN, M., RITTNER, H. & BLASIG, I. E. 2012. A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia. *Mol Pharm*, 9, 1785-94.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank gilt **Frau Prof. Dr. Johanna Brandner** für die Möglichkeit, Teil Ihres Forschungsteams zu werden und an diesem interessanten Thema mitzuarbeiten. Sie hat mich durch konstruktive Kritik stets dazu gebracht, die Vielseitigkeit der Forschung auszuschöpfen und das bestmögliche Ergebnis zu erreichen. Außerdem ermöglichte sie mir die Teilnahme an meinen ersten internationalen Konferenzen. Danke für diese spannende Zeit.

Ich danke ganz besonders **Herrn Prof. Dr. Thorsten Burmester** für die Übernahme der Betreuung seitens des Fachbereiches Biologie.

Bei **Frau Prof. Dr. Ingrid Moll** und **Herrn Prof. Dr. Stefan W. Schneider** bedanke ich mich dafür, dass ich meine Dissertation im Zellbiologischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie am UKE anfertigen durfte.

All den neuen und alten, aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern und Doktoranden des Labors sage ich Danke für die vielen gemeinsamen Stunden, die unkomplizierte Zusammenarbeit und die vielen fruchtbaren Diskussionen und Hilfestellungen. Ein besonderer Dank gilt **Frau Dr. Michaela Zorn-Kruppa** für die vielen Gespräche, den wissenschaftlichen und persönlichen Austausch. Den technischen Assistentinnen des Labors **Sabine Vidal-y-Sy, Ewa Wladykowski** und **Pia Houdek** sei für die fachliche Anleitung und die vergnüglichen Mittagspausen gedankt.

Außerdem möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern und bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft e.V. für die Unterstützung dieser Arbeit bedanken.

DANKE!

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift

"Untersuchungen zur Rolle der Tight Junction Proteine Claudin-1 und Claudin-4 in der Barrierefunktion der humanen Haut"

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 13. September 2018

∴ berguauu Sophia Bergmann