

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

(Direktor: Prof. Dr. med. T. Schwarz)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Untersuchungen zur Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors durch Staphylokokken

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Nikolas Johannes Vent

aus Kiel

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Harder, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. John Baines, Institut für Experimentelle Medizin

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 20.05.2021

gez.: Prof. Dr. Jürgen Harder

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Nikolas Johannes Vent, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt wurde. Aus benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen wurden als solche in der Arbeit kenntlich gemacht.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis und Glossar	III
1. Einleitung	1
1.1. Haut.....	1
1.2. Staphylokokken	2
1.2.1. <i>Staphylococcus epidermidis</i> (<i>S. epidermidis</i>)	2
1.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>).....	4
1.3. Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AhR)	5
1.3.1. Einführung	5
1.3.2. Aufbau des AhR.....	6
1.3.3. Signalweg des AhR.....	8
1.3.4. Zielgene	9
1.3.5. Regulation der AhR-Aktivität.....	10
1.3.6. Rolle des AhR in Keratinozyten	10
1.3.7. Der AhR in der Pathologie und Therapie von Erkrankungen	11
1.3.8. Inhibition des AhR-Signalweges	13
1.3.9. Liganden des AhR	13
1.4. Ziel der Arbeit	15
2. Material und Methoden	17
2.1. Material.....	17
2.1.1. Chemikalien und Reagenzien	17
2.2. Methoden.....	22
2.2.1. Mikrobiologische Methoden	22
2.2.2. Zellbiologische Methoden	23
2.2.3. Molekularbiologische Methoden	25
3. Ergebnisse	30
3.1. Untersuchungen mit Kulturüberständen von <i>S. epidermidis</i>	30
3.1.1. Kulturüberstände von <i>S. epidermidis</i> induzieren AhR-abhängig CYP1A1 ..	30
3.1.2. <i>S. epidermidis</i> -Kulturen wachsen unabhängig von der Tryptophankonzentration	31
3.1.3. Einfluss der Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kulturüberstände von <i>S. epidermidis</i> auf die AhR-Aktivierung.....	32
3.1.4. Charakterisierung der von <i>S. epidermidis</i> sezernierten AhR-Aktivatoren ..	34
3.2. Untersuchungen mit Kulturüberständen von <i>S. aureus</i>	38
3.2.1. Kulturüberstände von <i>S. aureus</i> wachsen unabhängig von TRP- Konzentration und aktivieren den AhR.....	38
3.2.2. <2kDa-filtrierte Kulturüberstände von <i>S. aureus</i> aktivieren den AhR.....	39
4. Diskussion	40
4.1. Untersuchungen mit Kulturüberständen von <i>S. epidermidis</i>	42

4.1.1.	<i>S. epidermidis</i> Kulturen <i>wachsen</i> unabhängig von der Tryptophankonzentration	42
4.1.2.	Kulturüberstände von <i>S. epidermidis</i> induzieren AhR-abhängig CYP1A1 ..	44
4.1.3.	Einfluss der Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kulturüberstände von <i>S. epidermidis</i> auf die AhR-Aktivierung.....	45
4.1.4.	Charakterisierung der von <i>S. epidermidis</i> sezernierten AhR-Aktivatoren ..	49
4.2.	Untersuchungen zu Kulturüberständen von <i>S. aureus</i>	51
4.3.	Schlussfolgerung und Ausblick	53
4.4.	Zusammenfassung	55
5.	Quellenverzeichnis	56
6.	Danksagung	64

Abkürzungsverzeichnis und Glossar

Englischsprachige Eigennamen, deren Verwendung nicht umgangen werden konnte, sind in Anführungsstriche gesetzt oder kursiv gedruckt und in Klammern, bzw. im Glossar und Abkürzungsverzeichnis sinngemäß erläutert.

Abb.	Abbildung
bhlh-PAS	basic-helix loop helix/ Per ARNT-Sim
BSA	bovine Serum Albumin / aus Rinderserum gewonnenes Albumin
DMEM	Dulbecos modiefied eagle Medium / Nährmedium für Zelllinien
cDNA	<i>mRNA complementary DNA</i> / zur mRNA komplementäre DNA
EGFR	epidermal growth factor receptor / epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA	<i>enzyme linked Immunosorbant assay</i> / Enzymvermitteltes immunologisches Nachweisverfahren
FCS	fetale calf serum / fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
HaCaT	<i>human adult low calcium high temprature keratinocytes</i>
HSP90	Hitze-Schock-Protein 90
IL-1 β	Interleukin 1beta
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> / nukleärer Translokator des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
min.	Minute(n)
NF κ B	<i>nuclear factor-κB</i> / Eigenname eines Transkriptionsfaktors
NHEK	Normale humane Keratinozyten
nm	Nanometer
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbons / polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate buffered Saline / Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
Pp60src	rous sarcoma virus transforming protein
PRR	<i>pattern recogniction receptors</i> / Mustererkennungsrezeptoren
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> / Polymerase- Kettenreaktion

rcf	<i>relative centrifugal force</i> / relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	<i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
RP38	<i>ribosomal protein L38</i> / Eigenname eines Gens
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin
XRE	<i>Xenobiotic Response Element</i> / Eigenname

1. Einleitung

1.1. Haut

Die Haut des Menschen ist sein größtes Sinnesorgan und bildet eine Barriere zu seiner Umwelt. Als Barriere muss die Haut viele verschiedene Aufgaben erfüllen, die einen mehrschichtigen Aufbau und verschiedene Eigenschaften erfordern. Hierzu gehört der Schutz vor exogenen Schädigungen, die mechanischer, chemischer oder biologischer Art sein können. Zusätzlich dient die Haut zur Regulation des Wasserhaushalts und der Körpertemperatur.

Die Haut (*Cutis*) besteht aus drei Schichten. Diese umfassen die Unterhaut (*Subcutis*) aus Binde- und Fettgewebe, die Lederhaut (*Dermis*) aus Bindegewebe und die Oberhaut (*Epidermis*), den epithelialen Anteil. Bei der *Epidermis* handelt es sich um ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel. Da für diese Arbeit die *Epidermis* wichtig ist, wird diese im Folgenden näher erläutert.

Die *Epidermis* besteht aus Keratinozyten, Melanozyten, Langerhanszellen und Merkelzellen. Sie lässt sich in vier Schichten unterteilen. Die unteren Schichten werden von lebenden Keratinozyten gebildet, während die äußerste Schicht aus abgestorbenen Keratinozyten besteht. Diese werden abgeschilfert und durch nachrückende Keratinozyten ersetzt. Die ständige Erneuerung des Epithels erfordert eine permanente Zellwanderung von basal nach superfizial (Abb. 1). Während dieser Wanderung differenzieren die Keratinozyten zu einer funktionalen Barriere, die durch die abgestorbenen Hornzellen gebildet wird.

Die unterste Schicht ist das *Stratum basale*, auf dem das *Stratum spinosum* liegt. Diese beiden werden zusammen als *Stratum germinativum* bezeichnet, da in ihnen die Stammzellen der Keratinozyten liegen. Darüber liegt das *Stratum granulosum*. Es wird so bezeichnet, da sich auf dieser Differenzierungsstufe immer mehr Keratohyalin granula einlagern. Die Keratohyalin granula sind erste Zeichen der Verhornung. Die äußerste Schicht stellt das *Stratum corneum* dar. In dieser Schicht haben die Keratinozyten im Rahmen der Apoptose neben ihrem Zellkern auch alle weiteren Organellen verloren. Sie sind durch Corneodesmosomen eng verbunden und stellen die Barriere gegen exogene Schädigungen dar und dienen als Diffusionsbarriere. Die Corneodesmosomen werden zuletzt durch Proteolyse

aufgelöst. Dadurch werden Keratinozyten voneinander gelöst und abgeschilfert (Desquamation). Insgesamt dauert es etwa 4 Wochen um das Epithel einmal vollständig zu ersetzen (Lüllmann-Rauch, 2015).

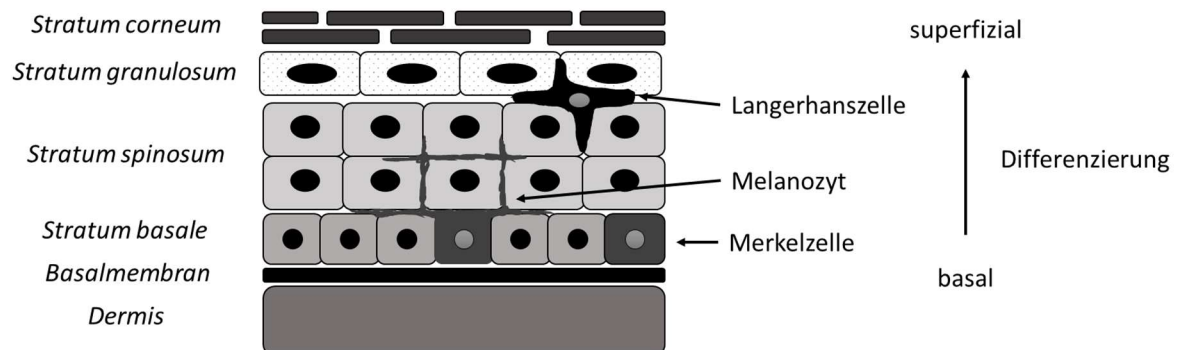


Abbildung 1: Aufbau und Zelltypen der Epidermis. Dargestellt sind die Schichten der Epidermis, bei der es sich um mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel handelt. Keratinozyten entstehen durch Stammzellteilung im *Stratum basale* und differenzieren auf dem Weg ins *Stratum corneum*. Im Laufe der Differenzierung verlieren sie ihren Kern. Neben den Stammzellen der Keratinozyten liegen innerhalb der Basalschicht Merkelzellen und Melanozyten. In den äußeren Schichten befinden sich Langerhanszellen, die als dendritische Zellen eine wichtige Rolle für das Immunsystem spielen. Modifiziert nach Lüllmann-Rauch (2015)

Da in dieser Arbeit die Kommunikation zwischen Keratinozyten und Staphylokokken, die die Haut besiedeln, näher untersucht werden soll, werden im Folgenden zwei wichtige Vertreter vorgestellt.

1.2. Staphylokokken

Staphylokokken sind unbewegliche, grampositive Kokken, die traubenförmig wachsen und ca. 1µm im Durchmesser groß sind. Abhängig von ihrer Fähigkeit, Koagulase zu bilden werden sie in zwei Gruppen eingeteilt: Koagulase-positiv und Koagulase-negativ. Bei Staphylokokken handelt es sich um Trockenkeime, die eine ausgeprägte Tenazität besitzen. So können sie auch außerhalb ihres bevorzugten Milieus mehrere Wochen überleben und sind deshalb vor allem in Krankenhäusern weit verbreitet. Aufgrund ihrer zunehmenden Antibiotikaresistenz können sie dort gefährliche Infektionen bei Patienten auslösen. Allerdings zeigt sich, dass einige Staphylokokken als Kommensale die Immunabwehr der Haut verbessern.

1.2.1. *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*)

S. epidermidis ist ein koagulasenegativer *Staphylococcus*. Er besiedelt als Kommensale die Haut und die Schleimhäute des Menschen (Garrity, Richard W.

Boone, Boone, & Castenholz, 2001). Diese Besiedlung verbessert die Immunabwehr der Haut (Christensen & Brüggemann, 2014) und moduliert inflammatorische Prozesse nach Hautverletzungen (Lai et al., 2009). Zum Beispiel stimuliert *S. epidermidis* in Keratinozyten Interleukin-1 (IL-1) vermittelte Immunantworten. Diese Feststellung lässt vermuten, dass IL-1 Rezeptoragonisten, wie Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-1 β (IL-1 β), ein Kommunikationsweg zwischen Hautkommensale und Wirt sind (Chng et al., 2016; Naik et al., 2012). *S. epidermidis* schützt durch Produktion von antimikrobiellen Peptiden vor der Besiedlung mit potentiell pathogenen Keimen wie *S. aureus* (Nakatsuji et al., 2017).

Durch diese Fähigkeiten trägt *S. epidermidis* zur Homöostase der Haut bei. Eine Verschiebung im Mikrobiom ist ein Risikofaktor für einen Verlust der Homöostase und erleichtert so die Kolonialisierung der Haut für opportunistische Krankheitserreger. Dieser Prozess ist eine Möglichkeit, wie das Immunsystem der Haut gestört wird und entzündliche Läsionen erleidet (Abb. 2) (Chng et al., 2016).

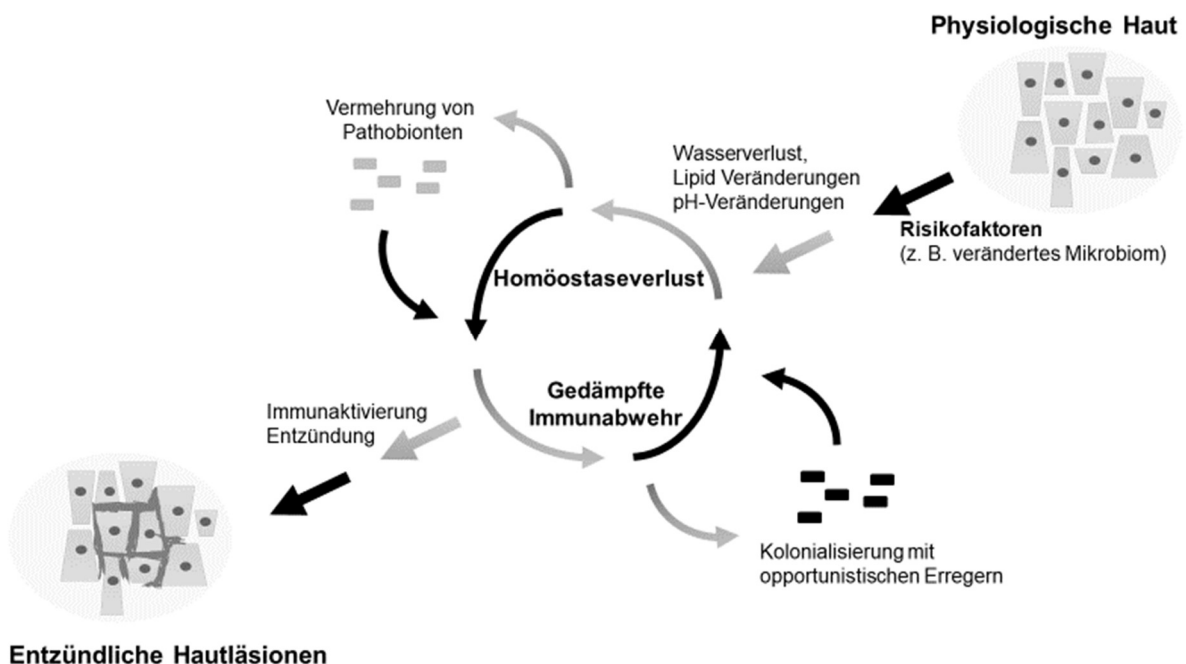


Abbildung 2: Schutz der Homöostase durch Kommensalen wie *S. epidermidis*. Eine Störung der Homöostase der Haut z. B. durch ein verändertes Mikrobiom, führt zu einer Vermehrung von Pathobionten. Das Immunsystem wird aktiv und die Haut zeigt entzündliche Läsionen. Die Schädigung der Haut stört die Immunabwehr und ermöglicht die Kolonialisierung mit opportunistischen Krankheitserregern. Diese stören zusätzlich die Homöostase der Haut. Es bildet sich ein Kreislauf, der den Progress von entzündlichen Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis erklärt. Modifiziert nach Chng et al (2016).

Allerdings ist *S. epidermidis* auch ein opportunistischer Krankheitserreger, wenn er von der Haut in die Blutbahn gelangt (Otto, 2009). Insbesondere Menschen, die an einem Immundefizit leiden oder einen Fremdkörper, wie einen Katheter oder eine Prothese in sich tragen, sind gefährdet an *S. epidermidis*-Infektionen zu erkranken. Der Grund dafür ist ein Biofilm, der sich auf eingebrachten Fremdmaterialien bildet. Als Folge der Besiedlung treten lokale Infektionen am Fremdmaterial auf, die in einer schweren systemischen Infektion münden können. Eine solche Infektion ist häufig erst nach einer Explantation des Fremdmaterials zu beherrschen (Becker, Heilmann, & Peters, 2014).

1.2.2. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus ist ein potentiell pathogener Keim und kann bei Störungen der Immunabwehr verschiedene Infektionen auslösen. Diese reichen von oberflächlichen Hautinfektionen bis zu einer Endokarditis oder einer tödlichen, systemischen Sepsis. Seine Pathogenität beruht auf verschiedenen Virulenzfaktoren. So schützt *S. aureus* sich beispielsweise durch eine Polysaccharidkapsel vor Phagozytose, bildet Protein A, welches Immunglobuline binden kann, und ist in der Lage Toxine zu bilden (Fischetti, Novick, Ferretti, Portnoy, & Rood, 2000).

Seit der Einführung von Antibiotika in der Therapie von Infektionen ist *S. aureus* in der Medizin auf Grund seiner Resistenzentwicklung zu einem immer größeren Problem geworden. Viele Patienten leiden unter einer Infektion mit Methicillin resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA ist gegen die klassischen Penicilline resistent und muss deshalb mit potenteren Antibiotika behandelt werden. Im Laufe der Zeit ist die Therapie von MRSA-Infektionen deutlich schwieriger und langwieriger geworden (Chambers & DeLeo, 2009). Außerdem sind MRSA Stämme in der Umwelt immer weiter verbreitet (Thapaliya, Taha, Dalman, Kadariya, & Smith, 2017). Auf Grund der begrenzten Therapiemöglichkeiten ist es wichtig, neue Therapieansätze zu verfolgen. Hierzu kann das bessere Verständnis der Kommunikation zwischen Staphylokokken und Wirt beitragen. In dieser Arbeit soll die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) durch Staphylokokken untersucht werden.

1.3. Aryl Hydrocarbon Rezeptor (AhR)

1.3.1. Einführung

Der AhR ist ein phylogenetisch sehr altes Protein, das in vielen lebenden Vertebraten vorkommt (Hahn, Karchner, Shapiro, & Perera, 1997). Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktorrezeptor, der sich inaktiv im Zytosol einer Zelle befindet. Er wird durch exogene oder endogene Signalstoffe, die als Liganden erkannt werden, aktiviert. Daraufhin löst der AhR in der Zelle eine Signalkaskade aus, die in der Induktion seiner Zielgene mündet (siehe 1.3.3).

Proteom-Analysen zeigen, dass der AhR in den meisten Gewebeformen des Menschen, unter anderem in der Haut, vorkommt. Allerdings gibt es Expressionsunterschiede zwischen den Geweben (Abb.3).

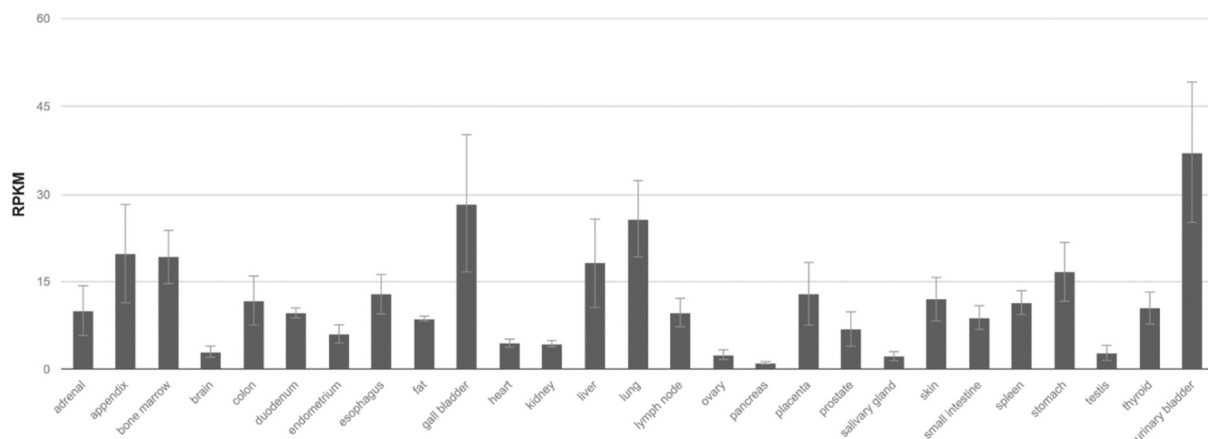


Abbildung 3: RNA-Expression des AhR. Analysen zeigen, dass der AhR in vielen Gewebeformen des Menschen exprimiert wird. Unter anderem zeigt sich eine ausgeprägte Expression in Organen, die eine Barriere zur Außenwelt bilden (Lunge, Haut). RPKM (reads per kilobase per million reads placed) (Fagerberg et al., 2014).

In den ersten 30 Jahren nach seiner Entdeckung wurde der AhR im Wesentlichen auf seine entgiftende Funktion hin untersucht. Die Forschung beschäftigte sich vor allem mit dem Schadstoff 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD). TCDD ist ein Ligand des AhR, der bei Menschen nach Exposition zur Chlorakne führt. Dabei handelt es sich um eine Erkrankung der Haut, bei der sich Akne vulgaris-ähnliche Läsionen bilden, die zu großflächigen Vernarbungen führen. Außerdem treten lebensbedrohliche Symptome wie Leberversagen auf. Ein bekanntes Opfer einer TCDD-Vergiftung ist Victor Juschtschenko (Sorg et al., 2009). Juschtschenko erkrankte in der Folge der Vergiftung an einer Gastritis, Kolitis, Hepatitis und Pankreatitis (Saurat, 2012). Im

Laufe der Zeit zeigte sich, dass der AhR auch eine physiologische Bedeutung hat, die noch nicht vollständig aufgeklärt ist (siehe 1.3.6). Im folgenden Abschnitt sollen einzelne Aspekte des AhR näher erläutert werden.

1.3.2. Aufbau des AhR

Der AhR ist ein zytosolständiger Rezeptor, der eine basic-helix loop helix/ Per ARNT-Sim (bhlh-PAS) Struktur aufweist. Diese Struktur ist charakteristisch für die Familie der Transkriptionsfaktor-Rezeptoren. Die einzelnen Domänen der Proteinstruktur des AhR und ihre Funktion sind im Folgenden näher erläutert.

Die basic helix-loop helix Domäne dimerisiert im Zellkern mit ARNT (AhR nuclear translocator) und fungiert als DNA-Bindungsstelle. Die PAS-Domäne teilt sich in eine A und eine B Subdomäne. Beide Subdomänen binden den Liganden, sind an der Dimerisierung mit ARNT und an der Hitze-Schock-Protein 90 (HSP90) Bindung beteiligt. Die glutaminreiche „Q-rich“-Domäne dient der transkriptionellen Aktivierung (Burbach, Polandt, & Bradfield, 1992; Dolwick, Swanson, & Bradfield, 1993; Ema et al., 1992; Fukunaga & Hankinson, 1996; Fukunaga, Probst, Reisz-Porszasz, & Hankinson, 1995; Kumar, Ramadoss, Reen, Vanden Heuvel, & Perdew, 2001).

In der B-Subdomäne der PAS-Domäne weist der AhR vier verschiedene Bindungstaschen für Liganden auf (Salzano, Marabotti, Milanesi, & Facchiano, 2011).

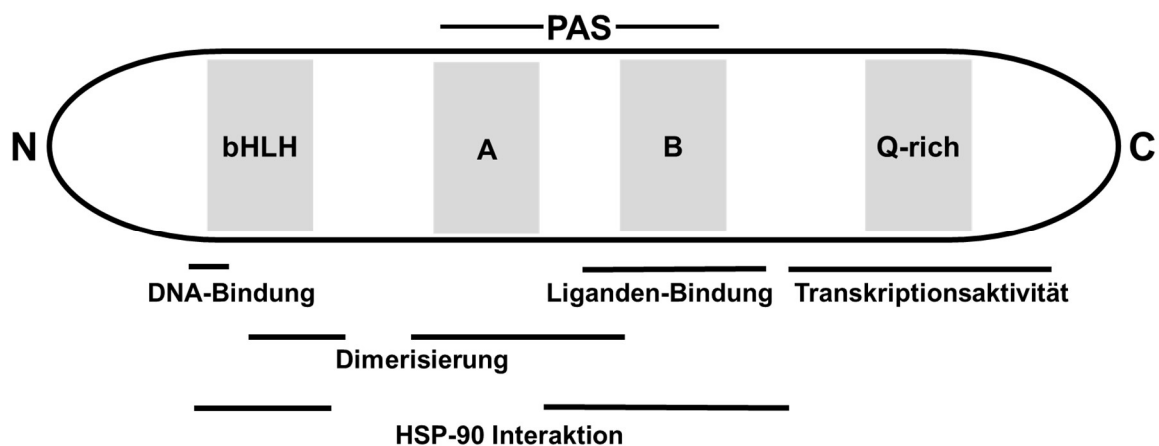


Abbildung 4: Lokalisation der funktionellen Domänen des AhR und ihre Funktionen. Schematische Darstellung des AhR vom N-Terminus (N) bis zum C-Terminus (C) des Proteins. Zu den funktionellen Domänen des AhR gehört die basic helix loop helix Domäne (bHLH) und die Per ARNT-Sim-Domäne (PAS). Die PAS unterteilt sich in einen Abschnitt A (A) und einen Abschnitt B (B). Außerdem gehört eine „Q-rich“-Domäne zu den funktionellen Domänen des AhR. Unterhalb des Rezeptors sind Funktionen den jeweiligen funktionellen Domänen zugeordnet (Erklärung siehe Text). Modifiziert nach Fukunaga et al. (1995).

1.3.3. Signalweg des AhR

Im Zytosol liegt der AhR in einem inaktiven, latenten Multienzymkomplex vor. Dazu gehören das Chaperon HSP90 (Chen & Perdew, 1994), das AhR-interagierende Protein (AIP) (Ma & Whitlock, 1997), p23 (Nair et al., 1996) und das „*rous sarcoma virus transforming protein*“ (pp60src) (Enan & Matsumura, 1996) (Abb. 5A). Das HSP90 maskiert die DNA Bindungsstelle. Dadurch wird eine hohe Affinität zu möglichen Liganden gewährleistet. AIP schützt den Rezeptor vor einem möglichen Abbau durch die Markierung mit Ubiquitin. Das p23 verhindert eine vorzeitige Translokation und unspezifische Dimerisierung mit „*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*“ (ARNT).

Bindet ein Ligand an den AhR, löst sich dieser von den Aktinfilamenten. Durch eine Konformationsänderung, die den N-Terminus der nukleären Translokationssequenz exponiert, wird die Translokation in den Zellkern erleichtert. Im Zellkern löst der AHR sich aus dem Komplex und heterodimerisiert mit dem ARNT, wodurch er in seine hochaffine DNA Bindungsform transformiert wird (Abb.5B). Anschließend bindet er an das „*xenobiotic response element*“ (XRE) der DNA und reguliert die Transkription seiner Zielgene (Abb. 5C). Dazu gehören Enzyme der Cytochrom P450-Familie, wie CYP1A1, die AhR-Liganden metabolisieren (Abb. 5D). Außerdem löst sich pp60^{src} aus dem Multienzymkomplex und phosphoryliert den „*epidermal growth factor receptor*“ (EGFR). Anschließend dimerisiert dieser und aktiviert seine Signalkaskade, die zu Zellproliferation führt (Abb. 5E) (Sato, Sato, Aoto, & Fukami, 1995). (Burbach et al., 1992; Denison & Nagy, 2003; Denison, Soshilov, He, Degroot, & Zhao, 2011; Fujisawa-Sehara, Yamane, & Fujii-Kuriyama, 1988; Perdew, 1988; Pongratz, Mason, & Poellinger, 1992).

Im folgenden Abschnitt werden die Zielgene des AhR näher beschrieben.

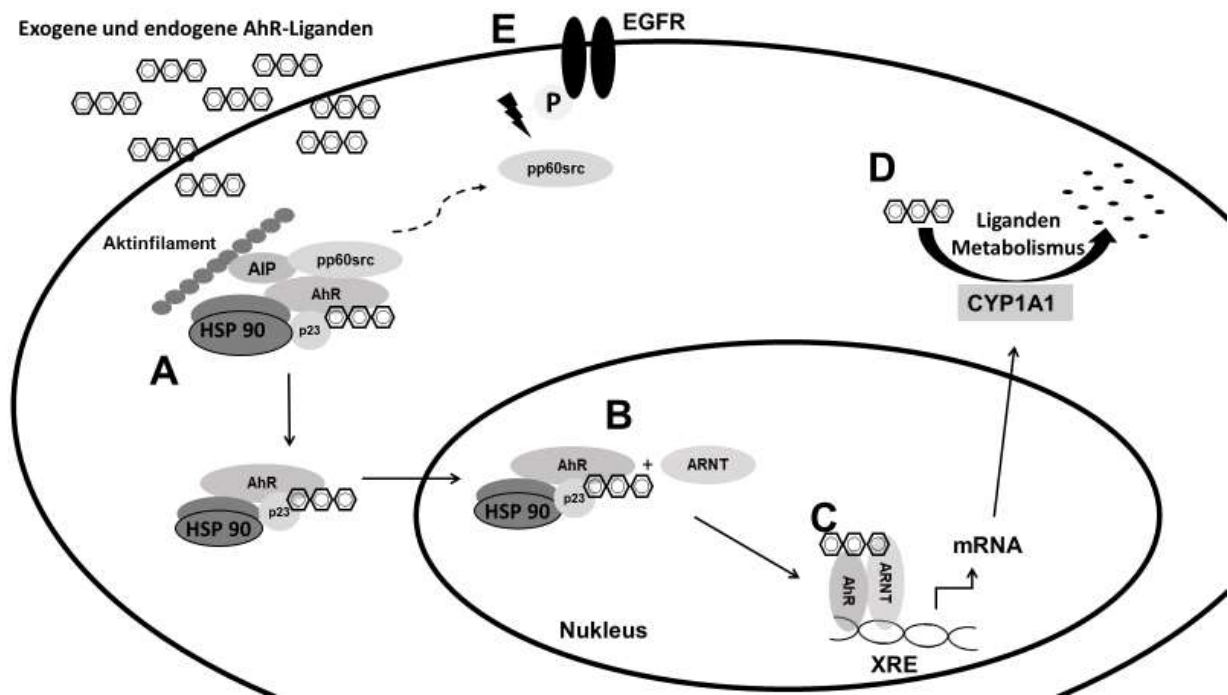


Abbildung 5: Aktivierung des AhR. (A) Der AhR befindet sich im Zytosol und ist über AIP an Aktinfilamente gebunden. Gelangt ein Ligand durch die Zellmembran und bindet an den Rezeptor, transloziert der AhR mit Hilfe von HSP90 und p23 in den Zellkern. (B) Dort dimerisiert er mit ARNT und (C) bindet an das XRE. Dort induziert er die Transkription seiner Zielgene (z. B. CYP1A1). (D) Durch die Produktion von detoxifizierenden Monooxygenasen (z.B. CYP1A1) werden die Liganden metabolisiert und können den AhR nicht mehr aktivieren. (E) Nach AhR-Aktivierung wird parallel der EGFR durch pp60^{src} aus dem Multienzymkomplex des AhR aktiviert. Modifiziert nach Stockinger et al. (2014).

1.3.4. Zielgene

Der AhR hat verschiedene Zielgene, die ein XRE in ihrer Promotorregion besitzen. Die Vielfalt von Zielgenen ist eine Erklärung für die verschiedenen Effekte, die eine AhR-Aktivierung hat. In HepG2 Zellen konnte gezeigt werden, dass 310 Gene durch TCDD-Exposition reguliert werden (Puga, Maier, & Medvedovic, 2000). Zu den regulierten Genen gehören neben dem AhR-Repressor (AhRR) (Mimura, Ema, Sogawa, & Fujii-Kuriyama, 1999) auch die detoxifizierenden Monooxygenasen (CYP450-Enzyme) (D W Nebert & Gonzalez, 1987). Außerdem gehören auch Gene, die für die Proliferation und Differenzierung von Zellen wichtig sind, zu den Zielgenen des AhR (Bock & Köhle, 2006). Der Nachweis von CYP1A1-mRNA kann als Biomarker für eine Rezeptoraktivierung verwendet werden (Heuvel et al., 1993).

1.3.5. Regulation der AhR-Aktivität

Bei der Regulation des AhR handelt es sich um eine Feedback-Inhibition. Der aktivierte AhR induziert seinen eigenen Gegenspieler AhRR. Der AhRR bildet ligandenunabhängig ein Heterodimer mit dem ARNT. Auf diese Weise konkurriert der AhRR mit dem AhR und senkt so die Transkriptionsrate der AhR induzierten Gene (Abel & Haarmann-Stemmann, 2010; Mimura et al., 1999). Allerdings scheint es weitere Mechanismen zu geben, durch die AhRR die AhR-Aktivität senkt (siehe Abb. 6) (Evans et al., 2008). Neben der Feedback-Inhibition wird der aktivierte AhR aus dem Nukleus geschleust und im Zytoplasma vom Proteasom abgebaut (Davarinos & Pollenz, 1999).

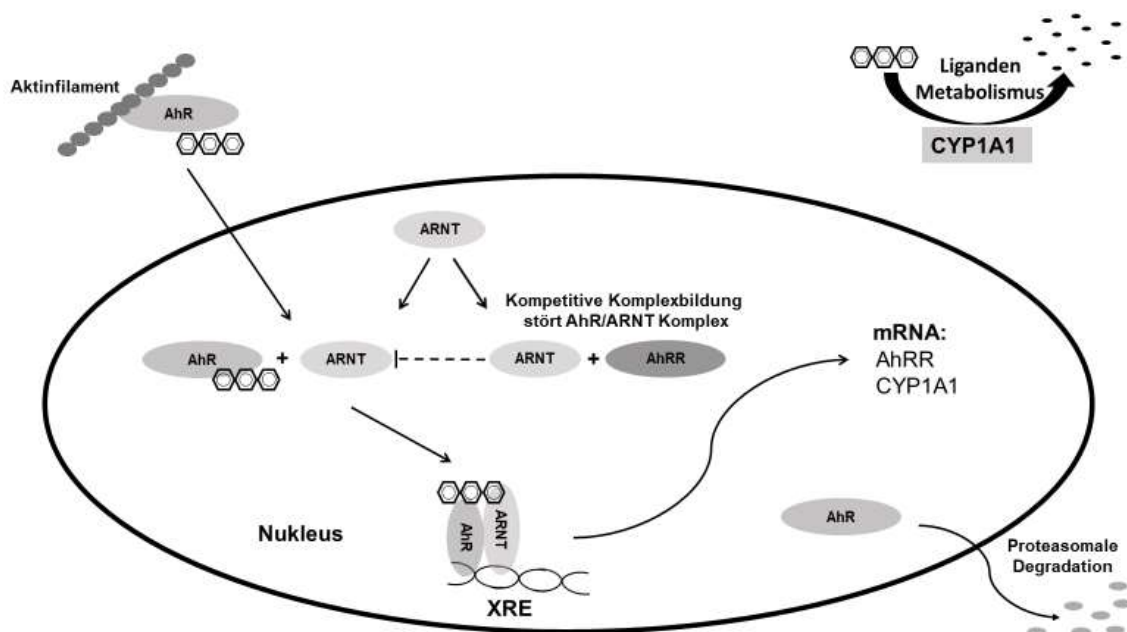


Abbildung 6: Regulation des AhR. Die Aktivität des AhR ist auf verschiedenen Ebenen reguliert. Durch Abbau der Liganden wird der AhR weniger aktiviert. Die kompetitive Komplexbildung von ARNT und AhRR stört die Bildung des AhR/ARNT-Komplexes. Außerdem wird der aktivierte AhR im Zytoplasma vom Proteasom abgebaut. Modifiziert nach Mimura et al. (1999)

1.3.6. Rolle des AhR in Keratinozyten

Der AhR wird in den Keratinozyten der *Epidermis* exprimiert, wobei die Expression des AhR und die Expression von CYP1A1 im Laufe der Differenzierung zunimmt (Jones & Reiners, 1997; Ray & Swanson, 2004; Swanson, 2004) (Abb. 7). Außerdem scheint er abhängig von der Zelldichte und dem Kontakt zwischen den Keratinozyten ligandenunabhängig aktiviert zu werden (Ikuta, Kobayashi, & Kawajiri, 2004). Deshalb wird vermutet, dass der AhR für die Differenzierung und die Funktion der Haut eine

wichtige Rolle spielt. Eine Studie belegt, dass Gene, die für die Differenzierung der *Epidermis* eine Rolle spielen, durch den AhR gesteuert werden. Hierfür wurde die AhR abhängige Expression von Fillagrin (FLG) und Hornerin (HRNR) untersucht. Es konnte histologisch dargestellt werden, dass sich die Differenzierung der *Epidermis* durch Aktivierung des AhR, mit Hilfe von Steinkohleteer, stark beschleunigt und zu einem deutlich dickeren *Stratum corneum* führt (Van Den Bogaard et al., 2013).

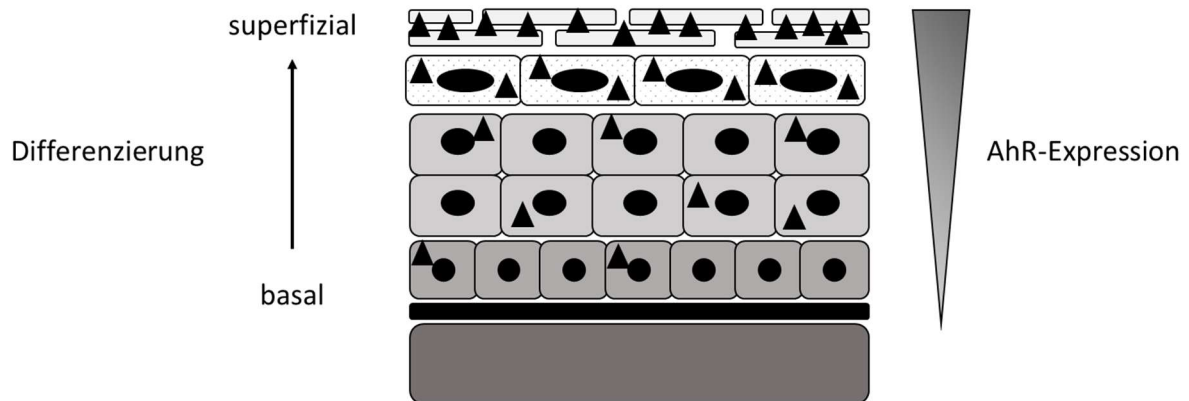


Abbildung 7: Differenzierungsabhängige AhR-Expression. Dargestellt sind die Schichten der *Epidermis*. Die Dreiecke stellen den AhR dar. An den Seiten ist links die Differenzierung der Keratinozyten von basal nach superficial angezeichnet und rechts die AhR-Expression. Modifiziert nach Swanson (2004).

Um weitere physiologische Bedeutungen des AhR herauszufinden, wurden Überexpressions- und Knockout-Studien an Mäusen durchgeführt.

So konnte z.B. festgestellt werden, dass die Ausreifung von Langerhanszellen in der *Epidermis* von Mäusen, bei denen der AhR deaktiviert wurde, gestört ist (Jux, Kadow, & Esser, 2009). Außerdem reagiert die *Epidermis* AhR-abhängig auf ultraviolettes Licht, da die Melanogenese bei AhR-deaktivierten Mäusen gestört ist (Jux et al., 2011; Öberg, Bergander, Håkansson, Rannug, & Rannug, 2005). Eine andere Studie zeigte, dass in AhR-defizienten Mäusen der transdermale Wasserverlust deutlich erhöht ist. Daraus lässt sich schließen, dass die Hautbarriere gestört ist und der AhR wichtig für die Integrität der Haut ist (Haas et al., 2016).

1.3.7. Der AhR in der Pathologie und Therapie von Erkrankungen

Der AhR ist durch eine große Bandbreite von Liganden und Zielgenen für viele Pathologien relevant. Deshalb ist eine direkte oder indirekte Beeinflussung seiner Aktivität ein möglicher Ansatz für Therapien.

Durch seine Funktion als Signalsensor ist er für die Wahrnehmung unserer Umwelt und für die Reaktion auf deren Veränderungen wichtig. Hierbei sind neben akuter Exposition mit exogenen Stoffen wie TCCD auch Vorgänge wie der Tag/Nacht-Rhythmus relevant. Es wird vermutet, dass sich die zirkadiane Rhythmik und der AhR gegenseitig beeinflussen. Durch eine Diskrepanz zwischen der inneren Uhr des Körpers und der tatsächlichen Zeit werden metabolische, immunologische und neoplastische Erkrankungen leichter erworben. Es wird vermutet, dass eine Veränderung der AhR-Aktivität hierbei eine Rolle spielt (Anderson, Beischlag, Vinciguerra, & Mazzocchi, 2013).

Neben der Reaktion auf Umweltveränderungen beeinflusst die AhR-Aktivität die Entstehung und den Verlauf von Erkrankungen. Außerdem werden auch chronisch entzündliche Hauterkrankungen durch AhR-Aktivität beeinflusst. Eine Studie von Di Meglio und Kollegen beschreibt, dass durch Stimulation des AhR die Entzündungsreaktion der Haut bei an Psoriasis erkrankten Menschen und Mäusen gedämpft wird (Di Meglio et al., 2014). Auch an dendritischen Zellen von Mäusen wurde ein immunmodulatorischer Effekt beobachtet (Simones & Shepherd, 2011).

Bei einer Untersuchung zur atopischen Dermatitis konnte gezeigt werden, dass Steinkohleteer den AhR aktiviert. Durch die Aktivierung des Rezeptors werden alle Symptome der atopischen Dermatitis abgeschwächt (Van Den Bogaard et al., 2013). Di Meglio und van den Bogaard kommen zu dem Schluss, dass man auf Grund der neuen Erkenntnisse den AhR als Ziel für neue Medikamente nutzen kann. Haas et al konnten außerdem in Studien an Mäusen zeigen, dass durch die Ernährung mit einer AhR-Liganden enthaltenden Diät die Barrierefunktion der *Epidermis* verbessert wird (Haas et al., 2016).

Neben chronisch entzündlichen Erkrankungen der Haut ist der AhR auch Mediator von Vergiftungen durch AhR-Liganden wie TCCD. In einem epidermalen Äquivalent-Modell konnte, mittels einer AhR-Deaktivierung, gezeigt werden, dass eine phänotypische Chloraknereaktion AhR-abhängig ist (Forrester et al., 2014). Außerdem ist beschrieben worden, dass Exposition mit verschmutzter Luft, die AhR-Liganden enthält, mit einer beschleunigten Hautalterung einher geht (Vierkötter et al., 2010). Der AhR spielt auch bei der Pathogenese von Karzinomen eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass der AhR in Adenokarzinomen der Lunge stark exprimiert ist (Lin et al.,

2003) und beim Ovarialkarzinom die Zellproliferation durch TCDD gehemmt wird (Y. Li et al., 2014).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der AhR Ziel neuer Therapien sein kann, sodass die Beeinflussung der Aktivität des AhR eine therapeutische Möglichkeit darstellen könnte.

1.3.8. Inhibition des AhR-Signalweges

Auf Grund der Beteiligung an verschiedenen Pathologien ist eine pharmakologische Inhibition des AhR-Signalweges relevant. Beispielsweise könnte so eine Vergiftung mit TCDD gedämpft werden.

Zu den natürlichen Inhibitoren gehört das Curcumin, welches aus dem Rhizom der Kurkuma Pflanze gewonnen wird. (Nishiumi, Yoshida, & Ashida, 2007). Außerdem gibt es auch synthetische Stoffe, wie das α -Naphthoflavon (α -NF) (Merchant, Arellano, & Safe, 1990). In dieser Arbeit wird zur Inhibierung des AhR CH-233191 verwendet, welcher der erste beschriebene spezifische Antagonist ist (Zhao, Degroot, Hayashi, He, & Denison, 2010).

1.3.9. Liganden des AhR

Die Liganden des AhR werden nach ihrer Herkunft in endogene und exogene Liganden unterschieden. Exogene Liganden können synthetisch oder natürlich sein. Potentielle AhR Liganden benötigen verschiedene Eigenschaften, damit sie den zytosolständigen AhR erreichen können. Da sie die Zellmembran überwinden müssen, sind sie klein und hydrophob. In der Literatur bekannte Liganden weisen alle eine ähnliche chemische Struktur auf, die diese Eigenschaften erfüllen. Es handelt sich um planare, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH), die z.T. halogeniert sind (Nguyen & Bradfield, 2008).

Mittels eines bioinformatischen Modells konnte gezeigt werden, dass der AhR vier Bindungstaschen für Liganden besitzt. Daraufhin wurde die Affinität verschiedener endogener und exogener Liganden für diese Bindungstaschen untersucht. Es zeigte sich, dass Liganden unterschiedliche Taschen bevorzugen und teilweise an mehrere binden (Salzano et al., 2011).

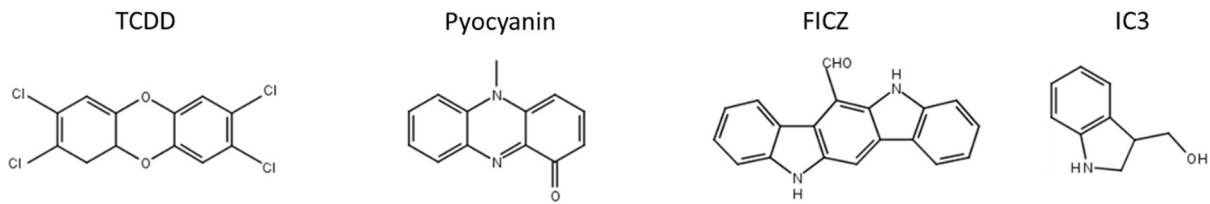


Abbildung 8: Verschiedene AhR-Liganden: 2,3,7,8-Tetrachlordibenzodioxin (TCDD), Pyocyanin, 6-Formylindolo(3,2-b) carbazol (FICZ), Indol(3,2-b) carbazol.

AhR-Liganden werden auch von Bakterien gebildet. Es wurden *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) und *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) untersucht und festgestellt, dass diese Liganden sezernieren, die den AhR aktivieren.

P. aeruginosa produziert den Liganden Pyocyanin. *M. tuberculosis* produziert das Naphthoquinon Phthiocol. Folglich erkennt der AhR neben exogenen Giftstoffen wie TCDD auch Liganden bakteriellen Ursprungs. Er wird deshalb als „Pattern recognition receptor“ (PRR) bezeichnet (Moura-Alves et al., 2014).

Eine weitere Studie zeigte, dass Laktobazillen unter einer Tryptophan-haltigen Diät vermehrt Tryptophan-Metabolite bilden. Einige dieser Tryptophan-Metabolite konnten den AhR aktivieren. Dazu gehört auch Indol-3-Aldehyd (Zelante et al., 2013). 2014 wurden Daten publiziert, die belegen, dass *Malassezia* Hefen in der Lage sind, Indole wie z.B. das Indol-3-Carbinol, zu produzieren, die den AhR aktivieren können (Magiatis et al., 2014). Im Folgenden ist der Tryptophan-Metabolismus dargestellt und bekannte AhR-Liganden markiert.

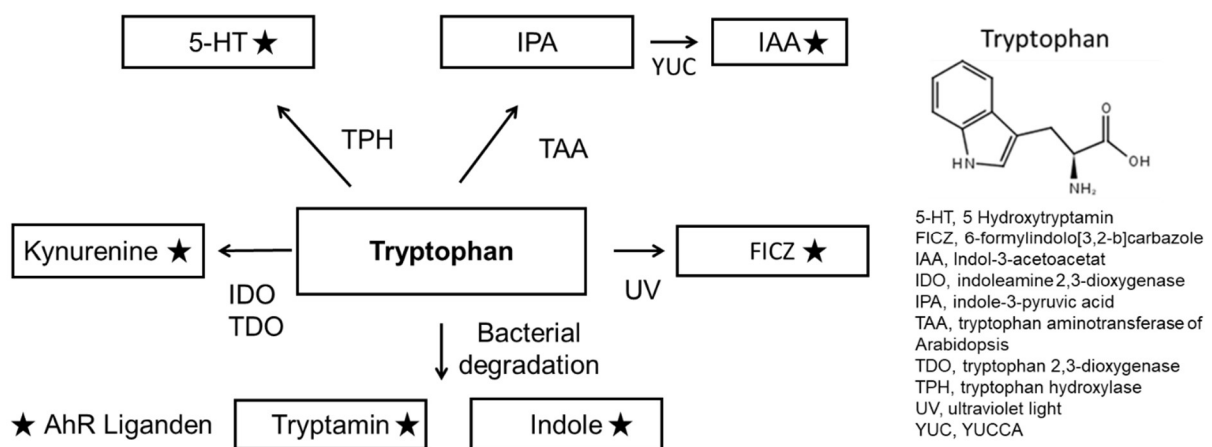


Abbildung 9: Darstellung des Tryptophan-Metabolismus. Es werden verschiedene Metabolisierungen von Tryptophan dargestellt, die teilweise zur Bildung von AhR-Liganden führen. AhR-Liganden sind in der Abbildung mit einem Stern markiert; modifiziert nach (Zelante et al., 2013).

1.4. Ziel der Arbeit

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Harder konnte gezeigt werden, dass nicht nur lebende Staphylokokken, sondern auch ihre Kulturüberstände den AhR aktivieren. Daraufhin sollten mögliche Aktivatoren des AhR im Kulturüberstand von Staphylokokken näher charakterisiert werden.

Das Ziel dieser Arbeit ist das bessere Verständnis des Zusammenhangs zwischen dem Kommensalen *S. epidermidis* und dem AhR. Anschließend werden auch Kulturüberstände von *S. aureus*, als potentiell pathogener Erreger, im Zusammenhang mit dem AhR untersucht werden.

Zunächst sollen Kulturüberstände von Staphylokokken hergestellt werden, die in der Lage sind, den AhR zu aktivieren. Da der Tryptophan-Metabolismus ubiquitär in Bakterien vorkommt und bereits Tryptophan-Metabolite von Bakterien als Aktivatoren des AhR bekannt sind, könnte ein Tryptophan-Metabolit der gesuchte Aktivator in einem Kulturüberstand von Staphylokokken sein. Deshalb werden die Bakterien in Nährmedium mit unterschiedlichen Tryptophan-Konzentrationen kultiviert und die daraus gewonnenen Kulturüberstände auf ihr Aktivierungspotenzial für den AhR untersucht. Der gesuchte Aktivator ist vermutlich ein PAH und kleiner als 2 kDa, weshalb Kulturüberstände, die in der Lage sind den AhR zu aktivieren, <2 kDa filtriert werden sollen. Bleibt die Aktivität des <2kDa-filtrierten Kulturüberstands erhalten, werden diese Kulturüberstände mit Hilfe der HPLC fraktioniert. Durch weitere Stimulationen von Keratinozyten mit den Fraktionen aus der HPLC wird festgestellt, in welchen Fraktionen AhR-Liganden vorhanden sind. Diese Fraktionen werden im Massenspektrometer (MS) genauer untersucht, um mögliche Aktivatoren zu identifizieren. Die gewonnenen Erkenntnisse geben also nicht nur Aufschluss über verschiedene Eigenschaften des gesuchten Stoffes, sondern möglicherweise sogar konkrete Hinweise auf einen möglichen Aktivator des AhR.

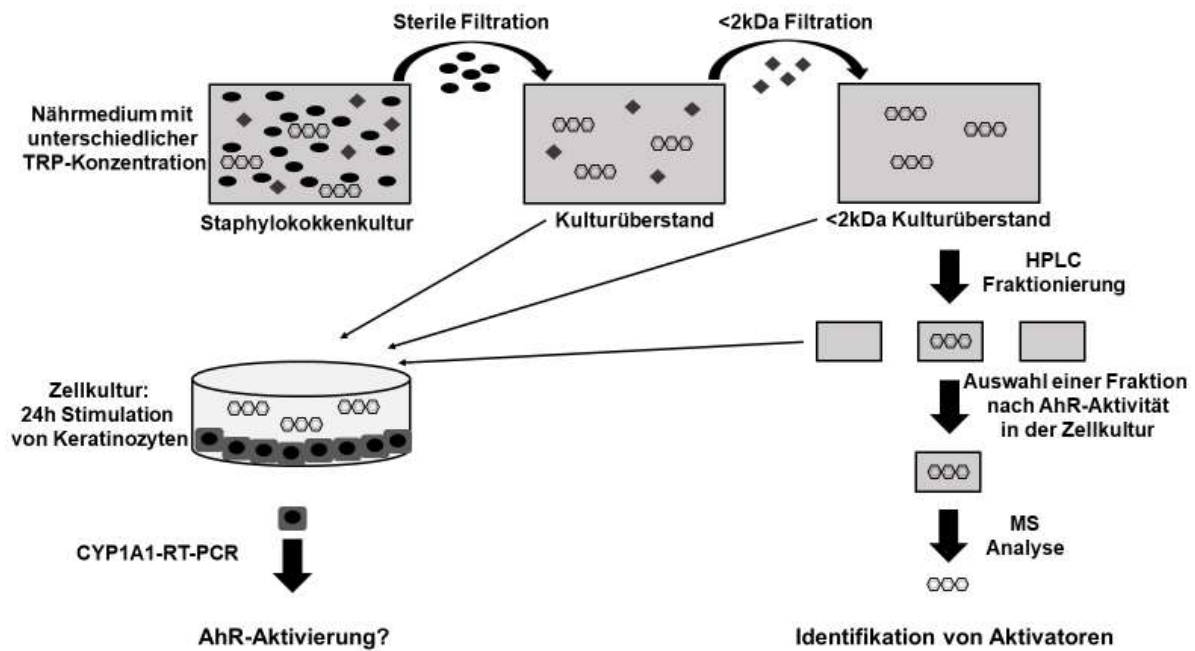


Abbildung 10: Konzept der Arbeit. Es sollen Kulturüberstände von Staphylokokken hergestellt werden, die in Nährmedien mit unterschiedlichen Tryptophan-Konzentrationen kultiviert werden. Es soll gezeigt werden, dass diese Kulturüberstände in der Lage sind den AhR in Keratinozyten zu aktivieren. Anschließend sollen die Kulturüberstände <2kDa filtriert werden und erneut die AhR-Aktivierung gezeigt werden. Dieser Kulturüberstand soll mittels HPLC fraktioniert werden und AhR aktivierende Fraktionen ermittelt werden. Diese Fraktionen sollen mit Hilfe der MS analysiert und die ermittelten Massen möglichen Liganden zugeordnet

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Blutagar-Platten	BioMérieux, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂)	PromoCell, Deutschland
Caso Broth	Sigma-Aldrich, Deutschland
cDNA-Synthese-Kit (PrimeScript™)	Takara Bio Europe/ Clontech, Frankreich
CH223191 (AhR-Antagonist)	Cayman Chemical Company, USA
Chloroform ≥ 99 %	Sigma-Aldrich, Deutschland
Einfriermedium (Cryo-SFM)	PromoCell, Deutschland
RNA-Isolations-Kit (Crystal RNAmagic)	Biolabproducts, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Deutschland
Ethanol ≥ 99,8%	Carl Roth, Deutschland
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories, Germany
Transfektionsreagenz Fugene HD	Promega, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega, Deutschland
L-Glutamin (200mM)	Gibco, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biowest, Frankreich
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco, Deutschland
pGudLuc 6.1	Department of Environmental Toxicology, University of California, USA
pGL4.74 [hRluc/TK]	Promega, Deutschland
Select Agar	Sigma-Aldrich, Deutschland
SYBR-Green Premix Ex Taq™ II	Takara Bio Europe/Clontech, Frankreich
Trypsin-EDTA (0,05%)	PAA Laboratories, Deutschlan

Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low Glucose	Biowest, Frankreich
Keratinocyte Growth Medium (KGM 2)	PromoCell, Deutschland
KGM2 Supplement Mix	PromoCell, Deutschland
RPMI1640 (w/o L-Glutamine)	Gibco, Deutschland

Zellkulturmedien

Zusammensetzung

DMEM (++)	500 ml DMEM 50 ml FKS 5 ml L-Glutamin
Vollmedium plus KGM2 (+++)	500 ml KGM2 Basalmedium Supplement Mix 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S)
Vollmedium KGM2 (++)	KGM2 (+++) Supplement Mix
Minimalmedium KGM2 (--)	500 ml KGM2 Basalmedium
RPMI (+++)	500 ml RPMI1640 50 ml FKS 5 ml P/S

Bakterienkulturlösungen und -platten

TSB-Medium	Caso Broth 30 g H ₂ O <small>dest.</small> ad 1 l autoklavieren
TSB-Agar-Platten	TSB-Medium 15 g/l Select-Agar autoklavieren und in Petrischalen gießen

Humane Zellen

Zellen

Hersteller

HaCaT

DKFZ, Heidelberg

NHEK

PromoCell, Deutschland

Bakterien

S. aureus 8325-4

Laborstamm

S. epidermidis 12034044

klinisches Isolat aus dem
Universitätsklinikum Kiel

Oligonukleotide

Primer

Sequenz

Oligo (dT)

(T)₁₈

CYP1A1 forward

5'-3' CACCATCCCCCACAGC

CYP1A1 reverse

5'-3' ACAAAGACACAACGCCCTT

RP38 forward

5'-3' TCAAGGACTTCCTGCTCACA

RP38 reverse

5'-3' AAAGGTATCTGCTGCATCGAA

Geräte	Hersteller
Bio-Photometer	Eppendorf, Deutschland
Brutschrank Zellkultur	Binder, Deutschland
Einfrierhilfe Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Koloniezählgerät	Synoptics Ltd., UK
Luminometer	Promega, Deutschland
Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Realtime PCR-System	Applied Biosystems, USA
Mikroskope	Diavert Leitz, Deutschland Hund Wetzlar, Deutschland
Thermocycler	Biometra, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Deutschland
Äktamicro System	GE Life Sciences
Superdex Peptide PC3.2/30	Amersham Biosciences

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Amicon Ultra-15, PLBC	Merck Millipore, Deutschland
Ultracel-PL Membran, 2kDa	
Belüftungsröhrchen (13ml)	Sarstedt, Deutschland
Folie für qPCR-Platten	Sarstedt, Deutschland
Kryoröhrchen (1,8ml)	Nunc, Deutschland
Küvetten	Sarstedt, Deutschland
Nunc, 96-Lochplatte	Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen (20, 100, 1000 µl)	Sarstedt, Deutschland
Präzisionswaage	Kern & Sohn, Deutschland
Probenröhrchen (0,5, 1,5 ml)	Sarstedt, Deutschland
qPCR 96-Loch Flachbodenplatte	Sarstedt, Deutschland
qPCR 8-er PCR-Reagenzgefäße und Deckel	Applied Biosystems, USA
Sterilfilter 0,22µm	Sarstedt, Deutschland
Serologische Einmalpipetten	Sarstedt, Deutschland
Zellkulturflaschen T75	Sarstedt, Deutschland

Zellkulturplatten 24 Loch	Corning, Deutschland
Zellsieb (Falcon, 40 µm)	BD Bioscience, Deutschland
Zentrifugenröhrchen (2, 15, 50 ml)	Sarstedt, Deutschland

Software

Hersteller

Statistiksoftware	GraphPad Prism®5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)
Kalkulations-/Darstellungssoftware	Microsoft, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

In dieser Arbeit wurde der Stamm *Staphylococcus epidermidis* 12034044 (klinisches Isolat) oder *Staphylococcus aureus* 8325-4 verwendet. Zur Zellstimulation wurde der Kulturüberstand der Keime eingesetzt. Im Folgenden werden die mikrobiologischen Methoden zur Kultivierung und Herstellung von Kulturüberständen erläutert. Alle mikrobiologischen Arbeitsschritte wurden unter einer Sicherheitswerkbank steril durchgeführt.

2.2.1.1. Kultivierung von Mikroorganismen

Der Keim wurde aus einem Glycerin-Stock (-80°) mittels eines Dreiösenausstrichs auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.2. Herstellung von Kulturüberständen

Von einer Blutagarplatte wurden mehrere Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und in ein mit 8 ml „Tryptic Soy Broth“ (TSB) gefülltes Belüftungsröhrchen gerührt. Anschließend wurde die Lösung über Nacht in einem Schüttelinkubator (200 rpm) bei 37 °C inkubiert. Um die Bakterien in der linearen Wachstumsphase zu halten, wurden am folgenden Morgen 250 µl der Bakteriensuspension in ein neues TSB-Röhrchen überimpft und weitere 4 Std. bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von ungefähr 1,0 inkubiert. Danach wurde der Keim für 5 min mit 8500 g bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde einmal mit „Phosphate buffered Saline“(PBS) gewaschen und der Keim in Minimalmedium aufgenommen. Für die Versuche wurden unterschiedliche Tryptophan-Konzentrationen verwendet, die jeweils vorher in das Minimalmedium eingewogen wurden. Mithilfe des Minimalmediums wurde die OD_{600} auf 0,2 eingestellt und die Suspension in einen Erlenmeyerkolben überführt. Als Kontrolle wurde in einen zweiten Kolben lediglich Minimalmedium, ohne Keim gegeben. Außerdem wurde der Ansatz 1:10000 auf TSB-Agar-Platten ausplattiert, um eine Reinheitskontrolle durchzuführen und einen Ausgangswert (T_0 -Wert) zu erhalten. Der T_0 -Wert wurde nach 24 Std. Inkubation im Brutschrank durch auszählen der „colony forming units“ (CFU) bestimmt.

Die Erlenmeyerkolben wurden für 24 Std. im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt und das Kulturmedium 1:100.000 ausplattiert. Durch Bestimmung der OD₆₀₀ und der CFU konnte das Wachstum bei verschiedenen Tryptophan-Konzentrationen verglichen werden. Der Keim wurde anschließend abzentrifugiert (5 min, 8500 g, RT) und der Überstand steril filtriert (0,22 µm). Der auf diese Weise gewonnene Kulturüberstand wurde bei -20 °C gelagert und für Stimulationen verwendet.

2.2.1.3. Größenfiltration von Kulturüberständen

Teilweise wurden die Kulturüberstände mit einem Zentrifugalfilter nach Größe aufgetrennt. Der Zentrifugalfilter unterteilte den Kulturüberstand in zwei Fraktionen: Das zurückbleibende Retentat (>2 kDa) und das filtrierte Permeat (<2 kDa). Permeat und Retentat wurden erneut steril filtriert, anschließend bei -20 °C gelagert und für Stimulationen oder Gelchromatographien eingesetzt.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Verwendete Keratinozyten

NHEK

Bei „normal human epidermal keratinocytes“ (NHEK) handelt es sich um primäre Keratinozyten. Diese wurden aus der Epidermis juveniler Vorhäute gewonnen.

HaCaT

„Human adult low Calcium high Temperature“ (HaCaT) sind spontan immortalisierte Keratinozyten, die aus einem Melanom der Rückenhaut isoliert wurden (Boukamp et al., 1988). Sie lassen sich deutlich leichter kultivieren und ihre hohe Teilungsrate ermöglicht es, viele verschiedene Stimuli in großen Ansätzen zu testen. Zudem können Fehlerquellen durch unterschiedliche Spender oder Differenzierungsgrade ausgeschlossen werden.

Die Keratinozyten wurden in Zellkulturflaschen (T75-Flaschen) kultiviert und die Nährmedien DMEM (HaCaT) bzw. KGM2 (NHEK) alle zwei Tage gewechselt. Die Keratinozyten wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ unter humider Atmosphäre kultiviert.

2.2.2.2. Subkultivierung von NHEK und HaCaT

Die Subkultivierung erfolgte, wenn die adhärennten Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht hatten. Die Konfluenz wurde mikroskopisch beurteilt. Zu Beginn wurde das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA für 5 min im Brutschrank inkubiert, wodurch sie enzymatisch vom Flaschenboden gelöst wurden. Anschließend wurde mikroskopisch überprüft, ob sich alle Zellen gelöst hatten. Hafteten noch Zellen am Flaschenboden, wurden diese durch Klopfen und Schütteln gelöst. Für die Ablösung von HaCaT-Keratinocyten wurde zusätzlich ein Zellschaber verwendet. Um die Trypsinaktivität zu beenden, wurde 10 ml serumhaltiges Medium (DMEM++-) dazu gegeben. Durch eine anschließende Zentrifugation (5 min, 200 g, RT) bildete sich ein Zellpellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in neuem Zellkulturmedium aufgenommen. Die resuspendierten Keratinocyten wurden dann in sterile Zellkulturflaschen oder auf sterile Zellkulturlochplatten gegeben. HaCaT-Keratinocyten wurden vorher durch ein Zellsieb gegeben, um die Bildung von Zellkonglomeraten zu vermeiden.

2.2.2.3. Kryokonservierung von NHEK und HaCaT Zellen

Die Kryokonservierung ermöglicht die Lagerung von Zellen. Dafür wurden die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst und abzentrifugiert (siehe Subkultivierung). Das Pellet wurde zur Kryokonservierung in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein Kryoröhrchen gegeben. Dieses wurde in einer Einfrierhilfe (Mr. Frosty) in einen -80 °C Gefrierschrank gestellt. Die Einfrierhilfe umgibt das Kryokonservierungsröhrchen mit Isopropanol, sodass die Temperatur im Röhrchen lediglich um 1 °C pro Minute fällt. Durch die langsame Temperatursenkung werden Zellschädigungen vermieden. Nach 24 Std. im -80 °C Gefrierschrank wurde das Kryokonservierungsröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt. In flüssigem Stickstoff können die Zellen für einen langen Zeitraum gelagert werden, ohne ihre Funktionalität zu verlieren.

2.2.2.4. Stimulation von Keratinocyten

Nach der Herstellung von Bakterienkulturüberständen wurden diese für Stimulationen eingesetzt. Dafür wurden die Keratinocyten zunächst auf 24-Lochplatten ausgesät (siehe Subkultivierung). Sobald die Keratinocyten eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten oder mit der Differenzierung begonnen haben, wurden sie stimuliert. Zunächst

wurde das Medium abgesaugt. Anschließend wurde der Bakterienkulturüberstand mit Minimalmedium 1:2 verdünnt und 300 µl in jedes Loch gegeben. Die Platte wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Morphologie der Keratinozyten im Mikroskop beurteilt. Um die Stimulation zu beenden, wurde der Überstand abpipettiert. Darauf folgten molekularbiologische Untersuchungen der Keratinozyten. Der abpipettierte Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5. Stimulation mit einem AhR Inhibitor

Um den AhR zu inhibieren, wurden die Zellen 1,5 Std. vor einer Stimulation mit dem spezifischen AhR-Inhibitor CH-223191 vorinkubiert. Der Inhibitor wurde 10 µM eingesetzt und verblieb während der Stimulation auf den Zellen.

Transiente Transfektion von Keratinozyten

Für Luziferaseversuche wurden Keratinozyten bei 70 % Konfluenz transient mit Plasmiden transfiziert. Die DNA-Konzentration des Plasmids wurde am Spektralphotometer bestimmt, um die einzusetzende Plasmidmenge zu berechnen. Zur Transfektion wurde ein Ansatz aus 300 ng/Loch GudLuc6.1, 20 ng/Loch pGL4.74 [hRluc/TK], 1 µl/Loch Transfektionsreagenz (Fugene® HD) und Minimalmedium hergestellt. Der Ansatz wurde 15 min bei RT stehen gelassen. Es erfolgte zunächst ein Mediumwechsel mit 200 µl KGM2 (++-), anschließend wurde zu jedem Loch tröpfchenweise 100 µl Transfektionsansatz gegeben. Die Keratinozyten wurden für 6 Std. im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz abgenommen, die Keratinozyten einmal mit PBS gewaschen und neues Kulturmedium (KGM2(++-)) auf die Zellen gegeben. Dann wurden die Zellen weitere zwei Tage im Brutschrank kultiviert, bis sie annähernd eine Konfluenz von 100 % erreicht hatten und stimuliert werden konnten.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA Isolierung

Nach Beendigung der Stimulation wurden die Keratinozyten auf der Platte mit 300 µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung durch die *single-step* Methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski & Sacchi, 1987) unter dem Abzug. Um die RNA zu isolieren, wurde zunächst für 10 min ein Reagenz zu den

Keratinocyten gegeben (RNA Magic), welches durch das enthaltene Guanidiniumthiocyanat die Zellen lysiert und RNAsen und andere Enzyme inaktiviert. Nach der Inkubationszeit wurde das Lysat von der Platte in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. Anschließend wurden 60 µl Chloroform hinzugegeben und die Probe für 15 min mit 10000 g bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch bildeten sich drei Phasen, die RNA-haltige wässrige Phase, die Interphase und die untere Phase. Die RNA aus der oberen, wässrigen Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Röhrchen überführt.

Danach wurden 300 µl Isopropanol dazugegeben und der Inhalt des Röhrchens durch Überkopfwenden 15 s gemischt. Anschließend wurde das Röhrchen etwa 10 min bei RT stehen gelassen, um die RNA auszufällen. Im Folgenden wurde das Röhrchen für 10 min mit 10000 g bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Isopropanol verworfen, 150 µl Ethanol (75 %ig) dazu gegeben und das Röhrchen mittels eines Vortexers geschüttelt, um das Präzipitat zu waschen. Dieses wurde erneut für 5 min mit 10000 g bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde das Ethanol verworfen und der Waschschritt wiederholt. Das Präzipitat wurde für 10 min bei RT getrocknet. Zuletzt wurde das Präzipitat in 12 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei -80 °C zwischengelagert oder zur cDNA-Synthese weiterverwendet.

2.2.3.2. Reverse Transkription

Zunächst wurde die RNA-Konzentration jeder Probe mithilfe eines Spektralphotometers bei 260 nm bestimmt. Um die RNA in cDNA umzuschreiben, wurde nach Herstellerangaben ein Mastermix pipettiert. Dieser enthielt die umzuschreibende RNA, einen Puffer, Oligo (dT) und eine Reverse Transkriptase. Abhängig von der zuvor bestimmten Konzentration wurde das jeweilige Mischungsverhältnis jeder Probe so angepasst, dass jeweils 0,5 µg RNA umgeschrieben wurden.

Nachdem der Ansatz auf dem Vortexer geschüttelt und nachfolgend kurz zentrifugiert worden war, wurden die Proben in den Thermocycler gegeben. Es erfolgte zuerst ein Inkubationsschritt für 5 min bei 65°C, danach begann die 30-minütige cDNA-Erststrang-Synthese bei 42°C und eine abschließende Inkubation bei 85°C für 5 min. Die Proben wurden auf 4°C abgekühlt und mit 40 µl RNase-freiem Wasser auf 50 µl

Gesamtvolumen aufgefüllt, dies entspricht einer Konzentration von 10 ng/µl. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.3.3. Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) basiert auf dem Prinzip einer klassischen PCR, die der Vervielfältigung von DNA dient. Die qPCR umfasst die Reaktionsschritte Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Um eine qPCR durchzuführen, wird eine definierte Menge der zu vervielfältigenden DNA als Vorlage benötigt. Außerdem benötigt man eine hitzebeständige Taq-Polymerase, da hohe Temperaturen erforderlich sind, um die DNA-Stränge voneinander zu trennen. Schließlich wurden mit Hilfe von zwei Primern (*forward* und *reverse*) die Startpunkte für die Polymerase festgelegt. Für einen quantitativen Mengenvergleich zwischen den Proben wurde ein fluoreszierender Stoff (SYBR Green) verwendet. Dieser interkaliert unspezifisch in Doppelstrang-DNA und fluoresziert bei 560 nm.

Für einen Ansatz benötigt man 1 µl cDNA (entspricht 10ng Gesamt-RNA), 3 µl H₂O und 0,4 µl von jedem Primer. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde 5,2 µl SYBR Green dazugegeben. Als Reaktionsgefäß wurde entweder eine 96-Lochplatte oder ein 8er-PCR-Reagenzgefäßstreifen verwendet. Nachdem die Löcher luftdicht verschlossen worden sind, wurden die Proben abzentrifugiert (200 g, 1 min). Anschließend wurden die Proben mit einem Real-Time PCR System (StepOnePlus) analysiert.

Die Genamplifikation erfolgte nach einem Zweischritt-*touchdown*-Programm:

1. 30 s 95°C Anfangsdenaturierung
2. 30 s 66°C Elongation
3. Abfall der Elongationstemperatur um 1°C pro Zyklus (5 s, 95 °C + 30 s Elongation) von 66 °C auf 60 °C
4. 40 Zyklen mit 5 s 95 °C Denaturierung und 30 s 60 °C Elongation

Zum Schluss wurde eine Schmelzkurve erstellt. Dafür wurde die Temperatur schrittweise von 60 °C auf 95 °C erhöht und alle 15 s die Fluoreszenz gemessen. Die Schmelzkurve dient der Kontrolle zur Spezifität des qPCR-Produkts.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die Regression einer Standardkurve, die für jedes Primerpaar vorher erstellt wurde, einbezogen. Um eine Standardkurve zu

erhalten, wurde cDNA mit ausreichender Expressionsmenge heruntertitriert. Um einen internen Expressionsstandard festzulegen, wurde ein sogenanntes *housekeeping-Gen* mitgemessen. Das *housekeeping-Gen* wird von Epithelzellen konstant exprimiert und nicht durch die experimentellen Stimulationen reguliert. In unserer Arbeitsgruppe wurde das ribosomale Protein L38 (*RPL38*) verwendet. Für die Auswertung der Messungen wurde der Quotient aus dem Standardtranskriptionslevel und dem gemessenen Gen gebildet. Hieraus ergibt sich die relative mRNA-Expression. Die statistischen Analysen wurden mit einer Software (GraphPad Prism) durchgeführt.

2.2.3.4. Dual-Luciferase® Reporterassay

In Reporterassays wird die eukaryotische Genexpression mittels Biolumineszenz-Reaktionen gemessen. Um eine Expressionserhöhung von CYP1A1 messen zu können, wurde eine Ko-Transfektion durchgeführt (siehe 2.2.2.6.). Zum einen wird ein konstitutiv exprimiertes Kontroll-Reportergen, welches zur Normierung genutzt wird, zum anderen das experimentelle Reporter gen für das AhR-Zielgen CYP1A1 in die Zellen eingebracht. Die Ko-Transfektion ermöglicht es, beide Reporter gene in einem System simultan zu messen. Die Zuordnung der Gene gelingt durch unterschiedliche Substrate der transfizierten Luziferasen.

Nach Transfektion und Stimulation der Keratinozyten wurden die Zellen für die Luziferasemessung vorbereitet. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Keratinozyten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl Lysepuffer auf einem Schüttler für 20 min bei RT lysiert. Danach wurde zu 10 µl des Zelllysats 50 µl „Luciferase Assay Reagenz II“ (LARII) gegeben. Zuerst wurde der experimentelle Reporter, die sogenannte *firefly* Luziferase, im Luminometer bei einer Sensitivität von 70 % gemessen. Danach wurde 50 µl Stop&Glow™ hinzugegeben. Auf diese Weise wurde das Signal der *firefly* Luziferase unterdrückt und es erfolgte die substratspezifische Luziferaseaktivitätsmessung des Kontroll-Reporter gens (*Renilla*-Luziferase). Durch Bildung des Quotienten aus *Renilla*- und *firefly*-Luziferaseaktivität wurde die relative Luziferaseaktivität des Reporter gens bestimmt.

2.2.3.5. Gel-Permeations-Chromatographie

Die Gel-Permeations-Chromatographie trennt unterschiedlich große Moleküle abhängig von ihren verfügbaren Diffusionsvolumina auf. Als stationäre Phase der

Säule wird ein poröses Polymer verwendet, in deren Zwischenräume Moleküle ab einer bestimmten Größe nicht mehr eindringen können. Kleinere Moleküle dringen in die Poren ein, wodurch ihre Elution verzögert wird.

Die Gel-Permeations-Chromatographie wurde freundlicherweise von Dr. Bartels durchgeführt. Hier wurde diese Methode verwendet, um die <2kDa filtrierte Kulturüberstände von *S. epidermidis* aufzutrennen. Dafür wurde eine Superdex Peptide PC 3.2/30 Säule verwendet. Diese Säule trennt Biomoleküle mit molekularen Gewichten von 100 bis 7000 auf.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen mit Kulturüberständen von *S. epidermidis*

3.1.1. Kulturüberstände von *S. epidermidis* induzieren AhR-abhängig CYP1A1

Zunächst wurde mittels eines Luziferase-Assays gezeigt, dass CYP1A1-Aktivität in humanen Keratinozyten AhR-abhängig durch einen Kulturüberstand von *S. epidermidis* induziert wird. Hierzu wurden primäre Keratinozyten mit dem Reporterplasmid pGudLuc 6.1 transfiziert und teilweise mit einem AhR-Inhibitor (CH-223191) inkubiert. Anschließend wurden die Keratinozyten mit einem Kulturüberstand von *S. epidermidis* stimuliert. Nach der Stimulation wurde eine signifikante Induktion der Luziferaseaktivität gemessen. Diese konnte durch eine Inhibierung des AhR mit CH-223191 signifikant gehemmt werden (Abb. 12 A). Weiterhin wurde nach Stimulation von Keratinozyten mit dem Kulturüberstand von *S. epidermidis* auch eine signifikant erhöhte Gen-Expression von CYP1A1 mittels qPCR gemessen (Abb. 12 B).

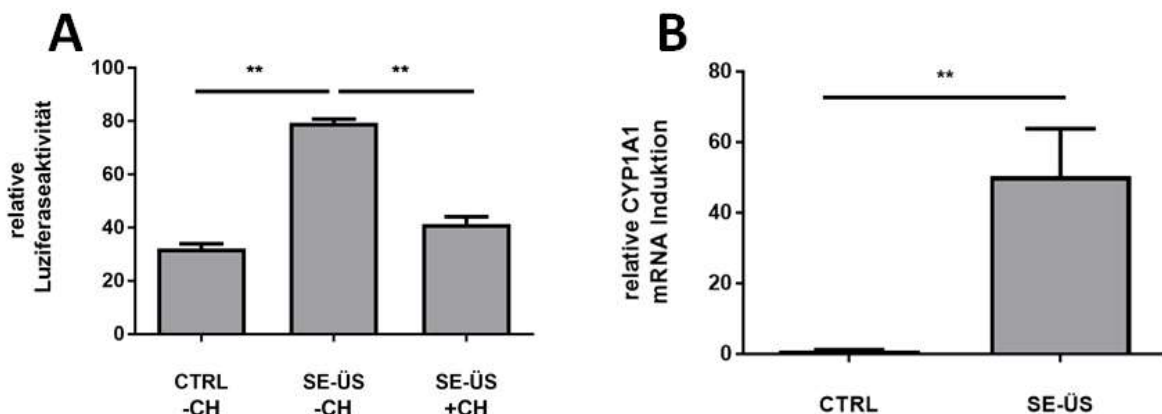


Abbildung 12: *S. epidermidis* induziert AhR-abhängig CYP1A1. (A) Um zu analysieren, ob Kulturüberstände von *S. epidermidis* CYP1A1 AhR-abhängig induzieren wurden NHEK mit dem AhR-Inhibitor CH-223191 (+CH) inkubiert bzw. nicht inkubiert (-CH). Anschließend wurde Nährmedium ohne *S. epidermidis* (CTRL), oder steril filtrierter Kulturüberstand von *S. epidermidis* (SE-ÜS), der in 15 mg/l Tryptophan gewachsen ist, 1:2 verdünnt auf NHEK-Monolayer gegeben. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit einem Luziferase Reporter Assay ausgewertet; Gezeigte Daten sind Mittelwerte und \pm SD von drei Proben (** $p < 0,01$; Student's t-Test). (B) Nährmedium ohne *S. epidermidis* (CTRL), oder steril filtrierter Kulturüberstand von *S. epidermidis* (SE-ÜS), der in 15 mg/l Tryptophan gewachsen ist wurde auf HaCaT Monolayer gegeben. Darstellung der relativen Induktion von CYP1A1-mRNA, die mittels qPCR gemessen wurde. Gezeigte Daten sind Mittelwerte und \pm SD von drei Proben (** $p < 0,01$; Student's t-Test)

3.1.2. *S. epidermidis*-Kulturen wachsen unabhängig von der Tryptophankonzentration

Da Metabolite von Tryptophan einerseits Aktivatoren des AhR und andererseits Katabolite von Bakterien sind, wurde *S. epidermidis* in Nährmedien mit unterschiedlichen Tryptophan-Konzentrationen hochgezogen. Es wurden zwei Kulturansätze (0 mg/l Tryptophan und 15 mg/l Tryptophan in RPMI) mit *S. epidermidis* 12034044 24h bei 37°C inkubiert. Um die Bildung eines Biofilms zu vermeiden, wurden die Kulturüberstände als Schüttelkultur hergestellt. Es zeigte sich, dass Tryptophan essentiell für das Wachstum von *S. epidermidis* ist. Im RPMI Medium ohne Tryptophan kam es zu keinem Wachstum von *S. epidermidis*, während eine Konzentration von 15 mg/l zu einem 10-fachen Anstieg der OD₆₀₀ über Nacht führte (Abb. 11A).

Um zu untersuchen, ob der Tryptophan-Gehalt des Mediums dosisabhängig auf das Wachstum von *S. epidermidis* wirkt, wurden Kulturüberstände von *S. epidermidis* bei verschiedenen Tryptophan-Konzentrationen kultiviert (3mg/l, 15 mg/l und 50 mg/l). Anschließend wurde die OD₆₀₀ verglichen. Es zeigte sich, dass die optische Dichte nach 24h Kultivierung in verschiedenen Tryptophan-Konzentrationen gleich war. (Abb. 11B).

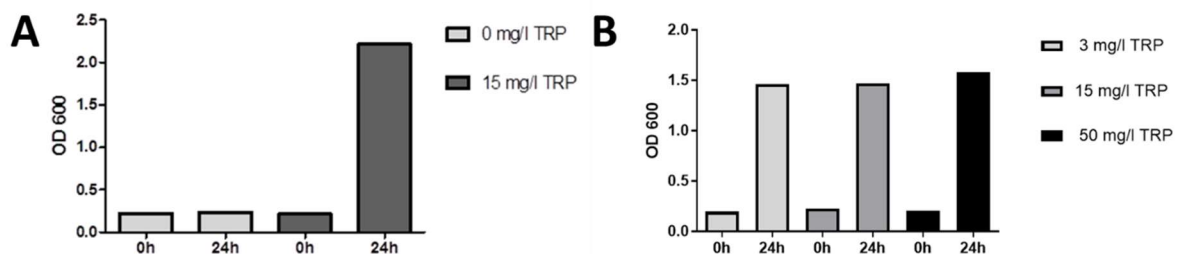


Abbildung 111: Vergleich der OD₆₀₀ nach 24h Wachstum mit verschiedenen Tryptophan-Konzentrationen. Die OD₆₀₀ wurde jeweils zu Beginn auf ca. 0,2 eingestellt. Nach 24h wurde die OD₆₀₀ erneut bestimmt, um das Wachstum zu überprüfen. Zunächst wurde die essentielle Bedeutung von Tryptophan für das Wachstum von *S. epidermidis* gezeigt (A) und anschließend ein dosisabhängiges Wachstum untersucht (B).

3.1.3. Einfluss der Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kulturüberstände von *S. epidermidis* auf die AhR-Aktivierung

Durch Stimulationen mit Kulturüberständen von *S. epidermidis* konnte gezeigt werden, dass sich der AhR in primären Keratinozyten aktivieren lässt (Hesse & Harder Kiel, n.d.). Dazu wurde mit Hilfe der qPCR die relative Induktion des AhR-Zielgens CYP1A1 bestimmt. Die Expression von CYP1A1 diene als indirekter Nachweis der AhR-Aktivierung (Heuvel et al., 1993).

Da es sich bei bekannten sezernierten AhR-Aktivatoren um Metabolite von Tryptophan handelt, sollte untersucht werden ob eine höhere Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kulturen zu einer stärkeren AhR-Aktivierung führt. Dafür wurden NHEK parallel mit Kulturüberständen von *S. epidermidis*, deren Nährmedium unterschiedliche Tryptophan-Konzentrationen enthielt, stimuliert.

Für diese Stimulationen wurden zunächst zwei Kulturüberstände von *S. epidermidis* verwendet, deren Nährmedium 3 mg/l Tryptophan und 15 mg/l Tryptophan enthielt.

Durch Stimulation mit diesen Kulturüberständen von *S. epidermidis* vervielfachte sich sowohl bei 3 mg/l, als auch bei 15 mg/l Tryptophan im Nährmedium des Kulturüberstands die relative CYP1A1-Induktion signifikant. Bei unterschiedlicher Tryptophan-Konzentration im Nährmedium des Kulturüberstands von *S. epidermidis*, zeigte sich außerdem ein positiver Zusammenhang zwischen der Tryptophan-Konzentration und der Induktion von CYP1A1.

Kulturüberstände mit 3 mg/l Tryptophan im Nährmedium induzierten CYP1A1 4-fach, während Kulturüberstände mit 15 mg/l Tryptophan CYP1A1 27-fach induzierten. Durch eine 5-fache Erhöhung der Tryptophan-Konzentration wurde eine 6,2-fach stärkere CYP1A1 Induktion erreicht (Abb. 13 A).

In weiteren Untersuchungen der Kulturüberstände von *S. epidermidis* wurde die Tryptophan-Konzentration im Nährmedium auf 50 mg/l Tryptophan erhöht. Wie oben gezeigt, beeinflusste die veränderte Tryptophan-Konzentration im Nährmedium nicht das Wachstum des Keims. Durch Stimulation primärer Keratinozyten wurde zunächst gezeigt, dass auch diese Kulturüberstände in der Lage sind, den AhR zu aktivieren. Außerdem wurde parallel ein Kulturüberstand mit 3 mg/l Tryptophan hergestellt und

zur Stimulation verwendet. Durch den Vergleich der CYP1A1-Induktionen konnte eine dosisabhängige AhR-Aktivierung festgestellt werden.

Es zeigte sich, dass beide Kulturüberstände signifikant CYP1A1 induzieren. Der Kulturüberstand, der in 3 mg/l Tryptophan gewachsen ist, zeigte eine 5-fache Induktionserhöhung, während der Kulturüberstand, der in 50 mg/l Tryptophan gewachsen ist, eine 56-fache Induktionserhöhung zeigte. Es lag folglich eine Tryptophan-abhängige Steigerung der CYP1A1-Induktion vor. Bei 16,7-fach erhöhter Tryptophan-Konzentration im Nährmedium wurde eine 11,4-fach höhere CYP1A1-Induktion nach der Stimulation gemessen (Abb. 13).

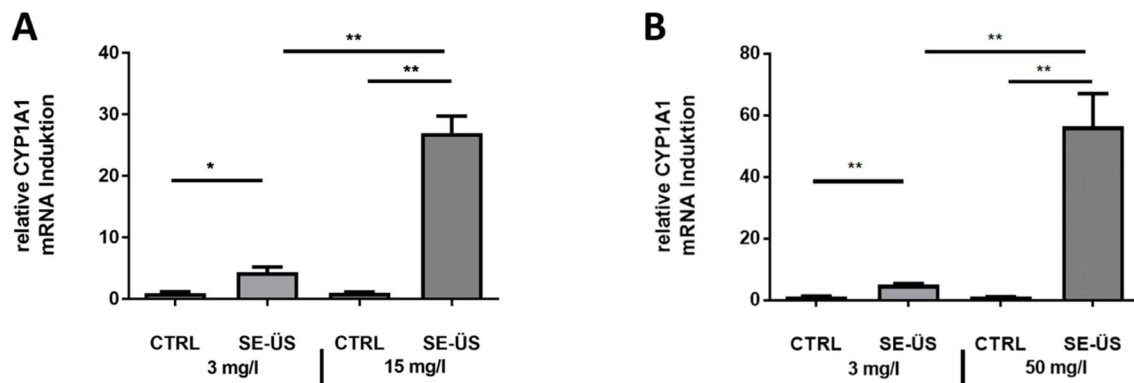


Abbildung 13: Kulturüberstände von *S. epidermidis* aktivieren den AhR und eine höhere Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kulturüberstände verstärkt die AhR-Aktivierung. Um zu analysieren, ob die Tryptophan-Konzentration des Nährmediums eine Rolle für die AhR-Aktivierung spielt, wurden NHEK mit Kulturüberständen stimuliert. Es wurde Nährmedium in dem kein *S. epidermidis* gewachsen ist (CTRL) oder steril filtrierter Kulturüberstand von *S. epidermidis*-Kulturen (SE-ÜS), die in 3 mg/l, **(A)** 15 mg/l oder **(B)** 50 mg/l Tryptophan gewachsen sind, 1:2 verdünnt auf NHEK-Monolayer gegeben. Darstellung der relativen Induktion von CYP1A1-mRNA, die mittels qPCR gemessen wurde; Gezeigte Daten sind Mittelwerte und \pm SD von drei Proben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Student's t-Test).

3.1.4. Charakterisierung der von *S. epidermidis* sezernierten AhR-Aktivatoren

3.1.4.1. <2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. epidermidis* aktivieren den AhR in primären Keratinozyten und HaCaT-Keratinozyten

Nachdem gezeigt wurde, dass der AhR in humanen Keratinozyten durch Kulturüberstände von *S. epidermidis* aktiviert wird, sind die Kulturüberstände <2kDa filtriert worden. Das Filtrat sollte nach der aufgestellten Hypothese mögliche AhR-Aktivatoren enthalten, da bekannte AhR-Aktivatoren kleiner als 2kDa sind (s. 1.3.8).

Zunächst wurden primäre Keratinozyten parallel mit einem Kulturüberstand von unter Zusatz von 50 mg/l Tryptophan gewachsenen *S. epidermidis* (Vollüberstand) und dessen Filtrat stimuliert. Hier zeigte sich bei beiden eine signifikante Erhöhung der Expression von CYP1A1. Der Vollüberstand erhöhte die CYP1A1-Expression um das 3,8-fache. Das Filtrat erhöhte die CYP1A1-Expression um das 4,2-fache (Abb. 14A).

Auf Grund der geplanten Folgeversuche wurden diese Stimulationen mit HaCaT-Keratinozyten wiederholt. Die HaCaT-Keratinozyten wurden parallel mit einem Kulturüberstand von *S. epidermidis* (Vollüberstand) oder dessen Filtrat stimuliert. Hierbei zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression von CYP1A1. Die Stimulation mit dem Vollüberstand erhöhte die CYP1A1-Expression um das 13-fache. Durch Stimulation mit dem Filtrat erhöhte sich die CYP1A1-Expression um das 110-fache. Der Induktionsunterschied von CYP1A1 zeigte sich hier auf Grund einer hohen Varianz nicht statistisch signifikant. Der niedrigste Wert der Stimulation mit dem <2kDa-filtrierten Kulturüberstand lag allerdings bei 30, sodass ein biologischer Effekt angenommen wird (Abb. 14 B).

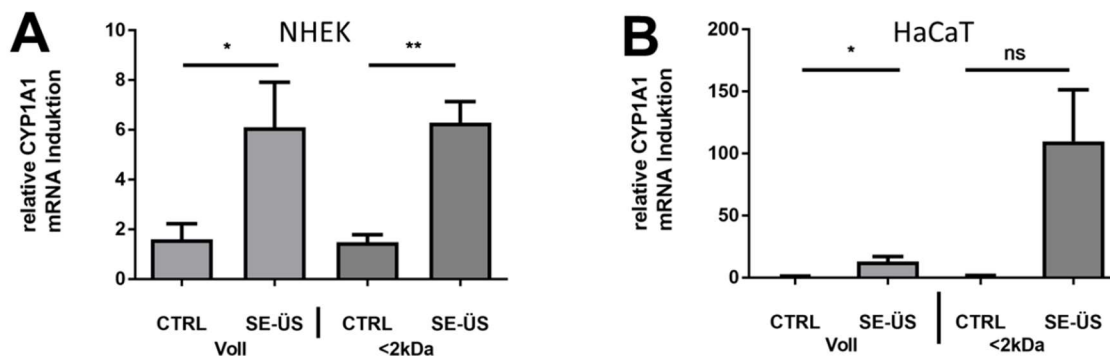


Abbildung 14: <2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. epidermidis* aktivieren den AhR in primären Keratinozyten und in HaCaT Keratinozyten (**A, B**) Steril filtrierter Kulturüberstand wurde als Vollüberstand (Voll) oder als filtrierter Kulturüberstand (<2kDa) auf (**A**) NHEK- oder (**B**) HaCaT-Monolayer gegeben und mittels qPCR die mRNA-Expression gemessen. Als Kontrolle wurde das Nährmedium der Kulturüberstände ohne *S. epidermidis* <2kDa-filtrierte und nicht filtriert (CTRL) eingesetzt. Gezeigte Daten sind Mittelwerte und \pm SD von (**A**) sechs und (**B**) drei Proben (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Student's t-Test).

3.1.4.2. HPLC-Analysen der <2kDa-filtrierten Kulturüberstände von *S. epidermidis*

Um mögliche AhR-Aktivatoren genauer zu charakterisieren, wurden die Kulturüberstände von *S. epidermidis* in einer HPLC-Anlage untersucht. Freundlicherweise wurden die HPLC-Analysen von Dr. Bartels durchgeführt. Hier wurde eine Superdex Peptide PC 3.2/30 Säule genutzt. Auf diese Weise wurden die <2kDa-filtrierten Kulturüberstände von *S. epidermidis* nach ihrer molekularen Größe aufgetrennt.

Da vorher gezeigt wurde, dass der filtrierte Kulturüberstand in der Lage ist, den AhR in HaCaT-Keratinozyten zu aktivieren, wurden für Stimulationen mit Fraktionen der Gel-Permeations-Chromatographie HaCaT-Keratinozyten genutzt.

Zunächst wurde Pyocyanin als bekannter AhR-Ligand untersucht. In der Analyse zeigte sich eine Retentionszeit von 80 min bis 105 min (Abb. 15).

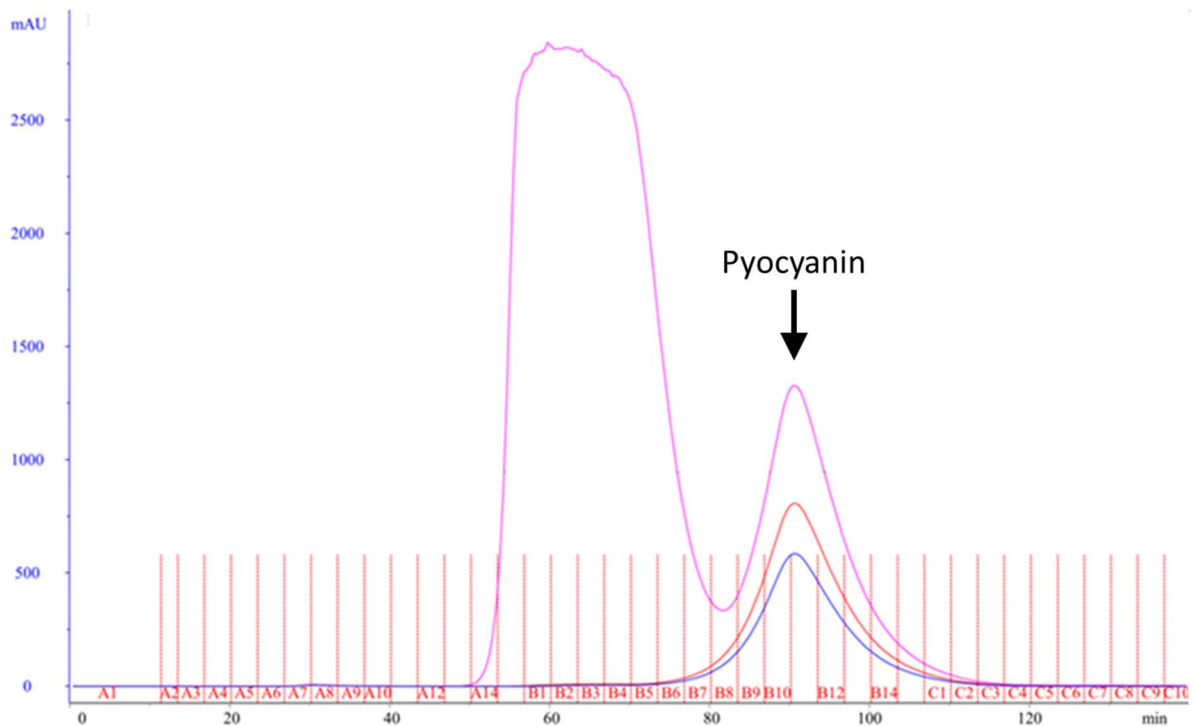


Abbildung 15: HPLC-Analyse von Pyocyanin. Pyocyanin löst sich nach 80 min von der Säule und bleibt bis 105 min nachweisbar. Absorption bei 280 nm (blau), 254 nm (rot), 215 nm (lila).

Anschließend erfolgte die Analyse eines <2kDa-filtrierten Kulturüberstands von *S. epidermidis*, dessen Nährmedium 50 mg/l Tryptophan enthielt. Auch bei der Analyse des Filtrats zeigte sich in der Retentionszeit von Pyocyanin ein Absorptionsschlag.

Mit den Fraktionen B2-B11 aus diesem Retentionszeitraum wurden HaCaT-Keratinocyten stimuliert. Am stärksten aktivierte die Fraktion B10 den AhR. Aber auch die Fraktionen B9, B11 und B3 konnten den AhR aktivieren. Gleichzeitig zeigt Fraktion B5 eine inhibierende Wirkung auf den AhR (Abb. 16).

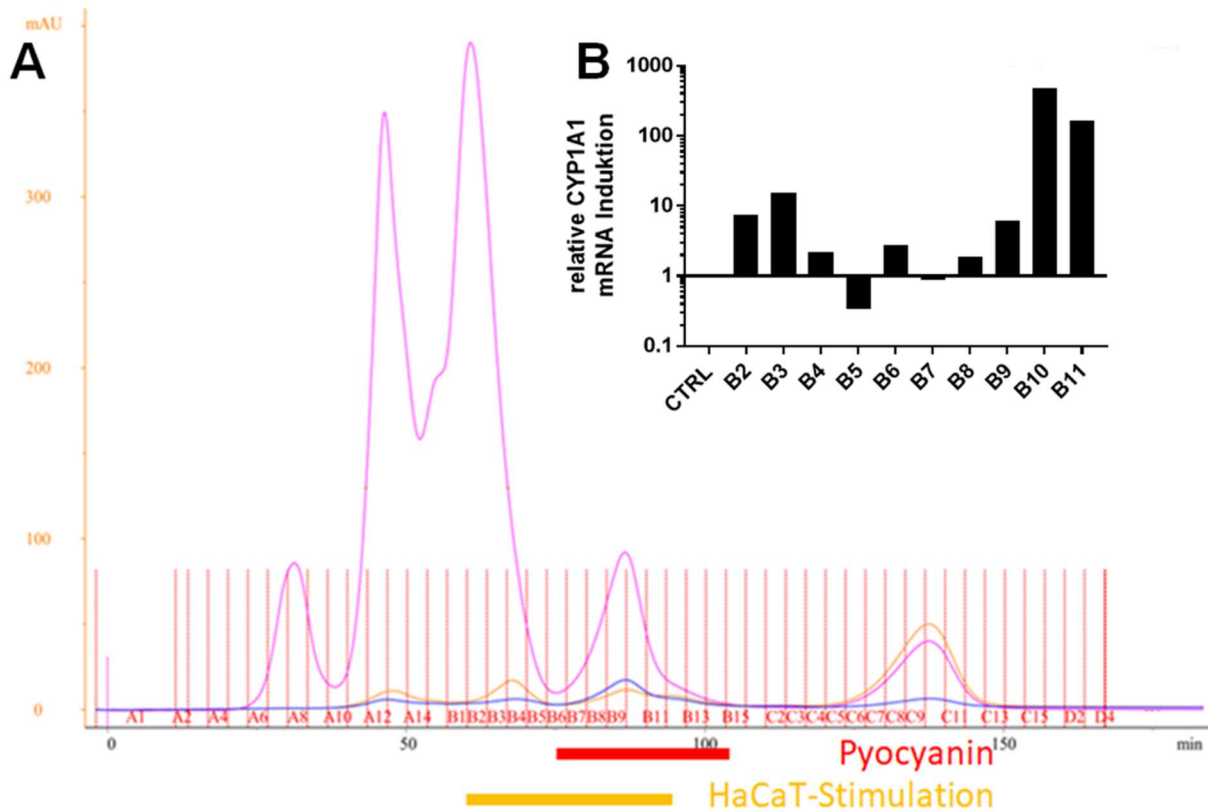


Abbildung 16: Aktivierung des AhR durch Fraktionen eines <2kDa-filtrierten Kulturüberstands von *S. epidermidis*. (A) Der <2kDa-filtrierte Kulturüberstand von *S. epidermidis* wurde mittels der HPLC in einer Gel-Permeations-Chromatographie untersucht und fraktioniert. Die Fraktionen B2-B11 wurden zur Stimulation auf HaCaT-Monolayer gegeben. Dargestellt ist die Absorption bei 280 nm (blau), 254 nm (orange), 215 nm (lila). (B) Dargestellt ist die mittels qPCR gemessene Expression von CYP1A1-mRNA. Als Kontrolle wurde Nährmedium (CTRL) eingesetzt. Gezeigte Daten sind Einzelwerte.

3.2. Untersuchungen mit Kulturüberständen von *S. aureus*

3.2.1. Kulturüberstände von *S. aureus* wachsen unabhängig von TRP-Konzentration und aktivieren den AhR

Es wurde auch für Kulturüberstände von *S. aureus* gezeigt, dass sie den AhR aktivieren können. Hierfür wurden primäre Keratinozyten mit einem Kulturüberstand von *S. aureus* stimuliert, dessen Nährmedium 50 mg/l Tryptophan enthielt. Im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle zeigte sich nach Stimulation eine 20-fach höhere Induktion von CYP1A1 (Abb. 17).

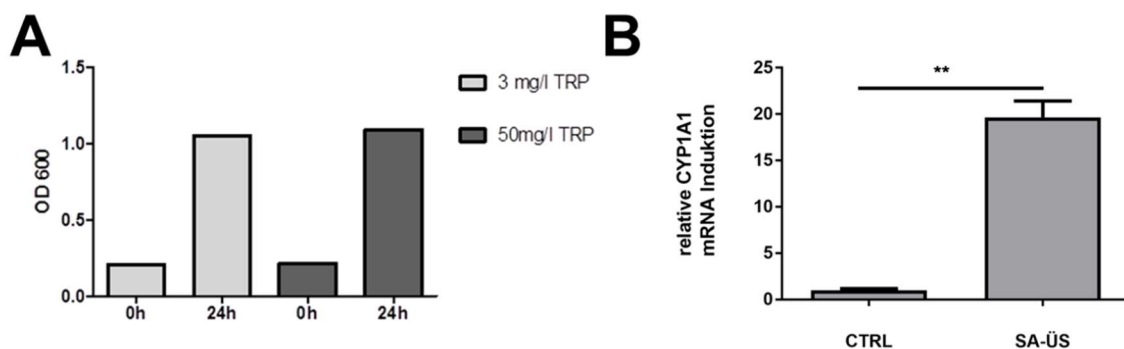


Abbildung 17: Kulturüberstände von *S. aureus* wachsen unabhängig von der Tryptophan-Konzentration und aktivieren den AhR. (A) Dargestellt ist die OD 600 zu Beginn der Kultivierung (0h) und nach 24 Stunden (24h) für *S. aureus*-Kulturen, deren Nährmedium 3 mg/l oder 50 mg/l Tryptophan enthielt. (B) Es wurde steril filtriertes Nährmedium ohne *S. aureus* (CTRL) oder steril filtrierter Kulturüberstand von *S. aureus* (SA-ÜS) 1:2 verdünnt auf postkonfluente NHEK-Monolayer gegeben. Dargestellt ist die mittels qPCR gemessene relative CYP1A1 mRNA-Induktion. Gezeigte Daten sind Mittelwerte und \pm SD von 3 Proben (** $p < 0,01$; Student's t-Test).

3.2.2. <2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. aureus* aktivieren den AhR

Nachfolgend wurden auch der <2kDa-filtrierte Kulturüberstand von *S. aureus* untersucht. Bei der Stimulation von NHEK konnte weiterhin eine AhR-Aktivierung nachgewiesen werden. Der filtrierte Kulturüberstand erhöhte die CYP1A1-Expression 3,8-fach (Abb. 18).

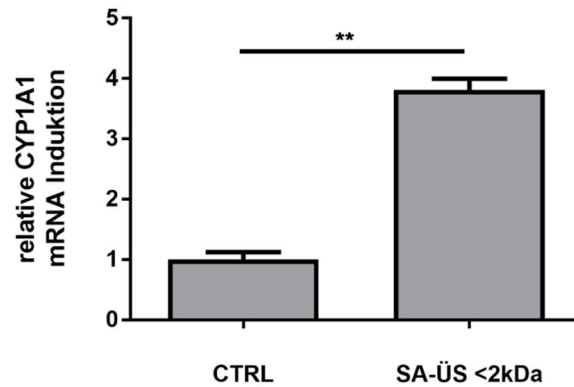


Abbildung 18: <2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. aureus* aktivieren den AhR. Es wurde <2kDa-filtriertes Nährmedium ohne *S. aureus* (CTRL) oder <2kDa-filtrierter Kulturüberstand von *S. aureus* (SA-ÜS <2kDa) 1:2 verdünnt auf postkonfluente NHEK-Monolayer gegeben. Darstellung der relativen Induktion von CYP1A1-mRNA, die mittels qPCR gemessen wurde; gezeigte Daten sind Mittelwerte und \pm SD von 3 Proben (** $p < 0,01$; Student's t-Test).

4. Diskussion

In dieser Arbeit sollte die Aktivierung des AhR in Keratinozyten durch Staphylokokken untersucht werden. Staphylokokken wie *S. epidermidis*, besiedeln die Haut als Kommensale, während *S. aureus* ein gefürchteter potentiell pathogener Keim ist (Fischetti et al., 2000; Garrity et al., 2001).

In der klinischen Forschung hat sich gezeigt, dass die dermale Mikrobiota eine wichtige Rolle für die Homöostase der Haut spielt. Unter anderem ist bekannt, dass Veränderungen im Mikrobiom der Haut entzündliche Läsionen begünstigen, sodass eine ausgeglichene Besiedlung durch Mikroorganismen das Immunsystem unterstützt (Chng et al., 2016).

Die Besiedlung der Haut durch *S. epidermidis* schützt den Wirt vor pathogenen Keimen (Christensen & Brüggemann, 2014) und dämpft die Infektion von Wunden (Lai et al., 2009). Nakatsuji und Kollegen untersuchten die Atopische Dermatitis, bei der *S. aureus* häufig für eine Exazerbation verantwortlich ist. Sie zeigten, dass die Besiedlung mit *S. epidermidis* bei erkrankten Menschen deutlich geringer ist als bei Gesunden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kolonialisierung mit *S. aureus* bei atopischer Dermatitis durch Neubesiedlung mit *S. epidermidis* zurückgedrängt werden konnte (Nakatsuji et al., 2017). Weiterhin ist bekannt, dass *S. epidermidis* die Expression von antimikrobiellen Peptiden fördert und so den Wirt vor pathogenen Infektionen schützt (D. Li et al., 2013).

Demnach erscheint die Kommunikation zwischen Staphylokokken und den Keratinozyten ein relevanter Bestandteil in der Pathogenese von dermatologischen Erkrankungen zu sein. Bisher ist nur wenig über die Kommunikation zwischen Staphylokokken und Keratinozyten bekannt.

Es konnte gezeigt werden, dass *S. epidermidis* kleine Moleküle sezerniert, die die Expression von antimikrobiellen Peptiden, abhängig vom Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2), in Keratinozyten steigern (Lai et al., 2010).

Weitere Kommunikationswege, wie der TLR2-vermittelte, sind noch nicht abschließend untersucht, jedoch scheint der Transkriptionsfaktorrezeptor AhR von Bedeutung zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des AhRs zu einer

Dämpfung von Entzündungsreaktionen der Haut im Rahmen einer Psoriasis führt (Di Meglio et al., 2014).

Nachdem der AhR lange Zeit lediglich auf seine entgiftende Funktion hin untersucht wurde, sind mittlerweile vielfältige Funktionen bekannt, die für die Homöostase der Haut relevant sind (Daniel W Nebert, 2017; Noakes, 2015). Unter anderem konnte gezeigt werden, dass in AhR-defizienten Mäusen die Ausreifung von Langerhanszellen in der Epidermis gestört ist (Jux et al., 2009). Aber auch die Differenzierung von humanen Keratinozyten ist AhR-abhängig (van den Bogaard et al., 2015). In AhR-defizienten Mäusen wurde festgestellt, dass der transepidermale Wasserverlust deutlich erhöht ist, wodurch die Bedeutung des AhR für die Barrierefunktion der Haut deutlich wird (Haas et al., 2016). Durch die vielfältigen Funktionen des AhR wird das Verständnis der AhR-Aktivierung durch Staphylokokken, als wichtiger Vertreter des Mikrobioms, interessant.

Vor dieser Arbeit war bekannt, dass der AhR sezernierte Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* und *M. tuberculosis* erkennt. In der Folge wird der AhR auch als intrazellulärer „Pattern-Recognition-Receptor“ (PRR) bezeichnet, der die antimikrobielle Immunantwort aktiviert (Moura-Alves et al., 2014).

Ziel dieser Arbeit war, die Aktivierung des AhR in humanen Keratinozyten durch Staphylokokken zu untersuchen. Da die Haut eine Barriere zur Umwelt darstellt und den Lebensraum von Staphylokokken bildet, wurden die Untersuchungen mit primären Keratinozyten und HaCaT-Keratinozyten durchgeführt. Als Vertreter der Staphylokokken wurden der Kommensale *S. epidermidis* und *S. aureus* als potentiell pathogener Keim der Haut ausgewählt. Dabei sollten nicht die Bestandteile der lebenden Keime als Aktivatoren des AhR untersucht werden, sondern sezernierte Moleküle der Staphylokokken als AhR-Aktivatoren näher charakterisiert werden.

Aus der Literatur sind organische Liganden des AhR bekannt (s. 1.3.8). Zu ihnen gehören auch Liganden, die von Mikroorganismen sezerniert werden (Moura-Alves et al., 2014). Gleichzeitig ist aus Untersuchungen des Darms bekannt, dass Tryptophan-Metabolite als AhR-Liganden fungieren (Zelante et al., 2013).

Auf diesen Erkenntnissen basierend wurde die Hypothese aufgestellt, dass Staphylokokken den AhR in Keratinozyten mit Hilfe von sezernierten Tryptophan-Metaboliten aktivieren.

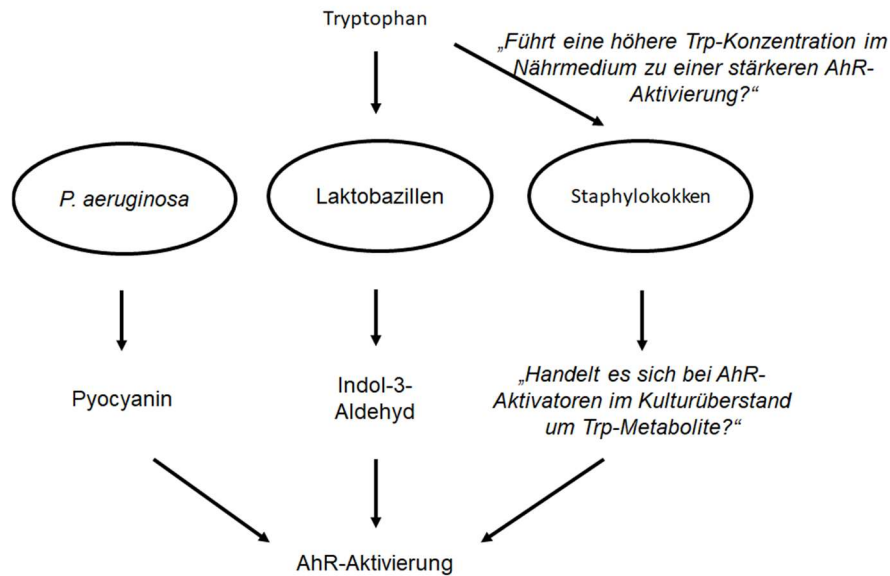


Abbildung 12: Darstellung der Hypothese. *P. aeruginosa* und Laktobazillen sezernieren Faktoren, die den AhR aktivieren. Laktobazillen bilden Tryptophan (Trp)-abhängig mehr AhR-Aktivatoren. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass Staphylokokken auch Tryptophan-Metabolite als AhR-Liganden sezernieren könnten.

Deshalb wurden für diese Arbeit steril-filtrierte Kulturüberstände von Staphylokokken untersucht. Diese wurden bei unterschiedlichen Tryptophan-Konzentrationen kultiviert, in der Erwartung, dass durch eine höhere Tryptophan-Konzentration mehr Tryptophan-Metabolite in den Kulturüberstand sezerniert werden. In der Folge sollte sich auch die AhR-Aktivierung in Keratinozyten nach einer Stimulation mit diesen Kulturüberständen verstärken.

Als Voraussetzung musste gezeigt werden, dass eine erhöhte Tryptophan-Konzentration im Nährmedium nicht zu einem verstärkten Wachstum der Bakterienkulturen führt.

4.1. Untersuchungen mit Kulturüberständen von *S. epidermidis*

4.1.1. *S. epidermidis* Kulturen wachsen unabhängig von der Tryptophankonzentration

In Studien ist das Wachstumsverhalten von Staphylokokken bei unterschiedlichen Tryptophan-Konzentrationen nicht näher untersucht. Bisher wurde lediglich die

essentielle Bedeutung von Tryptophan für die Proteinproduktion von Staphylokokken gezeigt (Chu, Melish, & James, 1989).

In dieser Arbeit konnte durch verschiedene Tryptophan-Konzentrationen im Nährmedium der Kulturüberstände gezeigt werden, dass Tryptophan essentiell benötigt wird, aber das Wachstum der Bakterienkulturen durch verschiedene Tryptophan-Konzentrationen nicht beeinflusst wird. Es wurden jeweils parallel Kulturüberstände mit 3 mg/l und mit 15 mg/l bzw. 50 mg/l Tryptophan kultiviert und nach 24h zeigte sich dieselbe optische Dichte.

Zelante *et al.* untersuchten das Wachstumsverhalten von Laktobazillen bei unterschiedlichen Tryptophan-Konzentrationen. Sie verglichen das Wachstum in einem Nährmedium, welches kein Tryptophan enthielt, mit Nährmedien, die entweder 4 mg/l (0,02 mMol) oder 122 mg/l Tryptophan (0,6 mMol) enthielten. Für *L. reuteri* zeigte sich ein stärkeres Wachstum bei erhöhter Tryptophan-Konzentration. Bei *L. johnsonii* führte ein erhöhtes Tryptophan-Angebot zu einer Unterdrückung des Wachstums.

Es scheint folglich einen relevanten Unterschied zwischen Laktobazillen und Staphylokokken hinsichtlich ihres Stoffwechsels zu geben. Zelante *et al.* vermuten, dass Laktobazillen unter erhöhter Tryptophan-Konzentration anstelle von Zucker Tryptophan als Energiequelle nutzen (Zelante et al., 2013).

Staphylokokken scheinen die Art ihrer Energiegewinnung nicht anzupassen, da ihr Wachstum zwar essentiell von Tryptophan abhängt, aber sich nicht durch ein höhere Tryptophan-Konzentration im Nährmedium steigern lässt.

Anschließend wurden die Kulturüberstände von *S. epidermidis* zur Stimulation von Keratinozyten verwendet. Hier sollte zunächst untersucht werden, ob das Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) AhR-abhängig induziert wird, damit in folgenden Untersuchungen eine Induktion von CYP1A1 in Keratinozyten als AhR-Aktivierung gewertet werden kann.

CYP1A1 ist ein bekanntes Zielgen des AhR und die Induktion von CYP1A1 ist in der Literatur als Biomarker für die Aktivierung des AhR bekannt (Heuvel et al., 1993).

4.1.2. Kulturüberstände von *S. epidermidis* induzieren AhR-abhängig CYP1A1

Bisher gibt es keine veröffentlichten Studien, die sich mit der Interaktion zwischen Staphylokokken und dem AhR in Keratinozyten befassen. Es gibt eine Studie, die zeigt, dass lebende Staphylokokken den AhR in Epithelzellen der Milchdrüsen des Schweins aktivieren (Jaeger et al., 2015). Um Erkenntnisse darüber zu erlangen, ob der AhR in humanen Keratinozyten an der Erkennung von *S. epidermidis* oder *S. aureus* beteiligt ist, wurden in der Arbeitsgruppe Harder Versuche mit humanen Keratinozyten (NHEK) durchgeführt. Nachdem lebende Staphylokokken den AhR in humanen Keratinozyten aktivierten, wurden auch deren Kulturüberstände untersucht. Diese aktivierten den AhR, sind allerdings unter statischen Bedingungen gewachsen, sodass sich ein Biofilm bilden konnte. Um einen Biofilm zu vermeiden, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Kulturüberstände als Schüttelkultur kultiviert. Staphylokokken sind in der Lage, einen Biofilm sowohl auf künstlichen als auch auf organischen Oberflächen zu bilden. Im Rahmen von Infektionen von Fremdmaterialien ist die Bildung eines Biofilms ein entscheidender Pathogenitätsfaktor (Becker et al., 2014). Für unsere Untersuchung sollte die Rolle von *S. epidermidis* als Kommensale untersucht werden, weshalb ein Biofilm vermieden werden sollte.

Mit einem Luziferase-Assay konnte gezeigt werden, dass ein Kulturüberstand von *S. epidermidis* AhR-abhängig CYP1A1 in NHEK induziert. Dafür wurden Keratinozyten mit dem Inhibitor CH-223191 inkubiert. Für folgende Versuche zur AhR-Aktivierung wurde die Induktion von CYP1A1 gemessen und die AhR-Abhängigkeit vorausgesetzt.

Neue Untersuchungen zeigen, dass CYP1A1 als Biomarker für die AhR-Aktivierung nicht zwingend ausreicht, da die Induktion von CYP1A1 davon abhängig ist, dass der AhR mit Hilfe von ARNT an die DNA bindet. ARNT dimerisiert aber auch mit anderen Faktoren, wie z. B. dem AhRR (s. 1.3.5). Gibt es zu wenig ARNT in der Zelle, gelingt es dem AhR nicht zu dimerisieren und er wird zu einer E3-Ubiquitin-Ligase. Folglich kann auch eine Ligandenbindung ohne anschließende Induktion der Zielgene erfolgen (Luecke-Johansson et al., 2017). Deshalb sollten in folgenden Untersuchungen weitere Methoden verwendet werden, um eine Aktivierung des AhR nachzuweisen. Beispielsweise konnten Berg und Pongratz mittels Fluoreszenz die Translokation des AhR in den Zellkern nachweisen (Berg & Pongratz, 2002). Weiterhin kann die AhR-Aktivierung mittels EROD-Assays nachgewiesen werden, das allerdings auch

CYP1A1-abhängig funktioniert (Burke & MAYER, 1974; Zamaratskaia & Zlabek, 2009).

Schließlich wurden NHEK parallel mit Kulturüberständen mit niedriger oder hoher Tryptophan-Konzentration stimuliert, um zu untersuchen, ob die Aktivierung des AhR durch hohe Tryptophan-Konzentrationen im Nährmedium verstärkt wird.

4.1.3. Einfluss der Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kulturüberstände von *S. epidermidis* auf die AhR-Aktivierung

Vor diesen Untersuchungen wurde kein Zusammenhang zwischen der Tryptophan-Konzentration im Nährmedium und der Fähigkeit, den AhR zu aktivieren, beschrieben.

Allerdings sind Tryptophan-Metabolite, die von Mikroorganismen gebildet werden, als AhR-Liganden bekannt. Untersuchungen konnten zeigen, dass *Malassezia*-Hefen Tryptophan-Metabolite sezernieren, die den AhR in HaCaT-Keratinocyten aktivieren (Magiatis et al., 2014). Zelante *et al.* haben die Kommunikation zwischen der Darmflora und der Darmschleimhaut von Mäusen untersucht. Sie stellten fest, dass Tryptophan-Metabolite von Laktobazillen den AhR aktivieren (Zelante et al., 2013).

Die erhöhte Tryptophan-Konzentration im Nährmedium von *S. epidermidis* sollte die Konzentration der Tryptophan-Metabolite in den Kulturüberständen, die zur Stimulation der NHEK eingesetzt wurden, steigern. Wir gehen davon aus, dass die *S. epidermidis*-Kulturen abhängig von der Tryptophan-Dosis mehr AhR-Aktivatoren sezernieren und folglich die Expression von CYP1A1 in stimulierten Keratinocyten Tryptophan-dosisabhängig gesteigert werden kann.

Initial wurden *S. epidermidis*-Kulturen mit 3 mg/l und 15 mg/l Tryptophan kultiviert. Nachdem die optische Dichte nach 24h einen ähnlichen Wert erreicht hatte, wurden die Kulturen steril filtriert und als Kulturüberstand zur Stimulation von Keratinocyten verwendet. Hierbei zeigte sich in NHEK eine Tryptophan-dosisabhängige AHR-Aktivierung. Eine 5-fache Konzentrationssteigerung von Tryptophan im Nährmedium der *S. epidermidis*-Kultur führte zu einer 6,2-fach höheren CYP1A1-Induktion.

Daraufhin wurde die Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kulturen gesteigert, um festzustellen, ob sich die CYP1A1-Induktion verstärken lässt. In den folgenden Stimulationen wurden Kulturüberstände von *S. epidermidis* verglichen, die

in 3 mg/l und 50 mg/l Tryptophan kultiviert wurden. Durch die deutlich erhöhte Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kultur ließ sich die Induktion von CYP1A1 11,4-fach erhöhen. Obwohl es sich hierbei um unabhängige Versuche handelt, zeigen beide Versuche, dass eine hohe Tryptophan-Konzentration im Nährmedium der Kulturen zu einer stärkeren AhR-Aktivierung führt. Da im Vorfeld ausgeschlossen wurde, dass eine höhere Keimzahl für diesen Effekt verantwortlich ist, wird der Anstieg auf die erhöhte Tryptophan-Konzentration im Nährmedium zurückgeführt. Der hier gezeigte Trend unterstützt die Vermutung, dass es sich bei den gesuchten AhR-Aktivatoren in Kulturüberständen von *S. epidermidis* um Metabolite des Tryptophan-Metabolismus handelt. Dieser wird durch eine höhere Tryptophan-Konzentration im Nährmedium angeregt.

In weiteren Versuchen muss eine Dosis-Kinetik durch parallele Kultivierung mehrerer Kulturüberstände bei unterschiedlichen Tryptophan-Konzentrationen bestätigt werden. Wir schlussfolgern aus den hier gezeigten Ergebnissen, dass die Kulturen bei höheren Tryptophan-Konzentrationen mehr AhR-Aktivatoren sezernieren, bei denen es sich somit wahrscheinlich um Tryptophan-Metabolite handelt.

Allerdings wird in der Literatur nicht nur die direkte AhR-Aktivierung durch einen Liganden beschrieben. Es ist auch bekannt, dass es eine AhR-abhängige Cytochrom-P450 Autoregulation gibt (Chiaro, Patel, Marcus, & Perdew, 2007). Folglich ist auch eine indirekte AhR-Aktivierung über eine Inhibition dieser Cytochrom-P450-Enzyme möglich. Somit könnten die Kulturüberstände von *S. epidermidis* auch indirekte Aktivatoren sezernieren.

Als indirekter AhR-Aktivator ist der endogene Ligand FICZ bekannt, der intrazellulär in einer gewissen Konzentration vorhanden ist. FICZ ist für eine gleichmäßige AhR-Aktivierung verantwortlich und entsteht unter Tageslicht aus Tryptophan. Die AhR-abhängig induzierten CYP-Enzyme bauen FICZ ab, und regulieren so die Konzentration von FICZ. Werden die CYP-Enzyme durch andere Stoffe in Anspruch genommen steigt in der Folge der FICZ-Spiegel und der AhR wird verstärkt aktiviert (Abb.1). Daraus kann man den Schluss ziehen, dass Stoffe, die CYP-Enzyme inhibieren, indirekt den AhR aktivieren (Wincent et al., 2012). Es ist bekannt, dass im Nährmedium enthaltenes Tryptophan durch die übliche Laborbeleuchtung innerhalb weniger Stunden zu FICZ umgewandelt wird. Je höher die Tryptophan-Konzentration

ist, desto schneller wird FICZ gebildet. Schon geringe Konzentrationen wie 3 mg/l können nach 3 Std. den AhR aktivieren. (Öberg et al., 2005). Um zu vermeiden, dass die AhR-Aktivierung lediglich durch Umwandlung des im Nährmedium gelösten Tryptophan ist, wurden den Kontrollen, in denen kein Keim gewachsen ist, dieselbe Menge Tryptophan zugesetzt. Zukünftig könnte in den verwendeten Kulturüberständen FICZ gemessen werden. Durch die Messung von FICZ könnte der Einfluss des Tageslichts und der Laborbeleuchtung beurteilt werden. Solange, wie die Bakterien im Kulturmedium kultiviert werden, verstoffwechseln diese das FICZ, wenn es in die Bakterien hineingelangt. Nachdem der Kulturüberstand steril filtriert wurde, ist das nicht mehr möglich. Da das eingewogene und eventuell nicht vollständig verstoffwechselte Tryptophan unter anderem durch Tageslicht in FICZ umgewandelt wird, wäre es möglich, aus der gebildeten FICZ-Menge auf den Einfluss des Tageslichts zu schließen.

Die CYP1A1-Induktion durch die Kulturüberstände von *S. epidermidis* zeigt zwar eine AhR-Aktivierung, aber bei der Interpretation dieser Aktivität muss auch eine indirekte Aktivierung berücksichtigt werden. Deshalb wird in dieser Arbeit nicht von gesuchten Liganden gesprochen, sondern bewusst von Aktivatoren des AhR, die von *S. epidermidis*-Kulturen sezerniert werden.

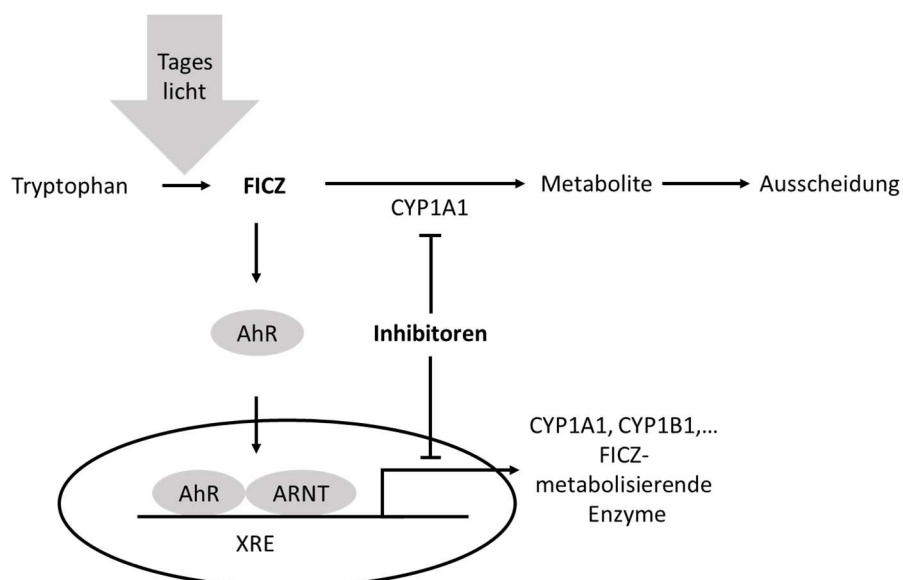


Abbildung 13: Indirekte Aktivierung des AhR. Schematische Darstellung der indirekten AhR-Aktivierung durch Inhibition von CYP1A1. Die gestörte Metabolisierung des endogenen AhR Liganden FICZ, welches auch durch Tageslicht aus Tryptophan entsteht, führt zu einem Anstieg der intrazellulären FICZ-Konzentration. Folglich wird der AhR auch durch die Inhibitoren von CYP1A1 aktiviert, wenn die metabolisierende Funktion von CYP1A1 inhibiert ist. ARNT, „Xenobiotic Response Element“ (XRE) Modifiziert nach Wincent et al. (2012).

Neben der direkten und indirekten Aktivierung des AhR durch Aktivatoren wird der AhR durch intrazelluläre Voraussetzungen beeinflusst.

Die AhR-Aktivierung ist auch vom Differenzierungsgrad der Keratinozyten abhängig. Es ist bekannt, dass mit fortschreitender Differenzierung, die Expression vom AhR und von CYP1A1-mRNA zunimmt (Ray & Swanson, 2004; Swanson, 2004). Außerdem scheint der AhR abhängig von der Zelldichte und dem Kontakt zwischen den Keratinozyten ligandenunabhängig aktiviert zu werden (Ikuta et al., 2004). Eine genauere Bestimmung des Differenzierungsgrads wäre mittels Bestimmung von Keratinen möglich (Albers, 1996).

Zusätzlich gibt es bei Transkriptionsfaktorrezeptoren wie dem AhR molekulare Interaktionen, die eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte des AhR sein können. Die Interaktionen können auf verschiedenen Ebenen des Signalwegs des AhR stattfinden.

Liganden beeinflussen sich gegenseitig oder binden an mehrere Rezeptoren. Teilweise führt die Aktivierung eines Rezeptors indirekt zur Aktivierung eines anderen Rezeptors, oder dämpft seine Aktivität zum Beispiel durch den Verbrauch von Chaperonen. Schließlich translozieren die aktivierten Rezeptoren in den Kern und binden an ihre Zielsequenzen der DNA. Der AhR ist hierbei von ARNT abhängig (Luecke-Johansson et al., 2017). Die Bindungsstellen der DNA überschneiden sich teilweise und ermöglichen eine erweiterte Genexpression. In einigen Fällen hängt die Stärke der Expression auch von Kofaktoren ab.

Wie in der Einleitung dargestellt, führt die Aktivierung durch einen Liganden auch zu einer EGFR-Aktivierung über pp60^{src} (Sato et al., 1995). Die Interaktion mit EGFR scheint eine Rolle bei Karzinomen zu spielen (Rezension von (Haarmann-Stemmann, Bothe, & Abel, 2009)). Gleichzeitig ist die Expression des AhR und seiner Zielgene in humanen dendritischen Zellen abhängig von NF- κ B (Vogel et al., 2014).

Die in den Ergebnissen gezeigte AhR-Aktivierung ist also verschiedenen Faktoren unterworfen, die in dieser Arbeit noch nicht untersucht wurden. Absolute Induktionsschwankungen von CYP1A1 lassen sich durch unterschiedliche Zellspender erklären. Trotzdem können weitere Untersuchungen zu den hier genannten Faktoren,

die für die AhR-Aktivierung wichtig sind oder aus der Aktivierung resultieren, weitere Aspekte der Interaktion zwischen Staphylokokken und dem AhR aufdecken.

In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte mittels EROD-Assay gezeigt werden, dass nach Stimulation mit einem Kulturüberstand von *S. epidermidis* CYP1A1 induziert wird, aber die Enzymaktivität sinkt. Gleichzeitig wurde im Zellysate der stimulierten Keratinozyten ein erhöhter FICZ-Spiegel nachgewiesen. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass durch Inhibition von CYP1A1 endogene AhR-Liganden wie FICZ akkumulieren, wodurch der AhR indirekt aktiviert wird.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten mögliche AhR-Aktivatoren aus den Kulturüberständen von *S. epidermidis* weiter untersucht werden.

4.1.4. Charakterisierung der von *S. epidermidis* sezernierten AhR-Aktivatoren

Nachdem unsere Ergebnisse gezeigt haben, dass Kulturüberstände von *S. epidermidis* AhR-Aktivatoren enthalten, wurden diese näher charakterisiert. Als Grundlage für die weiteren Untersuchungen wurde angenommen, dass es sich entweder um einen bereits bekannten AhR-Liganden oder einen ähnlichen Stoff handelt. Da bekannte AhR-Aktivatoren eine Masse unter 2kDa haben (s. 1.3.8) wurden die Kulturüberstände von *S. epidermidis* nach der Größe filtrierte, sodass im Filtrat nur noch Stoffe vorhanden waren, die kleiner als 2kDa sind.

<2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. epidermidis* aktivieren den AhR in primären Keratinozyten und HaCaT-Keratinozyten

Die <2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. epidermidis* wurden sowohl zur Stimulation von NHEK, als auch zur Stimulation von HaCaT-Keratinozyten verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass AhR-Aktivatoren im Filtrat vorhanden bleiben. Diese Größenordnung passt zu bekannten sezernierten AhR-Liganden wie Pyocyanin (Moura-Alves et al., 2014). In anderen Arbeiten wurden die untersuchten Kulturen direkt mittels Ethylazetat extrahiert und chromatographisch untersucht (Magiatis et al., 2014). Hier wurde zunächst die Größe der gesuchten Aktivatoren eingegrenzt, wodurch die Analysen mittels HPLC erleichtert werden konnten.

Gel-Permeations-Chromatographie der <2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. epidermidis*

Zur Analyse der <2kDa-filtrierte Kulturüberstände wurde eine Superdex Peptide PC 3.2/30-Säule verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Gel-Permeations-Chromatographie, die den Kulturüberstand nach der Größe der enthaltenen Stoffe auftrennt. Um das Absorptionsverhalten der Kulturüberstände einordnen zu können, wurde zunächst Pyocyanin als Referenz analysiert. Unsere Ergebnisse zeigen, dass sich Pyocyanin zwischen 80 und 105 min von der verwendeten Säule löst.

Anschließend zeigte ein <2kDa-filtrierter Kulturüberstand von *S. epidermidis* im gleichen Retentionszeitraum einen Absorptionsschlag. Daraufhin wurden die entsprechenden Fraktionen zur Stimulation von HaCaT-Keratinocyten verwendet. Hierbei konnten mehrere Fraktionen den AhR aktivieren und enthalten somit gesuchte AhR-Aktivatoren.

Wahrscheinlich handelt es sich bei dem gesuchten AhR-Aktivator nicht um einen einzelnen, sondern um mehrere, wodurch erklärbar ist, warum die Aktivierung des AhR nicht auf eine Fraktion begrenzt ist. Smirnova und Kollegen untersuchten unterschiedliche Entstehungswege von FICZ aus Tryptophan und analysierten ihre Proben mittels HPLC. Dabei zeigten sich mehrere Fraktionen in der Lage, den AhR zu aktivieren. Sie vermuten, dass in aufeinanderfolgenden Fraktionen Indolderivate, die sich in unterschiedlichen Oxidierungs- und Kondensationszuständen befinden, vorhanden sind. Diese Indolderivate lösen sich nicht zu einem Zeitpunkt, sodass mehrere Fraktionen AhR-Aktivatoren enthalten. Die Intensität der AhR-Aktivierung könnte dadurch beeinflusst sein, dass vorhandene AhR-Aktivatoren in einem Kulturüberstand den AhR synergistisch aktivieren. Durch die Fraktionierung mittels HPLC kann dieser Synergismus verloren gehen (Smirnova et al., 2016).

Eine andere mögliche Erklärung für unterschiedliche Intensitäten oder sogar die Suppression in Fraktion B5 ist die Vermutung, dass Tryptophan-Metabolite aus den Kulturüberständen den AhR auch supprimieren können. Der bekannte Tryptophan-Metabolit Indol, der von Mikroorganismen sezerniert wird, wurde als AhR-Antagonisten erkannt (Jin et al., 2014). Außerdem wurden Isoflavone beschrieben, die spezies- und zellspezifisch AhR-Agonisten oder Antagonisten sind (Wall et al., 2012). In Fraktionen, die den AhR weniger stimulieren, oder solche, die den AhR sogar inhibieren, könnten Tryptophan-Metabolite vorhanden sein, die als AhR-Antagonisten wirken. Diese

Wirkung könnte vor der Fraktionierung durch die Überzahl von Agonisten verdeckt gewesen sein.

Fazit der Untersuchungen mit Kulturüberständen von *S. epidermidis*

Die Ergebnisse der Untersuchungen zu Kulturüberständen von *S. epidermidis* zeigten, dass es sich bei den gesuchten AhR-Aktivatoren wahrscheinlich um Tryptophan-Metabolite handelt, die kleiner als 2kDa sind. Anschließend wurden die Kulturüberstände von *S. epidermidis* mittels Gelfiltration aufgetrennt. Da es sich bei bekannten AhR-Liganden um polyzyklische Aromaten handelt, wurde Pyocyanin als Referenz untersucht. Fraktionen der Kulturüberstände von *S. epidermidis* aus diesem Retentionszeitraum konnten den AhR in Keratinozyten unterschiedlich stark aktivieren oder sogar supprimieren. Bei der Struktur der sezernierten AhR-Aktivatoren könnte es sich daher auch um polyzyklische Aromaten handeln.

Um konkrete AhR-Aktivatoren aus den Kulturüberständen von *S. epidermidis* zu identifizieren, müssen weitere HPLC-Analysen durchgeführt werden und schließlich einzelne Fraktionen durch MS-Analysen untersucht werden. Eine erste MS-Analyse einer einzelnen Fraktion zeigte die Masse von Tryptamin. Tryptamin ist als endogener, AhR-abhängiger CYP1A1-Induktor bekannt. (Bergander, Cai, Klocke, Seifert, & Pongratz, 2016). Allerdings konnten im Rahmen dieser Arbeit die MS-Analysen nicht vollständig abgeschlossen werden und bleiben Teil weiterer Untersuchungen.

Um zu ermitteln, ob die AhR-Aktivierung ein *S. epidermidis* spezifischer Effekt ist, wurde zusätzlich *S. aureus* als potentiell pathogener Keim untersucht.

4.2. Untersuchungen zu Kulturüberständen von *S. aureus*

Nachdem *S. epidermidis*-Kulturen AhR-Aktivatoren sezernieren, sollten auch Kulturüberstände von *S. aureus* untersucht werden. Infektionen mit *S. aureus* nehmen im medizinischen Alltag einen immer größeren Platz ein. Auf Grund der durch Antibiotikaresistenzen zunehmend erschwerten Behandlung solcher Infektionen werden neue Therapieverfahren notwendig (Chambers & DeLeo, 2009). Für diese könnte ein verbessertes Verständnis der Kommunikation zwischen Wirt und Keim entscheidend sein. Ob der AhR in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt, ist nicht abschließend untersucht und in dieser Arbeit soll gezeigt werden, ob Kulturüberstände von *S. aureus* AhR-Aktivatoren enthalten.

Kulturüberstände von *S. aureus* wachsen unabhängig von der Tryptophan-Konzentration und aktivieren den AhR in primären Keratinozyten

Nachdem sich die Aktivierung des AhR durch Kulturüberstände von *S. epidermidis* mittels Erhöhung der Tryptophan-Konzentration im Nährmedium steigern ließ, wurde für die Kultivierung von *S. aureus* eine Konzentration von 50 mg/l gewählt. Im Vorfeld konnte auch hier gezeigt werden, dass eine höhere Tryptophankonzentration im Nährmedium der *S. aureus* Kultur nicht zu einer größeren Bakterienzahl führt.

Diese Kulturüberstände von *S. aureus* konnten den AhR in NHEK stimulieren. Daraus wird geschlussfolgert, dass auch *S. aureus* AhR-Aktivatoren sezerniert.

<2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. aureus* aktivieren der AhR

Abschließend konnte gezeigt werden, dass auch <2kDa-filtrierte Kulturüberstände von *S. aureus* den AhR aktivieren. Die sezernierten Aktivatoren von *S. aureus* ähneln in Ihrer Größe folglich denen von *S. epidermidis*. Letztendlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Fähigkeit, den AhR zu aktivieren, nicht für den Kommensalen *S. epidermidis* spezifisch ist, sondern auch bei *S. aureus* vorkommt. In weiteren Untersuchungen könnten auch die Kulturüberstände von *S. aureus* mit HPLC und MS analysiert werden.

4.3. Schlussfolgerung und Ausblick

Das Verständnis der Aktivierung des AhRs durch Staphylokokken konnte in dieser Arbeit weiterentwickelt werden. Letztlich sind aus der Literatur eine Vielzahl verschiedener AhR-Liganden bekannt, die viele verschiedene AhR vermittelte Folgen haben, sodass ein einzelner Ligand-Rezeptor-Mechanismus als Erklärung nicht ausreicht. In Ihrer Arbeit beschreiben Denison und Faber, dass sich der AhR in seiner Struktur und Funktion abhängig vom Liganden verändert. Der aktivierte AhR bildet verschiedene Heterodimere, bindet an verschiedene DNA-Sequenzen und rekrutiert unterschiedliche Koaktivatoren. Schließlich mündet die Aktivierung in einer ligandenabhängigen Genexpression (Denison & Faber, 2017) (Abb. 2). Folglich müssen neben der AhR-Aktivierung weitere Mechanismen untersucht werden, um die Kommunikation zwischen Staphylokokken und Wirt vollständig zu verstehen.

Der AhR nimmt eine wichtige Rolle in der Physiologie der Haut ein. Durch ein besseres Verständnis der AhR-Aktivierung durch Staphylokokken könnten neue Therapiekonzepte entwickelt werden. Allerdings ist eine Therapie mit AhR-Aktivatoren nicht unkritisch zu betrachten. Zum einen zeigt eine Überdosierung, wie zum Beispiel eine Dioxinvergiftung, lebensgefährliche akute Symptome. Zum anderen konnte gezeigt werden, dass AhR-Aktivierung kanzerogen ist. Eine Studie zeigte, dass Dioxin in der Lage ist, humane Keratinozyten zu immortalisieren. Dioxin unterdrückt AhR-abhängig den Tumorsupressor p53 und beeinflusst so deren Seneszenz (Ray & Swanson, 2004). Bei dem Versuch, AhR-Liganden therapeutisch zu nutzen, muss also auch das kanzerogene Langzeitrisiko abgeschätzt werden. Umso wichtiger ist das Verständnis von Interaktionen der Bakterien auf der Haut und dem AhR. Einerseits lässt sich eventuell durch Verschiebungen im Mikrobiom, AhR vermittelt, die Pathogenese von Hauterkrankungen erklären. Andererseits könnte durch Manipulation des Mikrobioms indirekt die AhR-Aktivierung gesteuert und normalisiert werden. Dadurch könnte bei entzündlichen Erkrankungen der Haut eine Verbesserung der Symptome oder sogar eine Genesung erreicht werden.

4.4. Zusammenfassung

Die Haut des Menschen hat als Grenzorgan zu seiner Umwelt eine wichtige Schutzfunktion. Ein wesentlicher Teil stellt der Schutz vor Infektionen mit pathogenen Keimen dar. Dafür müssen Keratinozyten Mikroorganismen erkennen und eine Aktivierung des Immunsystems auslösen. Diese Aufgabe wird durch Rezeptoren, zu denen auch der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) gehört, erfüllt. Der AhR ist ein intrazellulärer Transkriptionsfaktorrezeptor, der zunächst im Zusammenhang mit Vergiftungen durch Dioxine untersucht wurde. Mittlerweile sind vielfältige Funktionen des AhR bekannt, die die Homöostase der Haut aufrechterhalten. Für die Homöostase der Haut spielt eine ausgeglichene Besiedlung durch Mikroorganismen, zu denen auch Staphylokokken gehören, eine wichtige Rolle. Basierend auf unpublizierten Ergebnissen der Arbeitsgruppe Harder sollte in dieser Arbeit im Wesentlichen die Aktivierung des AhRs durch den abundanten Haut-Kommensalen *Staphylococcus (S.) epidermidis* untersucht werden. Über diesen ist bekannt, dass seine Besiedlung der Haut die kutane Immunabwehr verbessert.

Durch Analyse der Aktivierung des AhR-Zielgens CYP1A1 konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *S. epidermidis* Faktoren < 2 kDa sezerniert, die den AhR in kultivierten Keratinozyten aktivieren. Stimulationen von Keratinozyten mit Kulturüberständen von *S. epidermidis*, die in unterschiedlichen Tryptophan-Konzentrationen kultiviert worden sind, ergaben, dass mehr Tryptophan zu einer stärkeren AhR Aktivierung führte. Somit handelt es sich bei den AhR-Aktivatoren im Kulturüberstand von *S. epidermidis* vermutlich um Tryptophanmetabolite. Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das pathogene Bakterium *Staphylococcus aureus* auch Faktoren < 2 kDa sezerniert, die den AhR in Keratinozyten aktivieren können. Diese Ergebnisse zeigen, dass Staphylokokken generell in der Lage sind, den AhR in Keratinozyten zu aktivieren. Welche Auswirkungen dies auf die angeborene kutane Abwehr hat, müssen weitere Studien ergeben. Des Weiteren müssen zukünftige Studien die verantwortlichen AhR-Aktivatoren identifizieren und zeigen, ob es sich dabei um direkte Ligandenbindung an den AhR handelt oder um eine indirekte AhR-Aktivierung durch Modulation endogener AhR Liganden. Ein besseres Verständnis der Rolle des AhR in der Erkennung von Mikroorganismen könnte langfristig zur Optimierung der Therapie oder Prophylaxe von Infektionserkrankungen beitragen.

5. Quellenverzeichnis

- Abel, J., & Haarmann-Stemmann, T. (2010). An introduction to the molecular basics of aryl hydrocarbon receptor biology. *Biological Chemistry*, 391(11), 1235–1248. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.128>
- Albers, K. M. (1996). Keratin biochemistry. *Clinics in Dermatology*, 14(4), 309–320. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00060-0](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00060-0)
- Anderson, G., Beischlag, T. V., Vinciguerra, M., & Mazzoccoli, G. (2013). The circadian clock circuitry and the AHR signaling pathway in physiology and pathology. *Biochemical Pharmacology*, 85(10), 1405–1416. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2013.02.022>
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Berg, P., & Pongratz, I. (2002). Two parallel pathways mediate cytoplasmic localization of the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32310–32319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203351200>
- Bergander, L. V., Cai, W., Klocke, B., Seifert, M., & Pongratz, I. (2016). Tryptamine Serves As a Proligand of the AhR Dependent of Monoamine Oxidases, 26(November), 1542–1551. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1351>
- Bock, K. W., & Köhle, C. (2006). Ah receptor: Dioxin-mediated toxic responses as hints to deregulated physiologic functions. *Biochemical Pharmacology*, 72(4), 393–404. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2006.01.017>
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., & Fusenig, N. E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), 761–771. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2450098>
- Burbach, K. M., Polandt, A., & Bradfield, C. A. (1992). Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor, 89(September), 8185–8189.
- BURKE, M. D., & MAYER, R. T. (1974). ETHOXYRESORUFIN: DIRECT FLUORIMETRIC ASSAY OF A MICROSOMAL O-DEALKYLATION WHICH IS PREFERENTIALLY INDUCIBLE BY 3-METHYLCHOLANTHRENE. *Drug Metabolism and Disposition*, 2(6).
- Chambers, H. F., & DeLeo, F. R. (2009). Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629–641. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2200>
- Chen, H. S., & Perdew, G. H. (1994). Subunit composition of the heteromeric cytosolic aryl hydrocarbon receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(44), 27554–27558. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7961671>
- Chiaro, C. R., Patel, R. D., Marcus, C. B., & Perdew, G. H. (2007). Evidence for an aryl hydrocarbon receptor-mediated cytochrome p450 autoregulatory pathway.

- Molecular Pharmacology*, 72(5), 1369–1379.
<https://doi.org/10.1124/mol.107.038968>
- Chng, K. R., Tay, A. S. L., Li, C., Ng, A. H. Q., Wang, J., Suri, B. K., ... Nagarajan, N. (2016). Whole metagenome profiling reveals skin microbiome-dependent susceptibility to atopic dermatitis flare. *Nature Microbiology*, 1(9), 16106.
<https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.106>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156–159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Christensen, G. J. M., & Brüggemann, H. (2014). Bacterial skin commensals and their role as host guardians. *Beneficial Microbes*, 5(2), 201–215.
<https://doi.org/10.3920/BM2012.0062>
- Chu, M. C., Melish, M. E., & James, J. F. (1989). Growth of toxic shock syndrome toxin 1-producing, tryptophan-requiring strains of *Staphylococcus aureus* associated with the presence of *Escherichia coli*. *Rev.Infect.Dis.*, 11 Suppl 1(February), S101–S103.
- Davarinos, N. A., & Pollenz, R. S. (1999). Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(40), 28708–28715. <https://doi.org/10.1074/JBC.274.40.28708>
- Denison, M. S., & Faber, S. C. (2017). And Now for Something Completely Different: Diversity in Ligand-Dependent Activation of Ah Receptor Responses. *Current Opinion in Toxicology*, 2, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.01.006>
- Denison, M. S., & Nagy, S. R. (2003). Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43(1), 309–334. Retrieved from <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12540743>
- Denison, M. S., Soshilov, A. a., He, G., Degroot, D. E., & Zhao, B. (2011). Exactly the same but different: Promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicological Sciences*, 124(1), 1–22. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr218>
- Di Meglio, P., Duarte, J. H., Ahlfors, H., Owens, N. D. L., Li, Y., Villanova, F., ... Stockinger, B. (2014). Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity*, 40(6), 989–1001.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.04.019>
- Dolwick, K. M., Swanson, H. I., & Bradfield, C. A. (1993). In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition, 90, 8566–8570. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC47398/pdf/pnas01475-0270.pdf>
- Ema, M., Sogawa, K., Watanabe, N., Chujoh, Y., Matsushita, N., Gotoh, O., ... Fujii-Kuriyama, Y. (1992). cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184(1), 246–253.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91185-S](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91185-S)

- Enan, E., & Matsumura, F. (1996). Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochemical Pharmacology*, 52(10), 1599–1612. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(96\)00566-7](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(96)00566-7)
- Evans, B. R., Karchner, S. I., Allan, L. L., Pollenz, R. S., Tanguay, R. L., Jenny, M. J., ... Hahn, M. E. (2008). Repression of aryl hydrocarbon receptor (AHR) signaling by AHR repressor: role of DNA binding and competition for AHR nuclear translocator. *Molecular Pharmacology*, 73(2), 387–398. <https://doi.org/10.1124/mol.107.040204>
- Fagerberg, L., Hallström, B. M., Oksvold, P., Kampf, C., Djureinovic, D., Odeberg, J., ... Uhlén, M. (2014). Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 13(2), 397–406. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035600>
- Fischetti, V. A., Novick, R. P., Ferretti, J. J., Portnoy, D. A., & Rood, J. J. (2000). Gram-positive pathogens. *Gram-Positive Pathogens*. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013038301>
- Forrester, A. R., Elias, M. S., Woodward, E. L., Graham, M., Williams, F. M., & Reynolds, N. J. (2014). Induction of a chloracne phenotype in an epidermal equivalent model by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is dependent on aryl hydrocarbon receptor activation and is not reproduced by aryl hydrocarbon receptor knock down. *Journal of Dermatological Science*, 73(1), 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.09.001>
- Fujisawa-Sehara, A., Yamane, M., & Fujii-Kuriyama, Y. (1988). A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: Its possible translocation to nucleus. *Biochemistry*, 85, 5859–5863. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281864/pdf/pnas00295-0109.pdf>
- Fukunaga, B. N., & Hankinson, O. (1996). Identification of a novel domain in the aryl hydrocarbon receptor required for DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(7), 3743–3749. <https://doi.org/10.1074/JBC.271.7.3743>
- Fukunaga, B. N., Probst, M. R., Reisz-Porszasz, S., & Hankinson, O. (1995). Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29270–29278. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.49.29270>
- Garrity, G., Richard W. Boone, D. R. . C., Boone, D. R., & Castenholz, R. W. (2001). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. (D. R. Boone, R. W. Castenholz, & G. M. Garrity, Eds.). New York, NY: Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6>
- Haarmann-Stemann, T., Bothe, H., & Abel, J. (2009). Growth factors, cytokines and their receptors as downstream targets of arylhydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Biochemical Pharmacology*, 77(4), 508–520. <https://doi.org/10.1016/J.BCP.2008.09.013>
- Haas, K., Weighardt, H., Deenen, R., Köhrer, K., Clausen, B., Zahner, S., ... Esser,

- C. (2016). Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity. *Journal of Investigative Dermatology*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.06.627>
- Hahn, M. E., Karchner, S. I., Shapiro, M. A., & Perera, S. A. (1997). Molecular evolution of two vertebrate aryl hydrocarbon (dioxin) receptors (AHR1 and AHR2) and the PAS family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(25), 13743–13748. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=28377&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hesse, B., & Harder Kiel, J. (n.d.). Untersuchungen zur Bedeutung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors in der kutanen Abwehr.
- Heuvel, J., Clark, G. C., Thompson, C. L., McCoy, Z., Miller, C. R., Lucier, G. W., & Bell, D. a. (1993). CYP1A1 mRNA levels as a human exposure biomarker: use of quantitative polymerase chain reaction to measure CYP1A1 expression in human peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis*, 14(10), 2003–2006.
- Ikuta, T., Kobayashi, Y., & Kawajiri, K. (2004). Cell density regulates intracellular localization of aryl hydrocarbon receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 19209–19216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310492200>
- Jaeger, A., Bardehle, D., Oster, M., Günther, J., Muráni, E., Ponsuksili, S., ... Kemper, N. (2015). Gene expression profiling of porcine mammary epithelial cells after challenge with *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in vitro. *Veterinary Research*, 46(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0178-z>
- Jin, U.-H., Lee, S.-O., Sridharan, G., Lee, K., Davidson, L. A., Jayaraman, A., ... Safe, S. (2014). Microbiome-Derived Tryptophan Metabolites and Their Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Agonist and Antagonist Activities. *Molecular Pharmacology*, 85(5), 777–788. <https://doi.org/10.1124/mol.113.091165>
- Jones, C. L., & Reiners, J. J. (1997). Differentiation Status of Cultured Murine Keratinocytes Modulates Induction of Genes Responsive. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 347(2), 163–173. <https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0350>
- Jux, B., Kadow, S., & Esser, C. (2009). Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(11), 6709–6717. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713344>
- Jux, B., Kadow, S., Luecke, S., Rannug, A., Krutmann, J., & Esser, C. (2011). The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation-Induced Skin Tanning. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(1), 203–210. <https://doi.org/10.1038/JID.2010.269>
- Kumar, M. B., Ramadoss, P., Reen, R. K., Vanden Heuvel, J. P., & Perdew, G. H. (2001). The Q-rich subdomain of the human Ah receptor transactivation domain is required for dioxin-mediated transcriptional activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(45), 42302–42310. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104798200>
- Lai, Y., Cogen, A. L., Radek, K. A., Park, H. J., Macleod, D. T., Leichtle, A., ... Gallo, R. L. (2010). Activation of TLR2 by a small molecule produced by

- Staphylococcus epidermidis increases antimicrobial defense against bacterial skin infections. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(9), 2211–2221. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.123>
- Lai, Y., Di Nardo, A., Nakatsuji, T., Leichtle, A., Yang, Y., Cogen, A. L., ... Gallo, R. L. (2009). Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. *Nature Medicine*, 15(12), 1377–1382. <https://doi.org/10.1038/nm.2062>
- Li, D., Lei, H., Li, Z., Li, H., Wang, Y., & Lai, Y. (2013). A Novel Lipopeptide from Skin Commensal Activates TLR2/CD36-p38 MAPK Signaling to Increase Antibacterial Defense against Bacterial Infection. *PLoS ONE*, 8(3), e58288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058288>
- Li, Y., Wang, K., Jiang, Y.-Z., Chang, X.-W., Dai, C.-F., & Zheng, J. (2014). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cellular Oncology (Dordrecht)*, 37(6), 429–437. <https://doi.org/10.1007/s13402-014-0206-4>
- Lin, P., Chang, H., Tsai, W.-T., Wu, M.-H., Liao, Y.-S., Chen, J.-T., & Su, J.-M. (2003). Overexpression of Aryl Hydrocarbon Receptor in Human Lung Carcinomas. *TOXICOLOGIC PATHOLOGY*, 31(1), 22–30. <https://doi.org/10.1080/01926230390173824>
- Luecke-Johansson, S., Gralla, M., Rundqvist, H., Ho, J. C., Johnson, R. S., Gradin, K., & Poellinger, L. (2017). A Molecular Mechanism To Switch the Aryl Hydrocarbon Receptor from a Transcription Factor to an E3 Ubiquitin Ligase. *Molecular and Cellular Biology*, 37(13). <https://doi.org/10.1128/MCB.00630-16>
- Lüllmann-Rauch, R. (2015). *Taschenbuch Histologie*. Thieme. Retrieved from <https://www.thieme.de/shop/Anatomie-Histologie-Embryologie/Luellmann-Rauch-Asan-Taschenlehrbuch-Histologie-9783131292452/p/000000000145900105>
- Ma, Q., & Whitlock, J. P. (1997). A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(14), 8878–8884. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.14.8878>
- Magiatis, P., Pappas, P., Gaitanis, G., Mexia, N., Melliou, E., Galanou, M., ... Ioannis, D. (2014). Malassezia yeasts produce a collection of exceptionally potent activators of the Ah (dioxin) receptor detected in diseased human skin, 133(8), 2023–2030. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.92.Malassezia>
- Merchant, M., Arellano, L., & Safe, S. (1990). The mechanism of action of α -naphthoflavone as an inhibitor of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced CYP1A1 gene expression. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 281(1), 84–89. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90416-V](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90416-V)
- Mimura, J., Ema, M., Sogawa, K., & Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes & Development*, 13(1), 20–25. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.20>
- Moura-Alves, P., Fae, K., Houthuys, E., Dorhoi, A., Kreuchwig, A., Furkert, J., ...

- Kaufmann, S. H. (2014). AhR sensing of bacterial pigments regulates antibacterial defence. *Nature*, *512*(7515), 387–392. <https://doi.org/10.1038/nature13684>
- Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M. J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., ... Belkaid, Y. (2012). Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science (New York, N.Y.)*, *337*(6098), 1115–1119. <https://doi.org/10.1126/science.1225152>
- Nair, S. C., Toran, E. J., Rimerman, R. a, Hjermsstad, S., Smithgall, T. E., & Smith, D. F. (1996). A pathway of multi-chaperone interactions common to diverse regulatory proteins: estrogen receptor, Fes tyrosine kinase, heat shock transcription factor Hsf1, and the aryl hydrocarbon receptor. *Cell Stress & Chaperones*, *1*(4), 237–250. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(1996\)001<0237:APOMCI>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(1996)001<0237:APOMCI>2.3.CO;2)
- Nakatsuji, T., Chen, T. H., Narala, S., Chun, K. A., Two, A. M., Yun, T., ... Gallo, R. L. (2017). Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. *Science Translational Medicine*, *9*(378). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aah4680>
- Nebert, D. W. (2017). Aryl hydrocarbon receptor (AHR): “pioneer member” of the basic-helix/loop/helix per-Arnt-sim (bHLH/PAS) family of “sensors” of foreign and endogenous signals. *Progress in Lipid Research*, *67*, 38–57. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.06.001>
- Nebert, D. W., & Gonzalez, F. J. (1987). P450 Genes: Structure, Evolution, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, *56*(1), 945–993. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.004501>
- Nishiumi, S., Yoshida, K., & Ashida, H. (2007). Curcumin suppresses the transformation of an aryl hydrocarbon receptor through its phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *466*(2), 267–273. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2007.08.007>
- Noakes, R. (2015). The aryl hydrocarbon receptor: a review of its role in the physiology and pathology of the integument and its relationship to the tryptophan metabolism. *International Journal of Tryptophan Research : IJTR*, *8*, 7–18. <https://doi.org/10.4137/IJTR.S19985>
- Öberg, M., Bergander, L., Håkansson, H., Rannug, U., & Rannug, A. (2005). Identification of the tryptophan photoproduct 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background aryl hydrocarbon receptor activity. *Toxicological Sciences*, *85*(2), 935–943. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi154>
- Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*--the “accidental” pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, *7*(8), 555–567. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2182>
- Perdew, G. H. (1988). Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. TL - 263. *The Journal of Biological Chemistry*, *263* VN-(27), 13802–13805. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2843537>
- Pongratz, I., Mason, G. G., & Poellinger, L. (1992). Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor.

- Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(19), 13728–13734. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1320028>
- Puga, A., Maier, A., & Medvedovic, M. (2000). The transcriptional signature of dioxin in human hepatoma HepG2 cells. *Biochemical Pharmacology*, 60(8), 1129–1142. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(00\)00403-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(00)00403-2)
- Ray, S. S., & Swanson, H. I. (2004). Dioxin-induced immortalization of Normal Human Keratinocytes and Silencing of p53 and p16 INK4a * □ S. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402771200>
- Salzano, M., Marabotti, A., Milanese, L., & Facchiano, A. (2011). Human aryl-hydrocarbon receptor and its interaction with dioxin and physiological ligands investigated by molecular modelling and docking simulations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 413(2), 176–181. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.08.039>
- Sato, K. I., Sato, A., Aoto, M., & Fukami, Y. (1995). c-SRC Phosphorylates Epidermal Growth Factor Receptor on Tyrosine 845. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 215(3), 1078–1087. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1995.2574>
- Simones, T., & Shepherd, D. M. (2011). Consequences of AhR activation in steady-state dendritic cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 119(2), 293–307. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq354>
- Smirnova, A., Wincent, E., Vikström Bergander, L., Alsberg, T., Bergman, J., Rannug, A., & Rannug, U. (2016). Evidence for New Light-Independent Pathways for Generation of the Endogenous Aryl Hydrocarbon Receptor Agonist FICZ. *Chemical Research in Toxicology*, 29(1), 75–86. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00416>
- Sorg, O., Zennegg, M., Schmid, P., Fedosyuk, R., Valikhnovskyi, R., Gaide, O., ... Saurat, J. H. (2009). 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) poisoning in Victor Yushchenko: identification and measurement of TCDD metabolites. *The Lancet*, 374(9696), 1179–1185. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60912-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60912-0)
- Stockinger, B., Di Meglio, P., Gialitakis, M., & Duarte, J. H. (2014). The aryl hydrocarbon receptor: multitasking in the immune system. *Annu Rev Immunol*, 32, 403–432. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120245>
- Swanson, H. I. (2004). Cytochrome P450 expression in human keratinocytes: An aryl hydrocarbon receptor perspective. *Chemico-Biological Interactions*, 149(2–3), 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.08.006>
- Thapaliya, D., Taha, M., Dalman, M. R., Kadariya, J., & Smith, T. C. (2017). Environmental contamination with *Staphylococcus aureus* at a large, Midwestern university campus. *Science of The Total Environment*, 599, 1363–1368. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.080>
- Van Den Bogaard, E. H., Bergboer, J. G. M., Vonk-Bergers, M., Van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Hato, S. V., Van Der Valk, P. G. M., ... Schalkwijk, J. (2013). Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *Journal of*

- Clinical Investigation*, 123(2), 917–927. <https://doi.org/10.1172/JCI65642>
- van den Bogaard, E. H., Podolsky, M. A., Smits, J. P., Cui, X., John, C., Gowda, K., ... Glick, A. B. (2015). Genetic and pharmacological analysis identifies a physiological role for the AHR in epidermal differentiation. *The Journal of Investigative Dermatology*, 135(5), 1320–1328. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.6>
- Vierkötter, A., Schikowski, T., Ranft, U., Sugiri, D., Matsui, M., Krämer, U., & Krutmann, J. (2010). Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(12), 2719–2726. <https://doi.org/10.1038/JID.2010.204>
- Vogel, C. F. A., Khan, E. M., Leung, P. S. C., Gershwin, M. E., Chang, W. L. W., Wu, D., ... Denison, M. S. (2014). Cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and the inflammatory response: a role for nuclear factor- κ B. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(3), 1866–1875. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.505578>
- Wall, R. J., He, G., Denison, M. S., Congiu, C., Onnis, V., Fernandes, A., ... Mellor, I. R. (2012). Novel 2-amino-isoflavones exhibit aryl hydrocarbon receptor agonist or antagonist activity in a species/cell-specific context. *Toxicology*, 297(1–3), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.03.011>
- Wincent, E., Bengtsson, J., Mohammadi Bardbori, A., Alsberg, T., Luecke, S., Rannug, U., & Rannug, A. (2012). Inhibition of cytochrome P4501-dependent clearance of the endogenous agonist FICZ as a mechanism for activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(12), 4479–4484. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118467109>
- Zamaratskaia, G., & Zlabek, V. (2009). EROD and MROD as Markers of Cytochrome P450 1A Activities in Hepatic Microsomes from Entire and Castrated Male Pigs. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 9(3), 2134–2147. <https://doi.org/10.3390/s90302134>
- Zelante, T., Iannitti, R., Cunha, C., DeLuca, A., Giovannini, G., Pieraccini, G., ... Romani, L. (2013). Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*, 39(2), 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.003>
- Zhao, B., Degroot, D. E., Hayashi, A., He, G., & Denison, M. S. (2010). CH223191 is a ligand-selective antagonist of the Ah (Dioxin) receptor. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 117(2), 393–403. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq217>

6. Danksagung

Abschließend möchte ich mich sehr herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Jürgen Harder für die Überlassung des interessanten Themas und die methodische und wissenschaftliche Unterstützung während meiner Dissertation.

Besonders möchte ich auch Dr. Maren Simanski für die Hilfe und guten Ratschläge bei der Anfertigung der Dissertation danken.

Außerdem möchte Dr. Joachim Bartels danken, der freundlicherweise die HPLC-Untersuchungen der Kulturüberstände durchgeführt hat.

Für die gute Einarbeitung und große Unterstützung im Labor, aber auch die schöne, Zeit, möchte ich mich bei Heilwig Hinrichs, Cornelia Wilgus, Dr. Franziska Rademacher, Bettina Hesse und bei der gesamten Arbeitsgruppe Harder ganz herzlich bedanken.

Großer Dank gilt auch meinen Eltern für ihre Unterstützung und dafür, dass sie mir mein Studium und diese Dissertation ermöglicht haben.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken, die meine Arbeit kritisch gelesen und mich immer wieder motiviert haben.