

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie der Medizinischen
Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die circadiane Uhr der Haut

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Florian Spörl

aus Dachau

Gutachter: 1. Prof. Dr. A. Kramer

2. Prof. Dr. S. Brown

3. Prof. Dr. D. Gatfield

Datum der Promotion: 01.02.2013

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	3
Abstract	3
Einleitung und Zielsetzung.....	4
Ergebnisse	5
Diskussion	10
Material und Methoden	11
Zitierte eigene Publikationen, die im Rahmen der Dissertation erstellt wurden.....	12
Weitere Referenzen	13
2. Anteilserklärung.....	15
3. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	19
4. Lebenslauf.....	20
5. Publikationsliste	21
6. Selbständigkeitserklärung	22
7. Danksagung.....	23

1. Zusammenfassung

Abstract

Circadiane Rhythmen steuern eine Vielzahl zellulärer und physiologischer Prozesse und ermöglichen so eine prädiktive Anpassung von Organismen an tageszeitliche Veränderung von Umweltfaktoren wie Nahrungsangebot, Temperatur oder Pathogenexposition. Die humane Epidermis bildet die äußerste Barriere zwischen Körper und Umwelt und ist daher naturgemäß in großem Maße tageszeitspezifischen Einwirkungen wie UV Strahlung und mechanischer Belastung ausgesetzt. Trotz dieser Tatsache ist das circadiane System in humaner Haut bisher kaum erforscht. Es ist beispielsweise weder belegt, ob epidermale Hautzellen eine funktionale circadiane Uhr besitzen, noch, ob und wie diese Uhr möglicherweise zur Regulation von Hautfunktionen beisteuert.

In dieser Arbeit wurde das circadiane System humaner Epidermis grundlegend *in vitro* und *in vivo* untersucht. Es konnte durch Echtzeit-Reportergenmessungen und Genexpressions-Zeitreihen erstmalig gezeigt werden, dass sowohl immortalisierte als auch primäre epidermale Keratinozyten eine funktionale, zellautonome circadiane Uhr besitzen. Durch genomweite Microarray-Analysen konnte zudem das circadiane Transkriptom (ca. 300 signifikant oszillierende Gene) in humanen Epidermisproben bestimmt werden. Neben bekannten Uhr-Genen wie *Bmal1*, *Per1* und *Rev-Erba* wurden hierbei u.a. eine Reihe von Transkriptionsfaktoren identifiziert, die eine tageszeitabhängige Expressionsdynamik aufweisen. Weiterführende funktionale Untersuchungen zeigten eine maßgebliche Funktion des circadianen Transkriptionsfaktors *Klf9* für die Kontrolle epidermaler Proliferation. *Klf9* mRNA und Proteinlevel sind in differenzierten, proliferativ nicht aktiven Epidermisschichten erhöht, und die *Klf9* Gendosis beeinflusst maßgeblich die Proliferation primärer Keratinozyten.

Interessanterweise zeigte *Klf9* eine starke Sensitivität gegenüber Cortisol, dessen Konzentration sowohl in Saliva als auch in Saugblasenflüssigkeit ebenfalls einer robusten circadianen Dynamik unterliegt. Die hier gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass rhythmische *Klf9* Transkription *in vivo* zumindest teilweise durch systemisches Cortisol aber auch durch die lokale Epidermisuhr getrieben wird. Darüber hinaus wird die Hypothese aufgestellt, dass *Klf9* als *downstream* Mediator

für cortisolvermittelte Proliferationkontrolle in Keratinozyten fungiert. Cortisol und andere Glucocorticoide finden eine vielseitige Anwendung bei der Behandlung diverser Hautkrankheiten wie Psoriasis und atopischer Dermatitis. Diese Arbeit bildet daher die Grundlage für die Entwicklung von chronotherapeutisch optimierten Anwendungsstrategien für Glucocorticoidbehandlungen. Hierdurch könnte mittelfristig die Effektivität von topischen Glucocorticoidtherapien erhöht und die bekanntermaßen schweren Nebenwirkungen reduziert werden.

Einleitung und Zielsetzung

Um sich dem natürlichen Wechsel von Tag und Nacht anpassen zu können, werden diverse physiologische Prozesse in Organismen durch einen circadianen (~24 h) Rhythmus gesteuert [1]. Auf zellulärer Ebene werden circadiane Rhythmen durch ein genregulatorisches Netzwerk mit ineinander greifenden transkriptionellen Rückkopplungsschleifen generiert. Hierbei steuern die Transkriptionsfaktoren CLOCK und BMAL1 die circadiane Expression von Zielgenen (*clock controlled genes*) durch Bindung an regulatorische Elemente (z.B. E-Boxen) in der Promotorregion. Der Rückkopplungsmechanismus wird durch die rhythmische Expression der E-Box regulierten Proteine PER und CRY gebildet, die ihrerseits den CLOCK/BMAL1 Komplex blockieren. Zusätzlich bildet REV-ERB α durch die zyklische Inhibierung der *Bmal1* Expression eine weitere negative Rückkopplungsschleife [2].

In verschiedenen Hautzellen (Keratinozyten, Melanozyten, Fibroblasten) wurden Kernkomponenten der molekularen Uhr bereits nachgewiesen [3] und in muriner Haut wurde eine molekulare circadiane Uhr identifiziert [4]. Zudem gibt es Hinweise, dass verschiedene Hautfunktionen (Barriereintegrität, pH Regulierung, Sebumsekretion) circadian reguliert werden [5,6,7]. Ebenso wurde gezeigt, dass primäre dermale Fibroblasten und Haarwurzel-Keratinozyten eine funktionsfähige zellautonome circadiane Uhr aufweisen [8]. Der Nachweis einer funktionsfähigen circadianen Uhr in anderen humanen Hautzellen, insbesondere in epidermalen Keratinozyten, ist bisher jedoch nicht erbracht. Auch ist bislang

unklar, ob und in welcher Weise die lokale Epidermisuhr an einer rhythmischen Regulation von zellulären und/oder hautphysiologischen Prozessen beteiligt ist.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das circadiane System humaner epidermaler Keratinozyten *in vitro* und *in vivo* grundlegend untersucht werden. Hierzu sollte u.a. ein *in vitro* Zellkulturmodell mit epidermalen Keratinozyten etabliert werden, das die Analyse circadianer Genexpression in synchronisierten Zellkulturen ermöglicht. Hierdurch sollte festgestellt werden, ob humane Keratinozyten ein funktionales, zellautonomes circadianes Uhrwerk besitzen. Schwerpunktmäßig sollte durch tageszeitspezifische Entnahme von Hautbiopsien und anschließenden genomweiten Microarray-Analysen das circadiane Transkriptom der Haut erfasst werden. Aus diesem Datensatz sollten zelluläre Funktionen und einzelne Zielgene identifiziert werden, die möglicherweise an einer circadianen Kontrolle zellulärer Prozesse beteiligt sind. Durch funktionale Charakterisierung einzelner circadianer Zielgene sollten abschließend mechanistische Erkenntnisse über die zellphysiologische Relevanz dieser Gene generiert werden. Somit sollte diese Arbeit zum grundlegenden Verständnis der Funktionsweise und der Relevanz des circadianen Systems in humaner Epidermis beitragen.

Ergebnisse

Eine circadiane Uhr in humaner Epidermis

Die Steuerung circadianer Genexpression in peripheren Geweben ist maßgeblich abhängig von lokalen, zellautonomen Oszillatoren [9]. Diese lokalen Uhrwerke kontrollieren je nach Gewebe die rhythmische Transkription von ca. 2-10% aller exprimierter Gene [10]. Hierzu stehen in vielen Geweben insbesondere Transkriptionsfaktoren unter direkter Kontrolle der circadianen Uhr, die ihrerseits wiederum die rhythmische Expression entsprechender Zielgene modulieren [11]. Das circadiane Transkriptom ist gewebspezifisch, und die Schnittmenge rhythmisch exprimierter Gene in unterschiedlichen Geweben ist erstaunlich gering [12]. Folglich werden je nach Zell- bzw. Gewebetyp unterschiedliche physiologische Prozesse durch die circadiane Uhr beeinflusst [10,13]. In humaner Epidermis ist das Vorhandensein einer molekularen Uhr bisher nicht untersucht, und ein Zusammenhang zwischen circadianer

Genexpression in diesem Gewebe und möglichen tageszeitabhängig regulierten Hautfunktionen bisher nicht hergestellt.

Um zu untersuchen, ob epidermale Keratinozyten prinzipiell eine zellautonome, funktionale Uhr besitzen, wurden zunächst immortalisierte HaCaT Keratinozyten [14] als Modellsystem zur Analyse circadianer Genexpression etabliert. Immunfärbungen zeigten das Vorhandensein und die korrekte Lokalisation der integralen Uhr-Proteine PER1 und CLOCK (FS2 Fig. 1a). Unter der Verwendung eines *Bmal1* Luziferasereporters konnten anschließend robuste circadiane Oszillation in der *Bmal1* Promotoraktivität nachgewiesen werden (FS2 Fig. 1c). Genetische und pharmakologische Störungen der molekularen Uhr in HaCaT Keratinozyten führten zu (aus murinen Modellsystemen) erwarteten circadianen Phänotypen (Periodenänderungen bzw. Arrhythmizität) (FS2 Fig. 2). Somit zeigten sich HaCaT Zellen als robustes Modellsystem zur Analyse circadianer Rhythmen in epidermalen Keratinozyten. In weiterführenden Experimenten wurde Temperatur als maßgeblicher Zeitgeber zur robusten Synchronisation der HaCaT Uhr identifiziert. Temperaturzyklen (12h 37°C/ 12h 33°C) führten zu einer Erhöhung der *Bmal1*_Luc Amplitude und ermöglichten eine Re-Synchronisierung des HaCaT Oszillators (FS2 Fig. 3). Darüber hinaus führte Temperatur-Synchronisation zu einer Erhöhung der Amplitude als auch der Anzahl oszillierender Gene (sowohl bekannter Uhr-Gene als auch Uhr-kontrollierter Gene) im Vergleich zu Dexamethason-Synchronisierung (FS2 Fig. 4 und 1d-f). Das etablierte Modell ermöglicht somit neben der Charakterisierung der molekularen Uhr in einer Keratinozytenzelllinie auch die Identifizierung von potentiell Uhr-kontrollierten Genen mit Implikationen für epidermale Physiologie.

Da die erhobenen HaCaT Daten vielversprechende Hinweise auf circadiane Genexpression in humaner Epidermis lieferten, wurden anschließend *in vivo* Studien zur Detektion rhythmisch transkribierter Gene in humaner Epidermis durchgeführt. Um zu testen, ob tageszeitabhängige Genexpression in humaner Epidermis nachweisbar ist, wurden Epidermisproben von 20 hautgesunden Probanden an je drei unterschiedlichen Tageszeitpunkten mittels Saugblasentechnologie [15] entnommen und die globale Genexpression durch Microarray-Analysen erfasst. Als Positivkontrolle für circadiane Rhythmik wurden Cortisol-Level in den entsprechenden Saugblasenflüssigkeiten (SBF) analysiert. In Übereinstimmung mit der seit langem bekannten circadianen Regulation von

systemischen Cortisol-Leveln konnte eine signifikante Abnahme des Cortisols in SBF über den Tag festgestellt werden (FS1 Fig. 1A). Um zu testen, ob dieses Setup ebenso die Detektion tageszeitabhängiger Genexpression in Saugblasenepidermis ermöglicht, wurden genomweite Microarray-Analysen mit Epidermisproben von 19 Probanden durchgeführt. Insgesamt wurden 18224 annotierte Gene als exprimiert in der Epidermis identifiziert. Die bekannten Uhr-Gene *Bmal1*, *Rev-Erba* und *Per1* zeigten hierbei eine signifikante tageszeitabhängige Regulation mit einer Phasenbeziehung, die dem molekularen Aufbau der circadianen Uhr entspricht (*Bmal1* Expression steigt über den Tag, wohingegen die Expression des *Bmal1*-Repressors *Rev-Erba* sinkt) (FS1 Fig. 1B-D). Die circadiane Phase dieser drei Gene erwies sich als homogen zwischen den Probanden, wohingegen eine starke inter-individuelle Varianz in der „Amplitude“ (maximale Expression - minimale Expression) festgestellt wurde. Interessanterweise zeigte sich hierbei eine signifikante Korrelation in den inter-individuellen Amplitudenvarianzen von *Per1* und *Rev-Erba* (FS1 Fig. 1E). Folglich sind die starken Amplitudenvarianzen mit hoher Wahrscheinlichkeit auf individuelle Unterschiede im epidermalen Oszillator einzelner Probanden zurückzuführen.

Mittels statistischer Analyse wurden genomweit ~300 Transkripte identifiziert, die eine signifikante circadiane Expressionsdynamik aufweisen (FS1 Fig. 1F und Tab. S1B) und anschließende KEGG Analysen zeigten u.a. eine Anreicherung der Pathways „Circadian Rhythms“, „Cell Cycle“ und „Metabolic Processes“ (FS1 Tab. S1A). Dies deutet auf eine circadiane Regulation einer Vielzahl zellphysiologischer Prozesse in der Epidermis hin. Um circadiane Genexpression in der Epidermis zu validieren, wurde eine *in vivo* Studie durchgeführt, in der 6 Probanden alle 4 h über einen Zeitraum von 24 h Stanzbiopsien entnommen wurden. qPCR Analysen aus der Epidermis dieser Stanzbiopsien zeigten eine signifikante circadiane Genexpression der Uhr-Gene *Bmal1* und *Per1* sowie der potentiell Uhr-kontrollierten Genen *Klf9* und *Zbtb16* (FS1 Fig. 2A). Somit konnte in zwei unabhängigen Studien circadiane Genexpression in humaner Epidermis nachgewiesen werden.

Circadiane Genexpression in peripheren Geweben ist maßgebliche von lokalen zellulären Oszillatoren aber auch von rhythmisch vorhanden systemischen Faktoren (z.B. Hormonen) abhängig [9]. Um zwischen diesen

Faktoren differenzieren zu können, wurde aufbauend auf dem HaCaT Modell ein Zellkulturmodell zur Charakterisierung circadianer Genexpression in primären epidermalen Keratinozyten *in vitro* etabliert. Hierbei konnte nach Synchronisation mit fötalem Kälberserum und Temperaturzyklen eine robuste circadiane Aktivierung des *Bmal1* Luziferase Promotorkonstrukts (auch unter konstanten Temperaturbedingungen) nachgewiesen werden (FS1 Fig. 2B). In Übereinstimmung hiermit zeigte u.a. die *Bmal1* sowie *Per1* mRNA Abundanz in synchronisierten Keratinozyten ebenfalls eine robuste circadiane Dynamik (FS1 Fig. 2C). Im Gegensatz zu diesen Uhr-Genen zeigte *Klf9* nur unter externen Temperaturzyklen rhythmische Genexpression (FS1 Fig. 2C). Folglich scheint die *Klf9* Oszillation von systemischen Faktoren (wie z.B. Temperatur) abhängig zu sein. Zusammengefasst bestätigen diese *in vitro* Daten das Vorhandensein einer operativen circadianen Uhr auch in primären humanen epidermalen Keratinozyten und ermöglichen die Differenzierung zwischen circadianen Genen die (i) von der lokalen Keratinozytenuhr oder (ii) hauptsächlich durch systemische Faktoren getrieben sind.

Der circadiane Transkriptionsfaktor *Klf9* reguliert Proliferation

In dieser Arbeit wurde in humaner Epidermis die circadiane Expression von Uhr-Genen, aber auch (möglicherweise gewebsspezifischen) Uhr-kontrollierten Genen, insbesondere auch Transkriptionsfaktoren, nachgewiesen. Unter anderem konnte in zwei unabhängigen Studien die circadiane Expression des Transkriptionsfaktors *Krüppel-like-factor 9 (Klf9)* gezeigt werden (FS1 Fig. 2A und 3A). *Klf9* wies auch *in vitro* unter Temperaturzyklen rhythmische Expression mit einer ähnlichen Phase wie E-Box kontrollierten Genen (z.B. *Per1*) auf. In Übereinstimmung hiermit wurde eine funktionale konservierte E-Box in der *Klf9* Promotorregion identifiziert werden, die rhythmisch durch CLOCK/BMAL1 gebunden wird (FS1 Fig. S5E). Zudem führt die Überexpression von CLOCK/BMAL1 in einem reduzierten Zellsystem zur Aktivierung eines Luziferase-Reporters für dieses *Klf9*-Promotorfragment (FS1 Fig. S5E). Obwohl *Klf9* unter konstanten Bedingungen in Keratinozyten *in vitro* nicht robust oszilliert, deuten diese Daten darauf hin, dass CLOCK/BMAL1 *in vivo* an rhythmischer *Klf9* Expression beteiligt sein könnte, und *Klf9* somit nicht ausschließlich durch systemische Faktoren getrieben ist.

Klf9 ist in anderen Epithelgeweben als Modulator von Proliferations- und Differenzierungsprozessen beschrieben [16,17]. Um zu testen, ob *Klf9* in unterschiedlichen Differenzierungsstadien epidermaler Keratinozyten differenziell reguliert ist, wurde *Klf9* mRNA in validierten Zellfraktionen [18] aus epidermalen Keratinozyten, transient amplifizierenden (TA) Keratinozyten (Zellfraktionen mit hoher proliferativer Aktivität) und differenzierter Epidermis gemessen. Hierbei konnte eine starke (~30-fach) Induktion der *Klf9* Genexpression in differenzierter Epidermis gezeigt werden (FS1 Fig. 3B). In Übereinstimmung hiermit wurde in histologischen Hautschnitte KLF9 Protein hauptsächlich in suprabasalen, differenzierten Keratinozytenschichten detektiert (FS1 Fig. 3B). Um diese Ergebnisse in einem *in vitro* System zu validieren, wurden Keratinozyten in Kultur über zunehmende Konfluenz ausdifferenziert [19] und in regelmäßigen Abständen die *Klf9* Genexpression gemessen. Da *Klf9* in anderen Zelltypen in Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren [20] und Cortisol [21] exprimiert wird, wurde die Differenzierungszeitreihe unter autokrinen Bedingungen \pm Cortisol bzw. \pm Wachstumsfaktoren inkl. Cortisol durchgeführt. Hierbei wurde in Übereinstimmung mit den *in vivo* Daten beobachtet, dass *Klf9* während der Keratinozytendifferenzierung stärker exprimiert wird. Interessanterweise ist dieser Effekt abhängig von Cortisol jedoch nicht von anderen Wachstumsfaktoren (FS1 Fig. 3C). Maximale *Klf9*-Level wurden 4 Tage nach Konfluenz gemessen (FS1 Fig. 3C). Zu diesem Zeitpunkt zeigten auch der Differenzierungsmarker *Krt10* und der differenzierungsabhängige Zellzyklus-Inhibitor *p21* verstärkte Expression (FS1 Fig. S7A, B). Dies deutet auf eine mögliche Rolle von *Klf9* in differenzierungsabhängigen Prozessen wie Proliferationskontrolle hin.

Um zu testen, ob *Klf9* eine Funktion in der differenzierungsabhängigen Proliferationskontrolle primärer Keratinozyten ausübt, wurden Proliferationsstudien in Abhängigkeit der *Klf9* Gendosis durchgeführt. Zunächst wurde hierfür ein neuer Assay zur Echtzeit-Erfassung von Keratinozytenproliferation auf Basis von Impedanzmessungen etabliert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Impedanzmessungen eine Echtzeiterfassung der Proliferation primärer Keratinozyten ermöglicht (FS3 Fig. 1). Mit dieser Methode können kinetische Parameter in der Proliferationsdynamik sowie Membraneigenschaften erfasst werden, die mittels Endpunktbestimmung nicht

möglich sind (FS3 Fig. 5a-c). Dieses System wurde anschließend angewendet, um *Klf9* abhängige Proliferation in Keratinozyten in Echtzeit zu untersuchen. Hierfür wurden lentivirale Konstrukte zur Herunterregulation bzw. zur Überexpression von *Klf9* in primäre Keratinozyten integriert. Bei verringerter *Klf9* Gendosis wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der Keratinozytenproliferation sowohl in einem Endpunkt- als auch in dem etablierten Real-Time-Assay detektiert (FS1 Fig. 4A, B). Bei *Klf9* Überexpression wurde dagegen eine starke und konzentrationsabhängige Reduktion der Proliferation beobachtet (FS1 Fig. 4C, D). Interessanterweise führte eine wiederholte Glucocorticoidbehandlung (Dexamethason) zu einem vergleichbaren Wachstumsphänotyp wie eine *Klf9* Überexpression (FS1 Fig. 4D). Zusammengenommen zeigen diese Daten einen maßgeblichen Einfluss von *Klf9* (möglicherweise in Abhängigkeit von Glucocorticoiden) auf Keratinozytenproliferation.

Diskussion

Circadiane Uhren regulieren eine Vielzahl physiologischer Prozesse in peripheren Organen. Obwohl der molekulare Zusammenhang zwischen lokalen circadianen Oszillatoren und zellulären/physiologischen Prozessen in Mausmodellen für verschiedene Organe charakterisiert wurde [10,13,22], ist dies für das humane System nicht der Fall. Insbesondere das circadiane System humaner Haut wurde bisher auf molekularer Ebene kaum untersucht. Diese Arbeit zeigt erstmalig eine funktionale zellautonome Uhr in immortalisierten sowie primären humanen Keratinozyten. Zudem wurde in einem globalen Ansatz das circadiane Transkriptom humaner Epidermis beschrieben. Neben bekannten Uhr-Genen zeigten insbesondere Gene mit Implikationen für Zellzykluskontrolle und Metabolismus einen überproportionalen Anteil am circadianen Transkriptom der Haut. Interessanterweise sind diese Prozesse auch im murinen System maßgeblich durch die circadiane Uhr gesteuert [23]. Folglich geben die hier erhobenen Daten einen ersten Hinweis auf eine tageszeitspezifische Regulation von zentralen Prozessen in humaner Epidermis. Eine circadiane Kontrolle der Zellteilung könnte die DNA-Replikation beispielsweise zeitlich von potentiell

DNA-schädigenden Einflüssen wie oxydativem Metabolismus oder UV-Strahlung abgrenzen.

Einhergehend mit der These einer circadianen Proliferationskontrolle in humaner Epidermis wurde in dieser Arbeit ein neuer circadianer Transkriptionsfaktor (*Klf9*) mit proliferationshemmendem Einfluss auf primäre Keratinozyten identifiziert. Interessanterweise ist die *Klf9* Expression stark Cortisol-sensitiv und die tageszeitspezifische *Klf9* mRNA Abundanz ist phasengleich zu systemischem Cortisol in Saugblasenflüssigkeit. Es ist somit anzunehmen, dass rhythmische *Klf9* Expression maßgeblich durch systemisches Cortisol getrieben wird. In Übereinstimmung mit dieser These bewirkte eine ektopische Überexpression von *Klf9* in primären Keratinozyten einen ähnlichen Wachstumsphänotyp wie chronische Glucocorticoidbehandlung. Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass *Klf9* möglicherweise an circadianer Cortisol-abhängiger Proliferationskontrolle in humaner Epidermis beteiligt ist. Ein solcher Mechanismus hätte weitreichende klinische Implikationen, da Glucocorticoide regelmäßig zur Behandlung von Hautkrankheiten mit gestörter epidermaler Proliferationskontrolle (z.B. Psoriasis, Dermatitis) eingesetzt werden.

Mittelfristig könnten somit ähnlich zu rheumatoider Arthritis [24] chronotherapeutische Ansätze zur Glucocorticoidbehandlung von Hautkrankheiten entwickelt werden.

Material und Methoden

Probandenstudien: Alle *in vivo* Probandenstudien wurden nach den Richtlinien der aktuellen Version der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Probanden haben eine schriftliche Einwilligung zur Studienteilnahme gegeben. Die Entnahme von Hautstanzen wurde durch die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin zugestimmt (EA4/019/11). Der Chronotyp aller Probanden wurde ermittelt [25] und extreme Chronotypen wurden von den Studien ausgeschlossen. Für die Saugblasenstudie wurden 20 hautgesunde Probanden (10 weiblich, 10 männlich, Alter: 28.35 ± 4.36 Jahre), für die Stanzstudie 6 hautgesunde Probanden (4 weiblich, 2 männlich, 22-30 Jahre) rekrutiert. Saugblasen- bzw. Stanzbiopsieentnahmen wurden wie beschrieben durchgeführt [15,26]. Die Epidermis der Stanzbiopsien

wurde mittels Hitzeschock (3 min, 55°C in PBS) von der Dermis gelöst und bei -80°C eingefroren.

Microarray-Analyse: RNA Extraktion aus Saugblasenepidermis, Qualitätskontrolle der RNA und Hybridisierung auf Agilent Whole Genome Oligo Microarrays 4x44k (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) wurde durch die Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Normalisierung und Hintergrundkorrektur der Rohdaten wurde mittels R-Project-Bioconductor durchgeführt [27]. Differenzielle Genexpression wurde mittels *empirical Bayes* Statistik durchgeführt. Anschließend wurde eine *flase discovery rate* von <5% als Signifikanzkriterium verwendet [28].

In vitro Methoden: Primäre neonatale Keratinozyten wurden von Lonza (Rockland, USA) bezogen und nach Standardbedingungen kultiviert. Die Generierung von Lentiviren wurde wie bereits beschrieben durchgeführt [8] und Keratinozyten wie beschrieben transduziert [FS2]. Die Generierung des Bmal1:Luc Reporterkonstrukts wurde in [8] beschrieben, für shRNA knock down Experimente wurden Konstrukte der pGIPZ library (Thermo Scientific, Huntsville, USA) verwendet, KLF9 bzw. GFP Überexpressionskonstrukte wurden aus pENTR Vektoren (Thermo Scientific, Huntsville, USA) mittels Gateway[®] Klonierung (Invitrogen, Carlsbad, USA) in den lentiviralen Expressionsvektor pLenti6/V5-DEST überführt.

Echtzeit-Luziferasemessungen und Temperaturentrainment wurden wie beschrieben durchgeführt [FS2]. Proliferationsstudien wurden in Echtzeit (xCELLigence System, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) wie beschrieben [FS3] oder mittels Durchflusszytometrie (CasyCount, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Immunfluoreszenz wurde nach Standardprotokoll mit α KLF9 Antikörper (Sigma, Hamburg, Deutschland) durchgeführt und für qPCR Analysen wurden prä-validierte Primersequenzen (Applied Biosystems, Branchburg, USA) verwendet [FS2].

Zitierte eigene Publikationen, die im Rahmen der Dissertation erstellt wurden

FS1: Sporl F, Korge S, Jürchott K, Wunderskirchner M, Schellenberg K, Heins S, Specht A, Stoll C, Klemz R, Maier B, Wenck H, Schrader A, Kunz D, Blatt T and Kramer A (2012) Klf9 is a circadian

transcription factor in human epidermis that controls proliferation of keratinocytes. Accepted at PNAS May 18th 2012.

FS2: Sporl F, Schellenberg K, Blatt T, Wenck H, Wittern KP, Schrader A and Kramer A (2010) A Circadian Clock in HaCaT Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 131: 338-348.

FS3: Sporl F, Wunderskirchner M, Ullrich O, Bomke G, Breitenbach U, Wenck H, Wittern KP and Schrader A (2009) Real-time monitoring of membrane cholesterol reveals new insights into epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 130: 1268-1278.

Weitere Referenzen

1. Reppert SM, Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418: 935-941.
2. Schibler U (2006) Circadian time keeping: the daily ups and downs of genes, cells, and organisms. *Prog Brain Res* 153: 271-282.
3. Zanello SB, Jackson DM, Holick MF (2000) Expression of the circadian clock genes clock and period1 in human skin. *J Invest Dermatol* 115: 757-760.
4. Tanioka M, Yamada H, Doi M, Bando H, Yamaguchi Y, et al. (2009) Molecular clocks in mouse skin. *J Invest Dermatol* 129: 1225-1231.
5. Denda M, Tsuchiya T (2000) Barrier recovery rate varies time-dependently in human skin. *Br J Dermatol* 142: 881-884.
6. Yosipovitch G, Sackett-Lundeen L, Goon A, Yiong Huak C, Leok Goh C, et al. (2004) Circadian and ultradian (12 h) variations of skin blood flow and barrier function in non-irritated and irritated skin-effect of topical corticosteroids. *J Invest Dermatol* 122: 824-829.
7. Yosipovitch G, Xiong GL, Haus E, Sackett-Lundeen L, Ashkenazi I, et al. (1998) Time-dependent variations of the skin barrier function in humans: transepidermal water loss, stratum corneum hydration, skin surface pH, and skin temperature. *J Invest Dermatol* 110: 20-23.
8. Brown SA, Fleury-Olela F, Nagoshi E, Hauser C, Juge C, et al. (2005) The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol* 3: e338.
9. Kornmann B, Schaad O, Bujard H, Takahashi JS, Schibler U (2007) System-driven and oscillator-dependent circadian transcription in mice with a conditionally active liver clock. *PLoS Biol* 5: e34.
10. Keller M, Mazuch J, Abraham U, Eom GD, Herzog ED, et al. (2009) A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 21407-21412.
11. Fonjallaz P, Ossipow V, Wanner G, Schibler U (1996) The two PAR leucine zipper proteins, TEF and DBP, display similar circadian and tissue-specific expression, but have different target promoter preferences. *Embo J* 15: 351-362.
12. Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, et al. (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* 417: 78-83.
13. Le Martelot G, Claudel T, Gatfield D, Schaad O, Kornmann B, et al. (2009) REV-ERB α participates in circadian SREBP signaling and bile acid homeostasis. *PLoS Biol* 7: e1000181.
14. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, et al. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106: 761-771.
15. Sudel KM, Venzke K, Knussmann-Hartig E, Moll I, Stab F, et al. (2003) Tight control of matrix metalloproteinase-1 activity in human skin. *Photochem Photobiol* 78: 355-360.
16. Morsczech C, Schmalz G, Reichert TE, Vollner F, Saugspier M, et al. (2009) Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Investig* 13: 383-391.
17. Simmen FA, Xiao R, Velarde MC, Nicholson RD, Bowman MT, et al. (2007) Dysregulation of intestinal crypt cell proliferation and villus cell migration in mice lacking Kruppel-like factor 9. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292: G1757-1769.
18. Hildebrand J, Rutze M, Walz N, Gallinat S, Wenck H, et al. (2010) A comprehensive analysis of microRNA expression during human keratinocyte differentiation in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 131: 20-29.
19. Minner F, Herphelin F, Poumay Y (2010) Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Methods Mol Biol* 585: 71-82.
20. Zhang XL, Simmen FA, Michel FJ, Simmen RC (2001) Increased expression of the Zn-finger transcription factor BTEB1 in human endometrial cells is correlated with distinct cell phenotype, gene expression patterns, and proliferative responsiveness to serum and TGF- β 1. *Mol Cell Endocrinol* 181: 81-96.
21. Bonett RM, Hu F, Bagamasbad P, Denver RJ (2009) Stressor and glucocorticoid-dependent induction of the immediate early gene kruppel-like factor 9: implications for neural development and plasticity. *Endocrinology* 150: 1757-1765.

22. Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED, Kobayashi Y, Su H, et al. (2011) Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 466: 627-631.
23. Sahar S, Sassone-Corsi P (2009) Metabolism and cancer: the circadian clock connection. *Nat Rev Cancer* 9: 886-896.
24. Buttgereit F, Doering G, Schaeffler A, Witte S, Sierakowski S, et al. (2010) Targeting pathophysiological rhythms: prednisone chronotherapy shows sustained efficacy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69: 1275-1280.
25. Zavada A, Gordijn MC, Beersma DG, Daan S, Roenneberg T (2005) Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Ostberg's Morningness-Eveningness Score. *Chronobiol Int* 22: 267-278.
26. Gronniger E, Weber B, Heil O, Peters N, Stab F, et al. (2010) Aging and chronic sun exposure cause distinct epigenetic changes in human skin. *PLoS Genet* 6: e1000971.
27. Smyth GK, Speed T (2003) Normalization of cDNA microarray data. *Methods* 31: 265-273.
28. Storey JD, Tibshirani R (2003) Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 9440-9445.

2. Anteilserklärung

Publikation 1: Sporl F, Korge S, Jürchott K, Wunderskirchner M, Schellenberg K, Heins S, Specht A, Stoll C, Klemz R, Maier B, Wenck H, Schrader A, Kunz D, Blatt T and Kramer A (2012) Klf9 is a circadian transcription factor in human epidermis that controls proliferation of keratinocytes. Accepted at PNAS May 18th 2012.

Anteil: 60%

Die Daten in dieser Publikation bilden einen Großteil der von Herrn Spörl erzielten Ergebnisse in der Promotion ab und beschreiben grundlegend das circadiane System in humaner Epidermis. Der maßgebliche Anteil der praktischen Arbeiten (insbesondere Planung, Durchführung und Auswertung der *in vivo* Probandenstudien, Etablierung von Zellkulturmodellen und relevanten Assays, Durchführung circadianer Zeitreihen, Auswertung komplexer Daten) wurde von Herrn Spörl durchgeführt. Konkret war der Beitrag von Herrn Spörl wie folgt:

Fig. 1:

Experimentelles Design, experimentelle Durchführung der Probandenstudie und Datenauswertung (die bioinformatische Auswertung wurde durch Sven Heins (Beiersdorf AG) unterstützt).

Fig. 2:

(A) Design, Durchführung und Auswertung der Studie in Abstimmung mit Prof. Achim Kramer und Dr. Dieter Kunz (Charité). (B-C) Experimentelles Design, Durchführung der *in vitro* Zeitreihe, qPCR Messungen, Datenanalyse.

Fig. 3:

Design, Durchführung und Auswertung der Experimente (histologische Immunfärbungen, qPCR Analysen)

Fig. 4:

Design, Durchführung und Auswertung der Experimente (Proliferations-Assays, Herstellung lentiviraler Konstrukte)

Fig. S1:

(A-I) Experimentelles Design, Datenerhebung, Auswertung (Blutzuckermessungen, Salivamessungen, Aufstellung von Korrelationen)

Fig. S2:

Beitrag zur Strategie der Datenanalyse und Darstellung. Bioinformatische Analysen wurden von Karsten Jürchott (Charité) durchgeführt.

Fig. S3:

Beitrag zur Strategie der Datenanalyse und Darstellung. Bioinformatische Analysen wurden von Karsten Jürchott (Charité) durchgeführt. qPCR Messungen und Auswertungen wurden von Herrn Spörl durchgeführt (D-F).

Fig. S4:

Statistische Auswertung der qPCR Daten.

Fig. S5:

(B-C) Konzeption, experimentelle Durchführung und Auswertung der *in vitro* Zeitreihe.

Fig. S6:

Design, Durchführung und Auswertung der Experimente (Differenzierungszeitreihe mit primären Keratinozyten, Cortisolbehandlung von Keratinozyten, qPCR Analysen)

Fig. S7:

(A-C) Design, Durchführung und Auswertung der Experimente (Design eines Klf9 Überexpressions-Vektors, Überexpression von Klf9 in primären Keratinozyten, qPCR Analysen, Western Blot Analysen, Immunfluoreszenzfärbungen).

Ebenso war Herr Spörl maßgeblich an der Konzeption experimenteller Abläufe und Auswertestrategien beteiligt. Zudem war Herr Spörl federführend bei der Formulierung und Erstellung des Manuskripts. Aus diesem Grund ist Herr Spörl als alleiniger Erstautor in dieser Publikation gelistet.

Publikation 2: [Spörl F](#), Schellenberg K, Blatt T, Wenck H, Wittern KP, Schrader A and Kramer A (2010) A Circadian Clock in HaCaT Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 131: 338-348.

Anteil: 60%

In dieser Publikation wurde die Keratinozytenzelllinie HaCaT als Modellsystem zur Analyse circadianer Genexpression in Keratinozyten charakterisiert. Der Hauptanteil experimenteller und konzeptioneller Arbeiten in dieser Publikation (insbesondere die Etablierung eines Synchronisationsprotokolls für HaCaT Zellen, Zeitreihen-Analysen und Biolumineszenz-Messungen) wurde von Herrn Spörl durchgeführt. Die Generierung einer stabilen HaCaT Reporterzelllinie wurde hierbei in Kooperation mit Katja Schellenberg (Charité Berlin) durchgeführt. Herr Spörl war zudem maßgeblich an der Erstellung des Manuskripts beteiligt. Herr Spörl ist daher als Erstautor (geteilte Erstautorenschaft mit Katja Schellenberg) in dieser Publikation gelistet.

Konkret war der Beitrag von Herrn Spörl wie folgt:

Fig. 1:

Design, Durchführung und Auswertung aller Experimente (Immunfluoreszenzfärbungen, mRNA Zeitreihen, qPCR Analysen, Biolumineszenz-Messungen). Die Herstellung der HaCaT Reporterzelllinie wurde primär von Katja Schellenberg (Charité) durchgeführt.

Fig. 2:

Validierung der *Bmal1* knock-down Reporterzelllinie und Biolumineszenz-Messungen in Fig. 2e.

Fig. 3:

Design, Durchführung und Auswertung der Biolumineszenz-Messungen.

Fig. 4:

Durchführung und Auswertung aller qPCR Messungen.

Fig. 5:

Design, Durchführung und Auswertung des Zeitreihenexperiments und entsprechender qPCR Messungen.

Publikation 3: Spörl F, Wunderskirchner M, Ullrich O, Bomke G, Breitenbach U, Wenck H, Wittern KP and Schrader A (2009) Real-time monitoring of membrane cholesterol reveals new insights into epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 130: 1268-1278.

Anteil: 70%

Gegenstand dieser Publikation ist die Etablierung einer neuen Methode zur Real-Time Analyse von Membranmodulation und Proliferation in primären humanen Keratinozyten. Die Etablierung und Validierung der Methode wurde von Herrn Spörl durchgeführt. Unterstützende experimentelle Arbeiten wurden von Minetta Wunderskirchner (Beiersdorf AG) beigesteuert. Herr Spörl war für die Erstellung des Manuskripts verantwortlich. Die Arbeiten zu dieser Publikation wurden im Rahmen der Promotion abgeschlossen und publiziert. Allerdings wurden die experimentellen Arbeiten ausschließlich bei der Beiersdorf AG durchgeführt und die Herkunft aus der medizinischen Fakultät der Charité ist daher für Herrn Spörl in dieser Publikation nicht vermerkt. Die entwickelte Methode wurde von Herrn Spörl in vielfältiger Weise während dem weiteren Verlauf seiner Promotion eingesetzt u.a. auch dokumentiert in Spörl et al. 2012. Die Etablierung und Publikation dieser Methode kann daher als ein Meilenstein in dem Promotionsvorhaben angesehen werden.

Konkret war der Beitrag von Herrn Spörl wie folgt:

Fig. 1:

Konzeption, Durchführung und Auswertung der Real-Time-Cell-Analysis (RTCA) Messung.

Fig. 2:

Konzeption aller Experimente. Durchführung und Auswertung der RTCA Messungen. FRAP Messungen wurden von Minetta Wunderskirchner (Beiersdorf AG) durchgeführt.

Fig. 3:

Experimentelles Design und Durchführung der Filipin-Färbung.

Fig. 4:

Experimentelles Design, Durchführung und Auswertung der Dünnschichtchromatographie.

Fig. 5:

Experimentelles Design, Durchführung und Auswertung der RTCA Messungen (a, b), ATP Messungen (c) und qPCR Analysen (d).

Fig. 6:

Experimentelles Design und Durchführung der RTCA Messung (a). Die Immunfluoreszenzanalysen in (b) wurden von Gerrit Bömke (Beiersdorf AG) durchgeführt.

Fig. 7:

Experimentelles Design, Durchführung und Auswertung der RTCA Messungen (a, b), ATP Messungen (c) und qPCR Analysen (d).

Berlin, den 01.08.12

Florian Spörl

3. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Siehe Literaturverzeichnis

4. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

5. Publikationsliste

Posterpräsentationen

Sporl F, Kramer A, Blatt T, Wenck H and Schrader A (2010)

HaCaT Keratinocytes as a Model System to Study Circadian Rhythms in Skin.
Gordon Research Conference on Pineal Cell Biology, Galveston, TX, USA.

Paper

Sporl F, Korge S, Jürchott K, Wunderskirchner M, Schellenberg K, Heins S, Specht A, Stoll C, Klemz R, Maier B, Wenck H, Schrader A, Kunz D, Blatt T and Kramer A (2012) Klf9 is a circadian transcription factor in human epidermis that controls proliferation of keratinocytes. Accepted at PNAS May 18th 2012.
Impact factor: 9,7

Sporl F, Schellenberg K, Blatt T, Wenck H, Wittern KP, Schrader A and Kramer A (2010) A Circadian Clock in HaCaT Keratinocytes. J Invest Dermatol 131: 338-348.
Impact factor: 6,3

Sporl F, Wunderskirchner M, Ullrich O, Bomke G, Breitenbach U, Wenck H, Wittern KP and Schrader A (2009) Real-time monitoring of membrane cholesterol reveals new insights into epidermal differentiation. J Invest Dermatol 130: 1268-1278.
Impact factor: 6,3

Berlin, den 17.12.12

Florian Spörl

6. Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Promotion eigenständig durchgeführt habe und alle Quellen und Hilfsmittel angegeben habe.

Berlin, den 17.12.12

Florian Spörl

7. Danksagung

In diesen Zeilen möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Zunächst möchte ich Prof. Achim Kramer für die hervorragende akademische Betreuung danken. Ich danke dem Labor Chronobiologie für die fachliche Unterstützung und schöne Arbeitsatmosphäre. Der Beiersdorf AG danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit durchführen zu können und dem Labor Trockene Altershaut für die schöne Zeit. Insbesondere danke ich Dr. Annika Schrader für die hervorragende Betreuung von Industrieseite. Minetta Wunderskirchner und Janosch Hildebrand gebühren besonderer Dank für fachliche Diskussionen und wertvolle Freundschaft.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, meiner wundervollen Frau Rebecca Spörl und meinem Sohn George Spörl, die mir die Kraft für das Gelingen dieser Arbeit gegeben haben.