

# **Rolle des Signalgebers MyD88 bei der UV- induzierten Aktivierung des Immunsystems**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

*vorgelegt von*

**Benjamin Schadow**

aus Kiel

Bonn, September 2014

Aus dem Life and Medical Sciences Institut  
an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Heike Weighardt
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Sven Burgdorf

Tag der Promotion: 8.12.2014  
Erscheinungsjahr: 2015



**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe, dass ich sie zuvor an keiner anderen Hochschule und in keinem anderen Studiengang als Prüfungsleistung eingereicht habe und dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen oder aus anderweitigen fremden Äußerungen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Benjamin Schadow

Bonn, den 23. September 2014

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Die angeborene Immunabwehr.....	1
1.1.1 Grundlegende Mechanismen.....	1
1.1.2 Toll-like Rezeptoren und das Signaltransduktionsmolekül MyD88 .....	5
1.2 Die Haut als Barriere- und Immunorgan.....	9
1.2.1 Epidermis.....	10
1.2.2 Dermis.....	13
1.3 UV-Strahlung.....	15
1.3.1 Physikalische Grundlagen .....	15
1.3.2 Entzündliche Reaktionen der Haut als Antwort auf UV-Strahlung.....	18
1.3.3 UV-induzierte DNS-Schäden.....	19
<b>2 GRUNDLEGENDE FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT</b> .....	<b>23</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>24</b>
3.1 Material.....	24
3.1.1 Technische Ausstattung.....	24
3.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	25
3.1.3 Reagenzien.....	26
3.1.4 Puffer und Lösungen .....	28
3.1.5 Zellkulturmedien .....	30
3.1.6 Antikörper .....	30
3.1.7 ELISA-Kits.....	31
3.1.8 Primersequenzen für q-PCR.....	32
3.1.9 Versuchstiere.....	33
3.1.10 Software .....	34
3.2 Methoden.....	35
3.2.1 Primärzellkultur .....	35
3.2.1.1 Generierung von ex vivo dendritischen Zellen .....	35
3.2.1.2 Generierung von ex vivo Keratinozyten.....	36
3.2.2 Histologische Verfahren und Färbungen .....	36
3.2.3 q-PCR.....	39

3.2.4	ELISA .....	40
3.2.5	Durchflusszytometrie.....	42
3.2.6	Western blot.....	43
3.2.7	Southwestern blot.....	44
3.2.8	Bestimmung der Myeloperoxidase Aktivität.....	46
3.2.9	Melaninbestimmung.....	46
3.2.10	Genotypisierung der Mauslinien .....	47
3.2.11	UVB-Bestrahlung .....	48
3.2.12	Statistische Auswertung.....	49
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
4.1	Funktion von MyD88 bei der akuten UVB-induzierten Entzündungsreaktion.....	50
4.1.1	Expression von Zytokinen in bestrahlter Rückenhaul.....	50
4.1.2	Lokale Entzündungsreaktionen in bestrahlter Rückenhaul.....	55
4.1.2.1	Einwanderung myeloider Zellen in die Haut.....	56
4.1.2.2	Aktivierung von Mastzellen.....	58
4.2	Spezifische Rolle von MyD88 in Keratinozyten.....	60
4.2.1	MyD88-Expression in K5 <sup>ind</sup> MyD88-Mäusen.....	60
4.2.2	Epidermale Akanthose nach UVB-Bestrahlung.....	61
4.2.3	UVB-induzierte Expression von Zytokeratinen.....	63
4.2.4	Expression proinflammatorischer Zytokine nach UVB-Bestrahlung (in vitro) .....	67
4.3	Funktion von dendritischen Zellen nach UVB-Bestrahlung.....	71
4.3.1	Auswanderung von dendritischen Zellen in die brachialen Lymphknoten.....	71
4.3.2	Aktivierung von ex vivo generierten dendritischen Zellen.....	75
4.4	Systemische Entzündungsreaktion nach UVB-Bestrahlung.....	77
4.4.1	Neutrophile und Monozyten im Blut.....	77
4.4.2	Neutrophileninfiltration in die Lunge .....	79
4.5	UVB-induzierte DNS-Schäden und Apoptose.....	82
4.5.1	Apoptoserate in bestrahlter muriner Rückenhaul.....	83
4.5.2	Cyclobutanpyrimidin-Dimere.....	85
4.5.3	Einfluss von Melanin auf die Entstehung von DNS-Schäden.....	88
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
5.1	Rolle des Signalgebers MyD88 bei der UVB-induzierten lokalen Entzündungsreaktion.....	91

5.1.1	Zytokinproduktion in bestrahlter Maushaut .....	91
5.1.2	Infiltration von Entzündungszellen.....	92
5.1.3	Aktivierung von Keratinozyten.....	94
5.2	Systemischer Einfluss der Signaltransduktion von MyD88 nach UVB-Bestrahlung.....	95
5.3	MyD88-Signaltransduktion als Schutz vor DNS-Schäden.....	99
5.3.1	Induktion von DNS-Schäden durch UVB-Bestrahlung.....	99
5.3.2	Einfluss von Melanin auf die Induktion von DNS-Schäden.....	102
5.4	Medizinische Relevanz und Ausblick .....	104
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>107</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>108</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>127</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1–1:	Auswahl verschiedener Komponenten des angeborenen Immunsystems.....	3
Abbildung 1–2:	Übersicht der verschiedenen Signaltransduktionswege bei TLR .....	9
Abbildung 1–3:	Aufbau und zelluläre Komponenten der murinen Haut.....	10
Abbildung 1–4:	Schematischer Vergleich der Transmission von UV-Strahlung in menschlicher Haut sowie Maushaut.....	16
Abbildung 1–5:	Ausbildung UVB-induzierter DNS-Schäden .....	20
Abbildung 3–1:	Cre-induzierte Reexpression von MyD88.....	34
Abbildung 4–1:	Expression proinflammatorischer Entzündungsmediatoren in muriner Rückenhaul nach UVB-Bestrahlung.....	52
Abbildung 4–2:	Expression von Zytokinen der IL-10 Familie in muriner Rückenhaul nach UVB-Bestrahlung.....	54
Abbildung 4–3:	Proteinexpression von CCL17 und TSLP in muriner Rückenhaul nach UVB-Bestrahlung.....	55
Abbildung 4–4:	Infiltration von CD11b <sup>++</sup> myeloiden Zellen in die Haut nach UVB-Bestrahlung.....	57
Abbildung 4–5:	Infiltration von Mastzellen in die Haut nach UVB-Bestrahlung .....	59
Abbildung 4–6:	Expression von MyD88 in Keratinozyten im Western blot	61
Abbildung 4–7:	Epidermisdicke nach UVB-Bestrahlung.....	62
Abbildung 4–8:	RNS-Expression von Zytokeratinen in muriner Rückenhaul nach UVB-Bestrahlung .....	64
Abbildung 4–9:	Proteinexpression von K6 in muriner Rückenhaul nach UVB-Bestrahlung.....	66
Abbildung 4–10:	Morphologie von ex vivo generierten Keratinozyten vor und nach UVB-Bestrahlung .....	67
Abbildung 4–11:	RNS-Expression verschiedener Mediatoren in ex vivo generierten Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung.....	69
Abbildung 4–12:	Proteinexpression von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren in ex vivo generierten Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung.....	70
Abbildung 4–13:	Migration von DZ der Haut in die brachialen Lymphknoten nach UVB-Bestrahlung .....	74
Abbildung 4–14:	RNS-Expression proinflammatorischer Zytokine in ex vivo generierten knochenmarksabgeleiteten DZ nach UVB-Bestrahlung .....	76
Abbildung 4–15:	Anzahl der Neutrophilen im Blut UVB-bestrahlter Mäuse.	78
Abbildung 4–16:	Anzahl der inflammatorischen Monozyten im Blut UVB-bestrahlter Mäuse .....	79

Abbildung 4–17: Immigration von Neutrophilen in die Lunge UVB- bestrahlter Mäuse .....	81
Abbildung 4–18: Bestimmung der Apoptoserate in der Epidermis nach UVB- Bestrahlung .....	84
Abbildung 4–19: Formation und Reparatur von CPD in der Rückenhaut von Mäusen nach UVB-Bestrahlung .....	86
Abbildung 4–20: Expression verschiedener Komponenten der NER nach UVB-Bestrahlung mittels q-PCR.....	87
Abbildung 4–21: Kolorimetrische Bestimmung des Melaningehalts in Mausohren.....	89
Abbildung 4–22: Genexpression der Tyrosinase nach UVB-Bestrahlung.....	90

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1–1: Auswahl verschiedener TLR und ihre Liganden.....	6
Tabelle 3–1: Antikörper für Histologie und Durchflusszytometrie.....	30
Tabelle 3–2: Antikörper für Western und Southwestern blot .....	31
Tabelle 3–3: Primersequenzen für die q-PCR .....	32
Tabelle 3–4: 1 x Ansatz für die cDNS Synthese .....	40
Tabelle 3–5: 1 x Ansatz für die Typisierungs-PCR.....	47
Tabelle 3–6: Primersequenzen für die Genotypisierung.....	48
Tabelle 3–7: PCR-Programme für die Genotypisierung.....	48

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AP-1	<i>Activating protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
cDNS	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CAR	<i>CXCL12-abundant reticular cells</i>
CASP	<i>Colon ascendens stent peritonitis</i>
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>
CCR	<i>Chemokine (C-C motif) receptor</i>
CLR	C-Typ Lektin-Rezeptoren
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimere
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
CXCR	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor</i>
DAMP	<i>Danger-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERCC	<i>Excision repair cross-complementing</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HE	Hämatoxylin/Eosin
HMGB1	<i>High-mobility-group-protein B1</i>
HSP	Hitzeschockprotein
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>IkappaB kinase</i>
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IRAK	<i>IL-1R-associated kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
K5Cre	Keratin 5-Cre
KC	<i>Keratinocyte-derived chemokine</i>
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LysMCre	Lysozym M-Cre
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>



---

## Abkürzungsverzeichnis

---

MHCII	Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II, <i>major histocompatibility complex class II</i>
MIP-2	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
MPO	Myeloperoxidase
Mrp	<i>Myeloid-related protein</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
MyD88LSL	MyD88lox-stop-lox
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-kappaB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NLR	NOD-like Rezeptoren
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PRR	Mustererkennungszepptoren, <i>pattern recognition receptors</i>
q-PCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, <i>real-time polymerase chain reaction</i>
RIG	<i>Retinoic acid inducible gene</i>
RIP1	<i>Receptor-interacting protein 1</i>
RLR	RIG-I-like Rezeptoren
RNS	Ribonukleinsäure
RPA	<i>Replication protein A</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor beta activated kinase-1</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain-containing adaptor protein</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-beta</i>
TRP	<i>Tyrosinase related protein</i>
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoietin</i>
TUNEL	<i>Terminale desoxynukleotidyltransferase mediated dUTP nick end label</i>
UV	Ultraviolett
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule</i>
WT	Wildtyp
XP	<i>Xeroderma pigmentosum complementation group</i>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Die angeborene Immunabwehr

Das Immunsystem stellt ein komplexes System im Körper des Menschen dar mit der Funktion ihn vor einer Vielzahl von Agenzien zu schützen. Neben verschiedenen Umweltgiften gelten insbesondere Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten als Bedrohungen, die es zu bekämpfen gilt, um Infektionen zu verhindern. Hierfür stehen in höher entwickelten Vertebraten zwei funktionell unterschiedliche jedoch miteinander verknüpfte interagierende Systeme zur Verfügung: Die angeborene und die erworbene Immunität. Während die meisten Noxen und Pathogene schon durch das angeborene Immunsystem als erste Abwehr zwar relativ unspezifisch aber wirksam bekämpft werden können, agiert das erworbene Immunsystem, insbesondere basierend auf dem immensen Repertoire an Antigenrezeptoren auf Lymphozyten, hochspezifisch. Demnach arbeitet die erworbene Immunität wesentlich wirkungsvoller als das angeborene Immunsystem, bedarf aber meist einiger Tage der Aktivierung (1).

#### 1.1.1 Grundlegende Mechanismen

##### Zellen des angeborenen Immunsystems

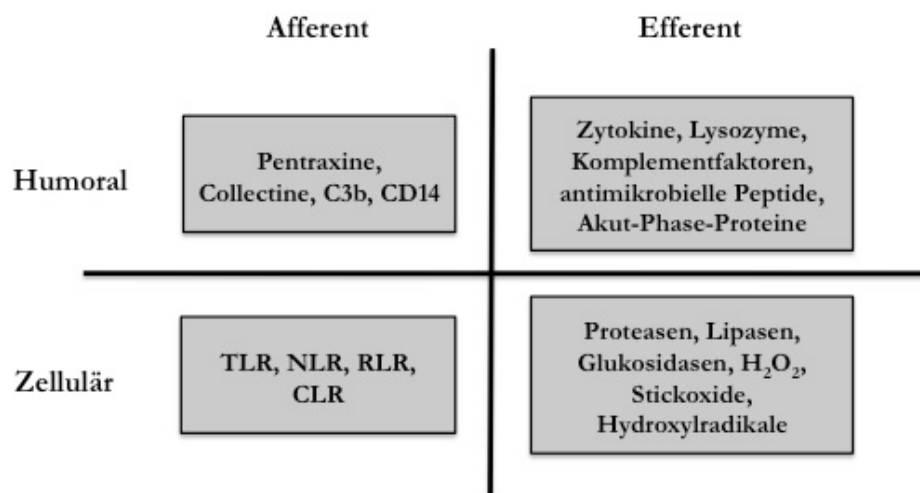
Die Zellen des unspezifischen Teils des Immunsystems sind myeloiden Ursprungs und stellen durch ihre vorwiegend phagozytotische Funktion den wichtigsten Bestandteil der angeborenen Immunität dar. Myeloide Zellen lassen sich anhand der morphologischen Erscheinung des Zellkerns grundlegend in mono- und polymorphnukleare Phagozyten gliedern. Während die polymorphnuclearen Granulozyten, zu denen Neutrophile, Basophile und Eosinophile gezählt werden, eine relativ homogene Population darstellen, bilden die von Monozyten abgeleiteten mononuclearen Phagozyten eine in Form und Funktion stark heterogene Gruppe. Bezüglich der Granulozyten besitzen insbesondere die mit einer Vielzahl antimikrobieller Abwehrsysteme ausgestatteten Neutrophilen eine Schlüsselrolle in der Eingrenzung von Infektionen, indem sie lokal eine Entzündungsreaktion einleiten, Pathogene phagozytieren und somit die Invasion des Erregers in erster Instanz verhindern (1, 2).

Betrachtet man hingegen die monozytäre Entwicklungsreihe, so kann eine Unterscheidung in Makrophagen und dendritische Zellen getroffen werden. Makrophagen lassen sich sowohl morphologisch je nach Organständigkeit als

auch phänotypisch in verschiedene Subklassen kategorisieren. Funktionell sind Makrophagen fähig Pathogene per Phagozytose aufzunehmen und intrazellulär zu prozessieren sowie tote Zellen zu eliminieren. Gleichzeitig sind sie in der Lage durch Sekretion verschiedenster chemotaktisch aktiver Zytokine andere myeloide Zellen zum Ort der Infektion zu leiten (3). Neuere Untersuchungen von XUE et al. (4) haben ergeben, dass die klassische bipolare und funktionelle Einteilung in proinflammatorische M1 und antiinflammatorische M2 Makrophagen (5) zwar immer noch gültig ist, jedoch um eine umfassendere Klassifikation verschiedenster Aktivierungszustände erweitert werden muss (6).

Die sich von Monozyten ableitenden dendritischen Zellen (DZ) weisen ebenfalls bezüglich Lokalisation im Organismus, migratorischen Eigenschaften und der detaillierten immunologischen Funktion ein vielfältiges Spektrum auf (7). Ähnlich den Makrophagen können aktivierte geweberesidente DZ nach Kontakt mit Erregern diesen prozessieren und durch Sekretion von Mediatoren eine lokale Entzündungsreaktion hervorrufen. Des Weiteren bilden neben Makrophagen insbesondere DZ die Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. So können sie nach Pathogenaufnahme in die drainierenden Lymphknoten migrieren, um dort naiven T-Zellen über Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II (*major histocompatibility complex class II*, MHCII) Moleküle Antigene des Erregers zu präsentieren und eine spezifische Immunantwort zu initiieren (8).

Das angeborene Immunsystem besteht nicht nur aus Zellen, sondern beinhaltet vielmehr ein Interagieren verschiedenster zellulärer und humoraler Faktoren. Aus diesem Grund kann die von BRUCE BEUTLER in Abbildung 1–1 dargestellte Einteilung in einen afferenten und einen efferenten Arm vorgenommen werden.



**Abbildung 1–1: Auswahl verschiedener Komponenten des angeborenen Immunsystems**

Das angeborene Immunsystem lässt sich in einen afferenten (sensorischen) und einen efferenten (reaktiven) Arm gliedern, welche jeweils humorale und zelluläre Komponenten besitzen. Modifiziert nach (1) und (9).

**Erkennung von Gefahren: PRR**

Eine herausragende Rolle bei der Erkennung von Erregern besitzen die sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR), die dem afferenten Teil des angeborenen Immunsystems zugehörig sind. Sie können sowohl invariante Strukturen auf Pathogenen, die als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) bezeichnet werden, als auch endogene Gefahrensignale, so genannte *danger-associated molecular patterns* (DAMP) erkennen (10). Somit besteht aus Gründen der relativ geringen Vielfältigkeit an Rezeptoren nicht etwa die Strategie jedes mögliche Antigen eines Erregers zu erkennen, sondern sich vielmehr auf charakteristische hochkonservierte Strukturen repräsentativ für eine große Gruppe von Pathogenen zu konzentrieren (11).

Grundsätzlich lassen sich die PRR in sekretierte, transmembranlokalisierte und zytosolische Sensoren kategorisieren. Die sekretierten (humoralen) PRR sind vorwiegend dazu befähigt nach Bindung spezifischer mikrobieller Strukturen den klassischen oder den Lektin-Weg des Komplementsystems zu aktivieren sowie eine Opsonierung von Erregern für Makrophagen und Neutrophile zu gewährleisten (2). Eine bedeutende Funktion in der Erkennung von Pathogenen und Gefahrensignalen besitzen die transmembranlokalisierten *toll-like* Rezeptoren (TLR). Auf Grund ihrer exponierten Bedeutung für das Immunsystem und die Gefahrenabwehr im Organismus sowie für die vorliegende Arbeit

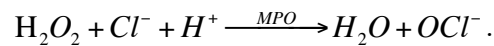
werden sie gesondert in Abschnitt 1.1.2 besprochen. Jedoch sind TLR nicht die einzigen zellulären Sensoren für die Erkennung von invasiven Pathogenen. So kann zum Beispiel das der Gruppe der C-Typ Lektin-Rezeptoren (CLR) zuzuordnende membranständige Dectin 1 vorwiegend auf Pilzen vorkommende  $\beta$ -Glucane erkennen und eine Immunreaktion einleiten (12).

Bezüglich der intrazellulären zytosolischen Rezeptoren wird zwischen *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I)-like Rezeptoren (RLR) und den *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-like Rezeptoren (NLR) unterschieden. Zur Gruppe der RLR gehören das namensgebende RIG-I, *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). Sie sind in der Lage, doppelsträngige virale Ribonukleinsäure (RNS) zu detektieren und eine antivirale Immunreaktion über die Expression von Typ I Interferonen (IFN) und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-kappaB) einzuleiten (13, 14). Die große Gruppe der zytosolischen NLR detektiert, im Gegensatz zu den RLR, verschiedenste bakterielle Komponenten, kann aber auch auf andere mikrobielle Stimuli sowie chemische Verbindungen und endogene Gefahrensignale (z.B. Silica, Harnsäure, Hitzeschockproteine) reagieren (15). So können die zwei bekanntesten Vertreter NOD1 und NOD2 Peptidoglycanstrukturen der bakteriellen Zellwand erkennen und in der gebundenen Form in erster Linie den Transkriptionsfaktor NF-kappaB aktivieren sowie daraus resultierend die Expression verschiedener Zytokine induzieren (16). Drei der über 20 bekannten NLR Proteine (NLRP1, NLRP3 und NLRC4) sind zudem in der Lage so genannte Inflammasome zu bilden. Diese Multiproteinkomplexe können die Caspase 1 proteolytisch aktivieren, welche die Proformen der proinflammatorischen Interleukin-1 Familie in ihre aktivierte Form überführt (17).

### **Bekämpfung von Pathogenen**

Das angeborene Immunsystem ist mit einer Vielzahl humoraler und zellulärer Mechanismen ausgestattet, um Pathogene aber auch mutierte oder apoptotische Zellen schnellstmöglich unschädlich zu machen und zu eliminieren. Als Vermittler zwischen afferentem und efferentem Arm fungieren hauptsächlich die über PRR-Signalwege induzierten und exprimierten Zytokine. Sie haben im Wesentlichen die Funktion, auf andere immunkompetente Zellen zu wirken, um die Immunreaktion zu koordinieren und professionelle Phagozyten zum Ort der Pathogeninvasion zu leiten. Sind die professionellen Phagozyten - na-

mentlich Neutrophile und Makrophagen - am Ort der Pathogeninvasion angekommen, können die Fremdsubstanzen aufgenommen werden und innerhalb der Zelle vorwiegend durch die Bildung hochreaktiver mikrobizider Moleküle inaktiviert und verdaut werden. Ein bedeutendes Enzym in dieser Maschinerie ist die Myeloperoxidase (MPO), welche nachfolgende Reaktion katalysiert:



Das entstehende Hypochlorid (OCl<sup>-</sup>) besitzt zum einen selbst eine bakterizide Wirkung, kann zudem aber auch die Bildung weiterer hochreaktiver und für Pathogene tödliche Metabolite wie zum Beispiel Singulett-Sauerstoff (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) oder Hydroxylradikale (OH•) induzieren.

Des Weiteren existieren auch humorale Faktoren, die die Lyse von Pathogenen induzieren können. So ist das aus Plasmaproteinen bestehende Komplementsystem unter anderem in der Lage, spezielle Membranangriffskomplexe zu bilden. Durch einen transmembranen Kanal kann die selektive Permeabilität der Erregerzelle nicht mehr aufrecht gehalten werden, so dass Wasser ungehindert einströmen kann und die Zelle platzt. Weitere zu den humoralen Effektoren des angeborenen Immunsystems zählende Moleküle sind Lysozyme, Lactoferrin und antimikrobielle Peptide. Ihre Wirkung beruht hauptsächlich auf einem Angriff der bakteriellen Zellwand und im Falle von Lactoferrin zusätzlich auf einem Entzug des für das Bakterienwachstum essentiellen Nährstoffs Eisen (1).

### 1.1.2 Toll-like Rezeptoren und das Signaltransduktionsmolekül MyD88

**TLR und Liganden** Seit der Entdeckung der *toll*-Rezeptoren in *Drosophila melanogaster* und dem wenig später erfolgten Nachweis *toll*-ähnlicher Strukturen in Säugern, die sogenannten *toll-like* Rezeptoren (14), sind bis dato in Maus und Mensch 12 respektive 10 funktionelle TLR identifiziert worden (16). Die verschiedenen TLR erkennen unterschiedliche charakteristische PAMP auf Bakterien, Pilzen und Parasiten sowie Nukleinsäuren (18). Zudem können sie auch durch DAMP, wie Hitzeschockproteine (HSP), das *high-mobility-group-protein B1* (HMGB1) oder modifizierte Lipoproteine niedriger Dichte (*low density lipoprotein*) aktiviert werden. Diese meistens intrazellulär vorliegenden Strukturen können durch Apoptose oder Zellschaden, hervorgerufen durch etwaige Umwelteinflüsse wie Ul-

triviolette (UV)-Strahlung, in den Extrazellularraum sezerniert werden und so als TLR-Liganden in direkter Nachbarschaft befindliche Zellen aktivieren (19). Die sowohl im Menschen als auch in der Maus am besten charakterisierten TLR sind TLR1-7 und TLR9 (18). Lediglich TLR8 ist - im Gegensatz zum humanen System - bedingt durch das Fehlen von 5 Aminosäuren in der Maus nicht funktionell (20). Alle TLR sind Typ 1 Transmembranproteine und weisen eine Leucin-reiche Ektodomäne auf, die direkt an der Ligandenbindung beteiligt ist. Zudem besitzen sie eine zytoplasmatische *toll*/Interleukin-1 Rezeptor (TIR)-Domäne, welche mit TIR-Domänen verschiedener im Zytosol befindlicher Adaptorproteine interagieren kann (21). Je nach zellulärer Lokalisation und Affinität von Liganden lassen sich die TLR in zwei Gruppen einteilen: Die zellmembranständigen, welche hauptsächlich auf mikrobielle Membrankomponenten spezialisiert sind, und die ausschließlich in intrazellulären Vesikeln wie dem endoplasmatischen Retikulum, Endosomen oder Lysosomen vorkommenden TLR, die bakterielle und virale Nukleinsäuren erkennen (16). Eine Zusammenstellung der verschiedenen bekannten murinen TLR, ihrer Liganden sowie der Lokalisation in der Zelle findet sich in Tabelle 1–1.

**Tabelle 1–1:** Auswahl verschiedener TLR und ihre Liganden

TLR	Lokalisation	Liganden	
		PAMP (14, 21)	DAMP (9, 19)
TLR1 - TLR2	Zellmembran	Triacylierte Lipoproteine	TLR2 DAMP unter TLR2-TLR6 gelistet
TLR2 - TLR6	Zellmembran	Diacylierte Lipoproteine	Hitzeschockproteine (HSP 60, 70, gp96), Hyaluronsäurefragmente, HMGB1
TLR3	Endosomen	doppelsträngige RNS	
TLR4	Zellmembran	Lipopolysaccharide (LPS)	Hitzeschockproteine (HSP 22, 60, 70, gp96), Hyaluronsäurefragmente, HMGB1, Fibronektin
TLR5	Zellmembran	Flagellin	
TLR7	Endosomen	einzelsträngige RNS	zelleigene DNS/RNS
TLR9	Endosomen	Cytosin-phosphatidyl- Guanin (CpG) DNS	zelleigene DNS/RNS

**Signaltransduktion** Nicht nur alle TLR mit Ausnahme von TLR3 sondern auch der Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) und der IL-18R nutzen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB sowie von *interferon regulatory factor* (IRF) das zentrale Adaptormolekül *myeloid differentiation factor 88* (MyD88). Lediglich bei TLR3 und 4 ist ein MyD88-unabhängiger Signalweg nachgewiesen worden, der über den Adaptor *TIR-domain-containing adaptor-inducing interferon-beta* (TRIF) vermittelt wird. Zudem existieren zwei weitere Adaptormoleküle, die für die Signaltransduktion einiger TLR essentiell sind. *TIR-domain-containing adaptor protein* (TIRAP) ist neben MyD88 für die Signaltransduktion von TLR2 und TLR4 notwendig, wohingegen *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) mit der TRIF-abhängigen Signaltransduktion von TLR4 assoziiert ist. Während MyD88-abhängige Signalwege die Expression von zumeist proinflammatorischen Zytokinen induzieren, wird über TRIF die Typ I IFN Produktion aktiviert (16, 22).

Das Signaltransduktionsmolekül MyD88 liegt im Zytosol der Zelle vor und besteht aus einer TIR-Domäne am COOH-Terminus und einer Todesdomäne (*death domain*) am Amino-Terminus. Die TIR-Domäne von MyD88 kann nach Aktivierung durch TLR-Liganden oder IL-1/IL-18 an die TIR-Domäne der Rezeptoren binden, während die Todesdomäne von MyD88 mit den Todesdomänen der Serin-Threonin Kinasen der IRAK (*IL-1R-associated kinase*)-Familie interagiert (23, 24).

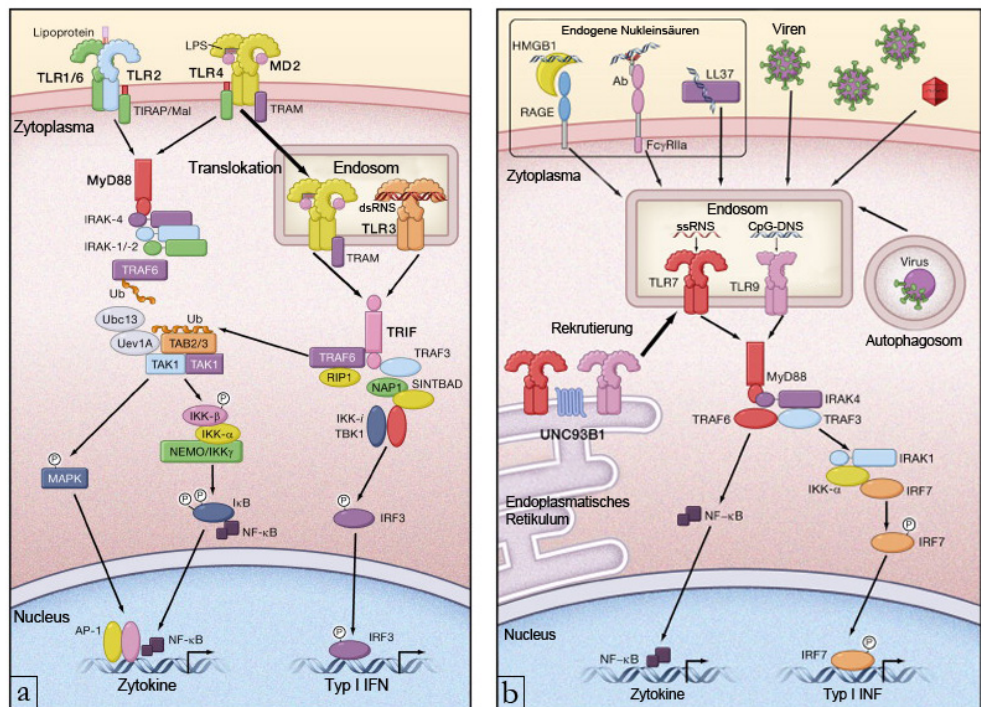
Alle TLR dimerisieren bei Ligandenbindung zu Homodimeren bzw. im Falle von TLR2 zu Heterodimeren mit TLR1 oder TLR6. Beim MyD88-abhängigen Signalweg wird nach Rekrutierung von MyD88 und des für die Signaltransduktion der TLR2-Heterodimere und des TLR4 notwendigen Adaptors TIRAP ein Komplex von IRAK4, IRAK1/2 und *tumor necrosis factor* (TNF) *receptor-associated factor* (TRAF) 6 gebildet. Die Phosphorylierung der Serin-Threonin Kinase IRAK1 durch IRAK4 hat eine Aktivierung von TRAF6 zur Folge. TRAF6 bildet im Anschluss einen Komplex mit dem Ubiquitinligase-Komplex bestehend aus Ubc13 und Uev1A. Durch Ubiquitylierung des aus verschiedenen Untereinheiten bestehenden *transforming growth factor beta activated kinase-1* (TAK1)-Komplexes wird der *ikappaB kinase* (IKK)-Komplex aktiviert. Dieser kann durch Phosphorylierung und Degradierung von IkappaB den Transkriptionsfaktor NF-kappaB in seine ungebundene und aktive Form überführen, so dass



NF-kappaB in den Zellkern translozieren kann und die Expression verschiedener Zytokine induziert. Gleichzeitig kann über eine TAK1 induzierte Phosphorylierung die *mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Kaskade aktiviert werden, welche über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors *activating protein-1* (AP-1) ebenfalls zu einer verstärkten Zytokinexpression führt (9).

TLR3 sowie TLR4 können zudem durch einen MyD88-unabhängigen Signalweg die Expression verschiedener Gene induzieren. Während TLR3 in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist, kann TLR4 nach Ligandenbindung und Rekrutierung des Adaptors TRAM in Endosome translozieren. Nach Bindung des Adaptors TRIF kann via TRAF6 und *receptor-interacting protein 1* (RIP1) NF-kappaB aktiviert werden. Zudem wird über TBK1/IKK- $\epsilon$ , initial aktiviert durch TRAF3, IRF3 phosphoryliert und aktiviert. IRF3 dient nach Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktor für die Expression von Typ I IFN (22).

Auch die vorwiegend in plasmazytoiden DZ aus dem endoplasmatischen Retikulum in Endosome rekrutierten TLR7 und TLR9 nutzen das Signaltransduktionsmolekül MyD88 (25). Nach Ligandenbindung wird ein Komplex aus MyD88, IRAK4, TRAF3, TRAF6, IRAK1, IKK-alpha und IRF7 zum TLR rekrutiert. Über eine Phosphorylierung wird IRF7 aktiviert, migriert in den Zellkern und induziert die Expression von Typ I IFN. Ebenfalls kann über TRAF6 und NF-kappaB die Zytokinexpression angeregt werden (9). Eine schematische Darstellung der Signaltransduktionswege aller beschriebenen TLR findet sich in Abbildung 1–2.



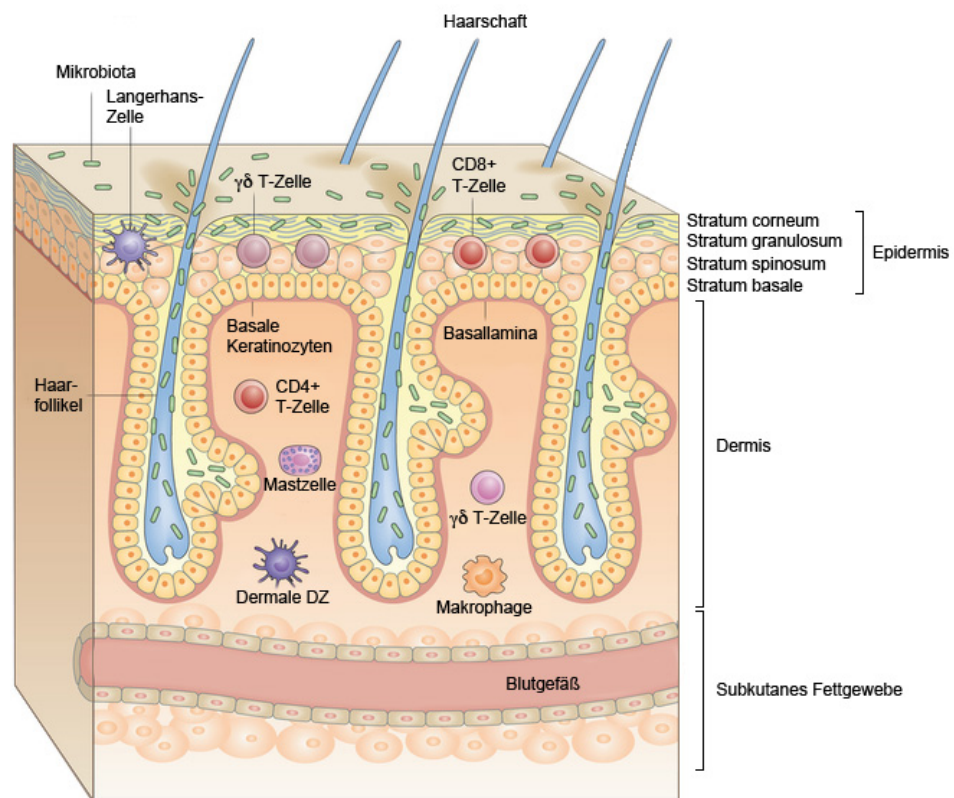
**Abbildung 1–2: Übersicht der verschiedenen Signaltransduktionswege bei TLR**

(a) Lipoproteine sowie LPS werden auf der Zelloberfläche von immunrelevanten Zellen über TLR2 Heterodimere mit TLR1 oder TLR6 respektive durch Dimerisierung von TLR4/MD2 Komplexen erkannt. Durch die Ligandenbindung wird über das Signaltransduktionsmolekül MyD88 eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB und somit zur Expression vorwiegend proinflammatorischer Zytokine führt. Zudem induziert LPS eine Translokation von TLR4/MD2 Homodimeren mittels TRAM zu den Endosomen. Der ebenfalls in den Endosomen lokalisierte TLR3 erkennt doppelsträngige RNS. Aktivierte endosomale TLR3 und TLR4 stimulieren über den Adaptor TRIF die Expression von Typ I IFN und können zudem über NF-kappaB die Zytokinexpression induzieren.  
 (b) Die endosomal vorliegenden TLR7 sowie TLR9 erkennen sowohl virale als auch endogene Nukleinsäuren, die über verschiedene membranständige Proteine erkannt und zu den Endolysosomen transportiert werden können. Über MyD88 erfolgt mittels Phosphorylierungen sowohl die Aktivierung von NF-kappaB als auch von IRF7. Durch Translokation der beiden Transkriptionsfaktoren in den Zellkern wird die Expression von Zytokinen und Typ I IFN aktiviert. Modifiziert nach (9).

## 1.2 Die Haut als Barriere- und Immunorgan

Die Haut ist ein hochkomplexes Organ, welches sowohl morphologisch als auch funktionell in drei zu unterscheidende Schichten gegliedert werden kann. Von außen nach innen besteht sie aus der Epidermis und der Dermis, die durch die Basallamina voneinander getrennt werden, sowie der Subcutis. All diese Hautschichten weisen eine Vielzahl verschiedener Zelltypen auf und beinhalten weitere Strukturen wie Haarfollikel, Hautanhangsgebilde, Blut- und Lymphgefäße sowie Nervenbahnen. So schützt die Haut den Organismus nicht nur in Form einer physikalischen Barriere vor einer Vielzahl externer Umwelteinflüsse, wie Pathogene, Allergene und UV-Strahlung, sondern dient ebenso

als sensorisches Organ, verhindert einen unkontrollierten Wasser- und Nährstoffverlust und trägt zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bei (26, 27). Neben diesen vorwiegend physikalischen Aufgaben ist die Haut, basierend auf ihrer komplexen zellulären Struktur, jedoch ebenfalls Teil der angeborenen und erworbenen Immunität und somit hochspezialisiert in der Abwehr verschiedenster exogener Gefahren (28). Abbildung 1–3 zeigt eine Übersichtsdarstellung der strukturellen und zellulären Komponenten der murinen Haut.



**Abbildung 1–3: Aufbau und zelluläre Komponenten der murinen Haut**  
Modifiziert nach (29).

### 1.2.1 Epidermis

**Struktureller Aufbau** Die Epidermis ist ein begrenzendes Plattenepithel, welches die äußerste Hautschicht bildet und zu mehr als 95 % aus den strukturbildenden Keratinozyten besteht. Wie in Abbildung 1–3 ersichtlich, kann die Epidermis seinerseits anhand ihrer Funktion und der zellulären Differenzierungsstadien in vier charakteristische Schichten gegliedert werden.

Das außen lokalisierte *Stratum corneum* besteht vorwiegend aus abgestorbenen und ausdifferenzierten Keratinozyten, die weder Zellorganellen noch einen Zellkern aufweisen (27), jedoch reich an Keratin und Filaggrin sind (30). Die

Korneozyten sind in eine interzelluläre Lipidmatrix bestehend aus Ceramiden, Cholesterol und freien Fettsäuren eingebettet. Bedingt durch die hydrophoben Eigenschaften des *Stratum corneum* bei intakter Lipidmatrix ist sie stark impermeabel für Wasser und darin gelöste Substanzen, so dass der transepidermale Wasserverlust möglichst gering gehalten werden kann. Auch bietet die dichte Struktur der abgeflachten und versetzt zueinander stehenden Korneozyten einen adäquaten Schutz gegen die Invasion von Pathogenen (31). Zusätzlich stellt das *Stratum corneum* eine ökologische Nische für eine Vielzahl von Bakterien, Pilzen, Viren und Milben dar, die allesamt die natürliche Hautflora bilden. Diese für den Wirtsorganismus harmlosen und vorteilhaften Kommensalen bieten neben einer Beteiligung bei der Wundheilung und der schützenden Wirkung gegenüber pathogenen Organismen zudem einen positiven Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems in der Haut (28).

Das unterhalb des *Stratum corneum* befindliche *Stratum granulosum* beinhaltet zwar ebenfalls stark ausdifferenzierte jedoch noch lebende und über *tight junctions* miteinander verbundene Keratinozyten, die ebenfalls einem transepidermalen Wasserverlust entgegenwirken. Des Weiteren enthalten die Keratinozyten des *Stratum granulosum* Lamellar-Körperchen, die sowohl Lipidhydrolasen als auch Vorläuferstrukturen der Lipidmatrix aufweisen. Nach Sekretion und hydrolytischer Spaltung der Lipidvorläufer formieren sich die Fettstrukturen zwischen den Korneozyten zu der beschriebenen impermeablen Lipidmatrix (32).

Das mehrschichtige *Stratum spinosum* und die einschichtige direkt auf der Basallamina aufliegende Basalschicht repräsentieren die beiden unteren Schichten der Epidermis. Während die Keratinozyten in der Basalschicht mitotisch hoch aktiv sind, findet sich in den polygonförmigen und über Desmosomen miteinander verknüpften Keratinozyten nur noch selten eine Teilungsaktivität (31, 32). Die stetig aus der Basalschicht erneuerten Keratinozyten des *Stratum spinosum* produzieren in ihrem Differenzierungsprozess vermehrt die Zytokeratine K1 und K10. Neben ihrer stabilisierenden Funktion für die Epidermis, dienen K1 und K10 zusätzlich als Differenzierungsmarker für Keratinozyten und gewährleisten somit eine klare Abgrenzung zu den basalen Keratinozyten, die vorwiegend die Strukturproteine K5 und K14 synthetisieren (33).

### Zelltypen und ihre Funktionen

Neben den Keratinozyten sind insbesondere im *Stratum spinosum* verschiedene immunkompetente Zellen wie CD8<sup>+</sup> T-Zellen, gamma/delta T-Zellen und epi-

dermale DZ, die als Langerhanszellen bezeichnet werden, lokalisiert (29). Während  $CD8^+$  T-Zellen dem adaptiven Immunsystem zugeordnet werden und ihre Funktion hauptsächlich in der lokalen Überwachung von zuvor durch Viren infiziertem Gewebe liegt (34, 35), bilden sowohl gamma/delta T-Zellen als auch Langerhanszellen eine Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Die einen invarianten T-Zellrezeptor besitzenden gamma/delta T-Zellen werden vielfache Aufgaben bei der Wundheilung sowie der Aufrechterhaltung der epidermalen Homöostase durch moderate jedoch konstitutive Sekretion von keratinozytenstimulierenden Wachstumsfaktoren und Zytokinen zugeschrieben (36). Weiterhin sind sie in der Lage, bei entzündlichen Prozessen proinflammatorische Zytokine zu bilden und durch die Produktion von Chemokinen Leukozyten in die Epidermis zu rekrutieren (37). Auch die in der Epidermis residenten unreifen Langerhanszellen sind als antigenpräsentierende Zellen in erster Linie darauf spezialisiert, Pathogene und Antigene wie zum Beispiel Allergene zu phagozytieren und sie zu prozessieren (38, 39). Im weiteren Verlauf unterliegen die somit aktivierten Langerhanszellen einem Reifungsprozess, bei dem MHC I- und II-Moleküle, weitere kostimulatorische Moleküle für die Antigenpräsentation sowie verschiedene Chemokinrezeptoren verstärkt exprimiert werden, während die verminderte Expression von E-Cadherin den Zell-Zell Kontakt zu den Keratinozyten herabsetzt und eine Migration zu den hautdrainierenden Lymphknoten ermöglicht (40). In den Lymphknoten angekommen können die Langerhanszellen die auf MHC-Molekülen exprimierten Antigene naiven antigenspezifischen T-Zellen präsentieren und eine adaptive Immunantwort initiieren (41, 42). Neben ihrer immunstimulierenden Funktion zeigen Langerhanszellen auch tolerogene Effekte auf T-Zellen, deren genaue Mechanismen es jedoch weiter zu ergründen gilt (43).

Ein weiterer lediglich in der Basalschicht existenter Zelltyp sind die Melanozyten. Sie dienen vorwiegend dem Schutz der Haut vor schädigender UV-Strahlung, indem sie Melanin produzieren und in Form von Melanosomen an umliegende Keratinozyten abgeben. Hier kann sich das Melanin wie ein Schutzschirm um die Desoxyribonukleinsäure (DNS) des Zellkerns lagern, um die Keratinozyten vor übermäßigen UV-induzierten DNS-Schäden zu bewahren (44).

Neben ihrer Funktion als mechanische und physikalische Barriere treten die Keratinozyten immer häufiger als aktiver Teil des angeborenen Immunsystems in den Fokus. Während in unstimulierten Keratinozyten lediglich geringe Mengen an Wachstumsfaktoren und Zytokinen gebildet werden, sind sie in der Lage nach exogener sowie endogener Stimulierung durch verschiedenste Pathogene und Noxen die Expression und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, TNF-alpha, IL-6, *keratinocyte-derived chemokine* (KC) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) sowie weitere Moleküle aus der Familie der Chemokine stark zu erhöhen (26). Zum einen können die sekretierten Zytokine auto- und parakrine Wirkweisen entfalten und somit eine fortlaufende und verstärkte Zytokinexpression gewährleisten. In diesem aktivierten Zustand werden zudem verstärkt die Zytokeratine K6 und K16 gebildet, so dass eine klare Abgrenzung zu den K1 und K10 exprimierenden und lediglich den normalen Differenzierungsprozess durchlaufenden Keratinozyten ermöglicht wird. Insbesondere durch die autokrine Wirkung der Zytokine TNF-alpha und *transforming growth factor* (TGF)-beta verbleiben die Keratinozyten in diesem proinflammatorischen Zustand und proliferieren. Zusätzlich wird durch IFN gamma ein kontraktiler Zustand innerhalb der Keratinozyten hergestellt, der es ihnen ermöglicht die Basalschicht in Richtung *Stratum corneum* zu verlassen. Erst durch ein deaktivierendes Signal von Fibroblasten in Form von TGF-beta wird der basale Phänotyp wiederhergestellt und eine weitere Aktivierung unterbunden (33). Auf der anderen Seite kann durch die Produktion insbesondere der Zytokine IL-1alpha, TNF-alpha sowie GM-CSF eine Aktivierung von Langerhanszellen erfolgen (45), so dass eine Migration ebendieser in die drainierenden Lymphknoten stimuliert wird, um dort eine Aktivierung der adaptiven Immunität über naive T-Zellen hervorzurufen (42).

### 1.2.2 Dermis

Die durch die Basallamina von den epidermalen Strukturen getrennte Dermis besteht neben der strukturbildenden kollagen- und elastinhaltigen extrazellulären Matrix hauptsächlich aus den Fibroblasten, die vorwiegend für die Synthese dieser Interzellulärsubstanz verantwortlich sind (46). Während den Fibroblasten in früheren Zeiten lediglich begrenzte Möglichkeiten hinsichtlich der Synthese von Wachstumsfaktoren und Zytokinen unterstellt wurden, treten sie in

jüngerer Zeit verstärkt in den Fokus als vielfältig agierender immunregulatorischer Zelltyp. So produzieren Fibroblasten in infiziertem Gewebe große Mengen an Zytokinen wie IL-6 sowie im humanen System IL-8 und das für die Eikosanoidsynthese notwendige Enzym Cyclooxygenase 2 (47, 48). Auch regulieren aktivierte Fibroblasten durch die Expression von CD40 das Verhalten von in die Dermis infiltrierenden Leukozyten (49).

Entsprechend der Epidermis befinden sich ebenso in der Dermis vielerlei residente immunkompetente Zellen. Neben Makrophagen finden sich weitere Subpopulationen antigenpräsentierender DZ (38, 39). Dermale Makrophagen sind hauptsächlich für die Phagozytose von Pathogenen und abgestorbenen Zellen sowie die Expression verschiedener Zytokine zuständig und weisen nur geringfügig migratorische Fähigkeiten auf (50). Die dermalen DZ können hingegen sowohl in der Dermis residente CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch nach Migration in die drainierenden Lymphknoten dort befindliche T-Zellen aktivieren. Somit sind sie essentiell für eine Einleitung und Koordinierung der Immunreaktion sowie die weitere Rekrutierung von Immunzellen verantwortlich (51).

Die ebenfalls in der Dermis residenten und insbesondere bei allergischen Reaktionen in den Vordergrund tretenden Mastzellen können in Abhängigkeit vom jeweiligen aktivierenden Stimulus verschiedene Expressionsmuster von Mediatoren und Zytokinen zeigen (52, 53). Insbesondere bei Immunglobulin (Ig) E vermittelten allergischen Reaktionen auf Allergene oder Parasiten führt die bi- oder multivalente Vernetzung von IgE gebunden an IgE-Rezeptor (FcεRI) zu einer schnellen und massiven Ausschüttung von Histamin durch Exozytose der intrazellulären Vesikel. Zusätzlich werden weitere proinflammatorische Lipidmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene gebildet und die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren induziert (54). Mastzellen können jedoch nicht nur über IgE vermittelte Signaltransduktionswege aktiviert werden, sondern auch über TLR oder weitere membranständige Rezeptoren. Insbesondere die über TLR induzierten Signalwege in Mastzellen führen zwar zu einer Sekretion von Zytokinen und Lipidmediatoren, rufen aber keine Degranulation der intrazellulären Vesikel hervor (55).

### 1.3 UV-Strahlung

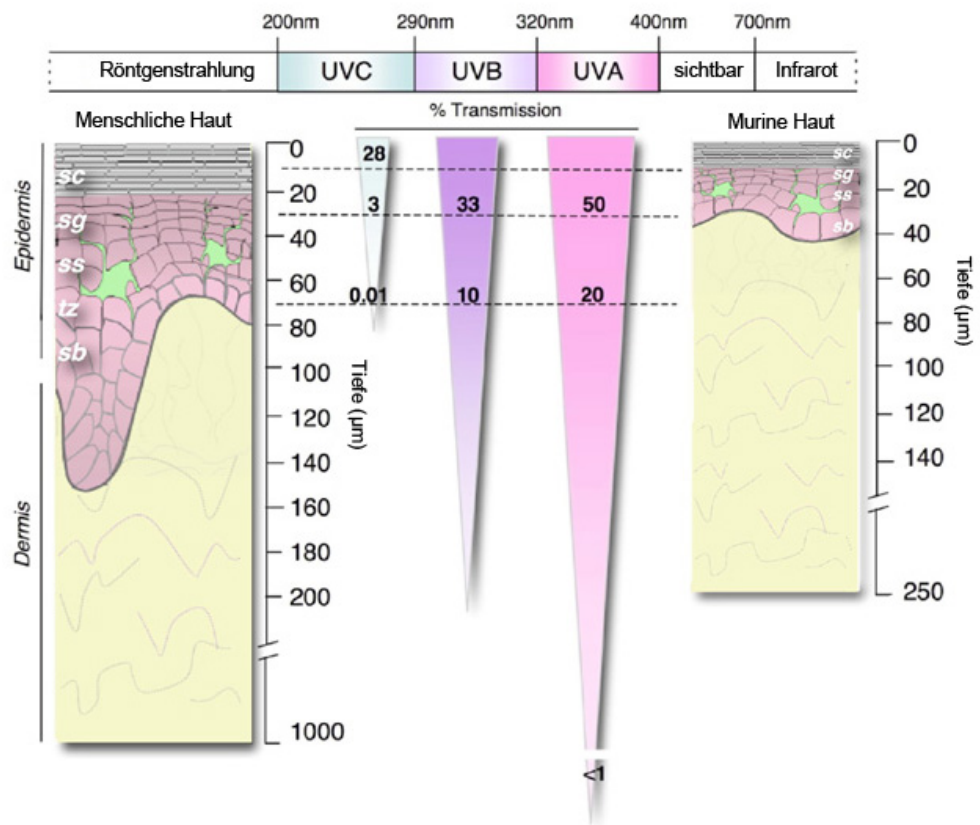
Die für das menschliche Auge nicht sichtbare UV-Strahlung wird vielfach kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite ist UV-Strahlung essentiell für den Organismus, da es die Synthese von Vitamin D in der Haut aus seinem Vorläufer 7-Dehydrocholesterol induziert. Vitamin D erhöht die Kalzium- und Phosphatabsorption im Darmlumen aus der zugeführten Nahrung und besitzt somit eine wichtige regulatorische Funktion im Knochenstoffwechsel. Zudem konnte in vielfachen Studien gezeigt werden, dass eine inverse Korrelation hinsichtlich der Vitamin D-Versorgung des Organismus und der Anfälligkeit für verschiedene Erkrankungen besteht (56). Dieser Effekt wird vorwiegend auf die immunmodulatorischen Fähigkeiten des Vitamin D in Makrophagen und DZ zurückgeführt (57, 58). Zudem werden UV-Strahlen erfolgreich als Phototherapie zur Behandlung und Linderung der Symptome bei verschiedenen Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis, Psoriasis, Vitiligo und weiterer Hautekzeme eingesetzt (59).

Dennoch überwiegen bei übermäßiger UV-Strahlung die gesundheitlichen Nachteile. Akut können Entzündungsreaktionen in Form eines Sonnenbrands auftreten. Bei langfristiger und chronischer Bestrahlung werden sowohl Immunfunktionen supprimiert als auch vermehrt DNS-Schäden induziert, so dass das Risiko für die Entwicklung maligner und nicht-maligner Hauttumore stark ansteigt (59, 60). Ebenfalls geht mit chronischer UV-Bestrahlung eine extrinsische Hautalterung, bedingt durch einen erhöhten Verlust an dermalen Bindegewebsmatrix, einher (61, 62).

#### 1.3.1 Physikalische Grundlagen

Basierend auf der elektromagnetischen Strahlung umfasst das Sonnenlicht drei Hauptspektren: Infrarot, sichtbares Licht und UV. Während die Infrarot Strahlung ein breites Wellenlängenspektrum von 700-100000 nm aufweist, emittiert die kurzwellige UV-Strahlung lediglich in einem sehr engen Bereich bei 200-400 nm unterhalb der Wellenlängen für sichtbares Licht. Die UV-Strahlung kann - wie in Abbildung 1-4 ersichtlich - anhand der Wellenlänge detaillierter in UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) und UVC (200-290 nm) eingeteilt werden (60, 63).





**Abbildung 1–4: Schematischer Vergleich der Transmission von UV-Strahlung in menschlicher Haut sowie Maushaut**

Sowohl im humanen als auch im murinen Organismus durchdringt die längerwellige UVA-Strahlung alle epidermalen Schichten und kann insbesondere in der Maus tief in die dermalen Strukturen vordringen. Während im menschlichen Organismus aufgrund der wesentlich dickeren Epidermis die energiereichere jedoch kurzwelligere UVB-Strahlung weitestgehend von der Epidermis absorbiert wird erreichen bis zu 30 % der Strahlung im murinen System auch die Dermis. Modifiziert nach (64).

Welcher Teil des Sonnenlichts die Erdoberfläche erreicht, wird durch die Erdatmosphäre bestimmt. Je kürzer die Wellenlängen des Sonnenspektrums werden, desto eher werden sie von der Atmosphäre absorbiert und treffen nicht auf die Erdoberfläche. Dennoch bestehen etwa 5 % der elektromagnetischen Strahlung auf der Erdoberfläche aus Wellenlängen im Bereich der UV-Strahlung. Der weitaus größte Anteil der auftreffenden UV-Strahlung wird mit bis zu 95 % von der längerwelligen UVA-Strahlung gebildet. Unter normalen Umständen wirken das in der Atmosphäre vorhandene Ozon, der Sauerstoff und der Wasserdampf als UV-Filter, indem sie die UVB- und UVC-Strahlung vollständig absorbieren und ein Auftreffen auf die Erdoberfläche somit verhindert wird. Durch die schwindende Ozonschicht und in Abhängigkeit der geographischen Lage treffen jedoch bis zu 10 % der im Sonnenlicht enthalte-

nen UVB-Strahlung und kleine Anteile UVC-Strahlung auf der Erdoberfläche auf. Obwohl nur geringe Mengen UVB-Strahlung die Erde erreichen, sind sie - trotz ihrer geringeren Eindringtiefe in menschlicher sowie in muriner Haut (Abbildung 1–4) - durch ihre höhere Energie wesentlich gefährlicher für den Organismus als UVA-Strahlung. Somit wird deutlich, dass UVB-Strahlung im Vergleich zur UVA-Strahlung ein erheblich höheres mutagenes Potential aufweist und als Hauptverursacher für UV-induzierte Gesundheitsschäden gilt (59).

In diesem Zusammenhang stellt sich jedoch die Frage welche Eigenschaften der UV-Strahlung für die gesundheitsschädlichen Veränderungen innerhalb der Zelle verantwortlich sind. Wenn UV-Strahlung in die Haut eindringt, wird die Energie der auftreffenden elektromagnetischen Strahlung durch Absorption zellulärer Moleküle auf diese in Form von chemischer Energie übertragen. Durch diesen Ionisierungsvorgang gelangen die als Chromophore bezeichneten Moleküle in einen angeregten und chemisch hochreaktiven Zustand, der mit Konformationsänderungen innerhalb dieser Moleküle einhergehen kann. Die hierdurch entstehenden Photoprodukte führen zu Veränderungen der Funktion der Moleküle sowohl innerhalb der Zelle als auch im Gewebe und können diese nachhaltig beeinflussen.

Zu den UVB-absorbierenden Molekülen zählen unter anderen Melanin, 7-Dehydrocholesterol, Urokansäure, DNS sowie vielfache Proteine mit einem Absorptionsmaximum im Bereich der UVB-Strahlung. Anhand dieser identifizierten Chromophore lassen sich die primären UVB-induzierten Schädigungen ableiten. Während die Interaktionen von UVB-Strahlung mit 7-Dehydrocholesterol für die endogene Vitamin D Synthese (65) sowie mit Melanin zum Schutz vor der aggressiven UV-Strahlung (65) als positiv und nicht schädigend für den Organismus angesehen werden kann, gelten UVB-induzierte Veränderungen der nukleären DNS (67), die Isomerisierung der *trans*-Urokaninsäure zur *cis*-Form (68, 69) sowie weitere direkte oder indirekte Veränderungen von Zellmembranlipiden und -proteinen als gesundheitsschädlich (70).

### 1.3.2 Entzündliche Reaktionen der Haut als Antwort auf UV-Strahlung

Übermäßige UV-Strahlung führt in der Haut zu akuten Entzündungsreaktionen. Diese durch Aktivierung des Immunsystems induzierte und im Volksmund als Sonnenbrand bekannte akute Reaktion der Haut kann abhängig von Dauer und Stärke der UV-Exposition sowie der Sensitivität und Pigmentierung des Individuums stark variierende Erscheinungsformen annehmen. Während bei den milden Formen des Sonnenbrands lediglich ein vorübergehendes Erythem hauptsächlich bedingt durch eine gesteigerte lokale Durchblutung zu beobachten ist, sind die schweren Formen gekennzeichnet durch starke Rötungen, Schmerz, Ödembildung und Nekrose (71). Charakteristisch für eine solche akute Entzündungsreaktion ist die verstärkte Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie TNF-alpha oder IL-1 (72, 73) sowie Prostaglandin E2 und Stickoxid (74). Hauptsächlich verantwortlich für die Sekretion der proinflammatorischen Mediatoren nach UV-Exposition sind Keratinozyten (75). Dennoch haben auch andere epidermale sowie dermale Zellpopulationen wie Langerhanszellen (76), Mastzellen (77) oder Fibroblasten (78) Einfluss auf das Zytokinprofil in der Haut nach UV-Bestrahlung. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Koordination von Entzündungsreaktionen wird dem von Keratinozyten und Mastzellen sekretierten TNF-alpha zugeschrieben (72, 79). Dieses Zytokin führt zu einer verstärkten Expression von MHC I auf Endothelzellen und Fibroblasten (80) und fördert die Induktion von Apoptose in Keratinozyten (81). Des Weiteren werden verschiedene Adhäsionsmoleküle wie *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1, *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1 und E-Selektin verstärkt exprimiert (82), was in der Folge die Rekrutierung und Infiltration weiterer Entzündungszellen wie Makrophagen und Granulozyten in die Dermis begünstigt (83).

Die verstärkte Expression der zuvor genannten Entzündungsmediatoren nach UV-Strahlung erfolgt vorwiegend über den Transkriptionsfaktor NF-kappaB. Wird die Translokation von NF-kappaB in den Zellkern jedoch blockiert, kann eine stark verminderte Zytokinexpression nach UV-Bestrahlung beobachtet werden (84). Ob die Aktivierung von NF-kappaB jedoch durch TLR und hiermit einhergehend dem Signaltransduktionsmolekül MyD88 induziert wird und in welchen Zellpopulationen nach UV-Strahlung dies der Fall ist, ist bis

heute nicht ausreichend geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. Möglicherweise können endogene Gefahrensignale für die UV-induzierte Signaltransduktion via TLR verantwortlich sein. Diese auch als Alarmine bezeichneten und in Tabelle 1–1 exemplarisch aufgelisteten Moleküle sind konservierte stark exprimierte Moleküle, die in gesunden Zellen des Organismus intrazellulär vorliegen. Bei stressinduzierten Gewebeschäden werden sie in den Extrazellularraum freigesetzt (19). Hier können sie von benachbarten TLR-exprimierenden Immunzellen wie Makropagen, DZ, Granulozyten und Epithelzellen erkannt werden, so dass eine Immunreaktion eingeleitet wird (85).

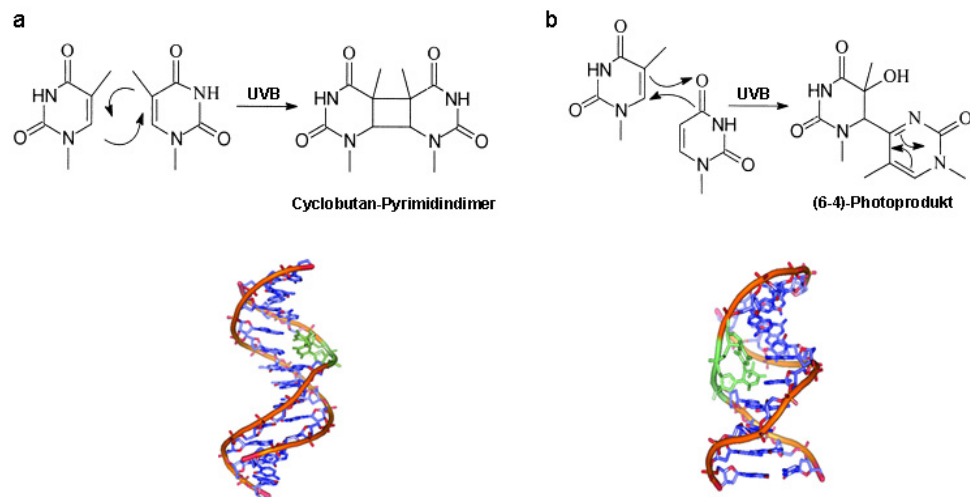
### 1.3.3 UV-induzierte DNS-Schäden

#### Formen von DNS-Schäden

Trifft UV-Strahlung auf die Haut kann insbesondere die DNS epidermaler als auch dermalen Zellen durch die enthaltene elektromagnetische Strahlung geschädigt werden. Während UVA-Strahlung weitgehend über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies indirekt DNS-Schäden hervorrufen kann, ist UVB-Strahlung aufgrund des Absorptionsmaximums der in der nukleären DNS vorhandenen Purin- und Pyrimidinbasen fähig, diese direkt zu schädigen (86, 87).

Die zwei am häufigsten auftretenden direkt durch UVB-Strahlung induzierten DNS-Schäden sind (6-4)-Photoprodukte und Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD). Obwohl neuere Untersuchungen entgegen der ursprünglichen Sichtweise gezeigt haben, dass auch UVA-Strahlung dazu befähigt ist direkt CPD in der DNS hervorzurufen (88), ist UVB-Strahlung dennoch der Hauptrisikofaktor für die Formation dieses DNS-Schadens (89). Zudem können weitere UVB-induzierte indirekt oder direkt gebildete Basenprodukte wie 8-Hydroxydesoxyguanosin (90) respektive Purin-Dimere und Pyrimidin-Photohydrate entstehen (91). Letztgenanntes wird bezüglich des mutagenen Potentials jedoch eine untergeordnete Rolle zugeschrieben.

Wie aus Abbildung 1–5 ersichtlich basieren sowohl (6-4)-Photoprodukte als auch CPD auf Elektronenumverteilungen und einer damit verbundenen Quervernetzung zweier benachbarter Pyrimidinbasen über kovalente Bindungen (92, 93). Beide Strukturveränderungen führen zu Konformationsveränderungen der helikalen DNS-Struktur (siehe Abbildung 1–5).



**Abbildung 1–5: Ausbildung UVB-induzierter DNS-Schäden**

Die UVB-induzierte Ausbildung von Cyclobutan-Pyrimidindimere **(a)** und (6-4)-Photoprodukten **(b)** führt zu Störungen in der helikalen DNS-Struktur (DNS-Schäden in grün). Diese Konformationsänderungen können bei unzureichender Reparatur Mutationen hervorrufen und die Transkription beeinflussen, modifiziert nach (87, 94).

### Reparatur der DNS-Schäden: NER

Um die Bildung von malignen Veränderungen in Geweben bedingt durch eine Anhäufung von DNS-Schäden zu verhindern, besitzen Zellen spezifische Mechanismen, um die gebildeten UV-Photoprodukte schnellstmöglich zu reparieren. Ein wirkungsvolles zelluläres Werkzeug für die Entfernung von DNS-Schäden, die eine Störung der helikalen Struktur durch sperrige Läsionen (sog. *bulky lesions*) hervorrufen, ist die Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Die NER kann in globale Genom-NER und transkriptionsgekoppelte NER unterschieden werden. Während bei der globalen Genom-NER Schäden in transkriptionssinaktiven DNS-Abschnitten behoben werden, erfolgt dies bei der transkriptionsgekoppelten NER in transkriptionell hochaktiven Bereichen (95, 96).

Die NER gliedert sich grundsätzlich in die Phasen der initialen Schadenserkenkung, der Öffnung der DNS-Doppelhelix samt Entfernung der geschädigten Stelle sowie der Resynthese der komplementären Basen mit anschließender Ligation. Während der Schaden bei der globalen Genom-NER von einem Proteinkomplex bestehend aus hHR23B und *xeroderma pigmentosum complementation group* (XP) C erkannt wird, erfolgt bei der transkriptionsgekoppelten NER eine initiale Entfernung der transkribierenden RNA-Polymerase II über die Proteine *excision repair cross-complementing* (ERCC)-6 und -8. Alle nachfolgend eingeleiteten Schritte zur Schadensbehebung laufen bei beiden Subtypen der NER gleich ab. Die Entwindung der DNS-Doppelhelix im unmittelbaren Bereich

des UV-Schadens wird durch den aus 10 Untereinheiten bestehenden Transkriptionsfaktor-IIIH gewährleistet, der unter anderen die Helikasen XPB und XPD beinhaltet (97). Zusätzlich dienen XPA und *replication protein A* (RPA) zur weiteren Erkennung des DNS-Schadens. Die in der Folge rekrutierten Endonukleasen XPG und XPF/ERCC-1 entfernen durch duale Inzision einen 24-32 Nukleotide enthaltenen DNS-Abschnitt, der den UV-Schaden beinhaltet (94). Die entfernten Nukleotide werden anschließend komplementär zur DNS-Matrize durch die DNS-Polymerase resynthetisiert. Durch Ligation des komplementären DNS-Strangs wird die Reparatur komplettiert und abgeschlossen (98).

Die Wichtigkeit der Reparatur insbesondere von Pyrimidindimeren wird bei Patienten mit seltenen Erbkrankheiten wie der *Xeroderma pigmentosum* und dem *Cockayne syndrom* deutlich. Durch Proteindefekte an verschiedenen Stellen innerhalb der Nukleotidexzisionsreparatur sind die Zellen der Patienten hypersensitiv gegenüber UV-Strahlung, so dass die Inzidenz für Hautkrebs jeglicher Art durch die gestörte Reparatur und Akkumulation der Pyrimidindimere stark erhöht ist (99).

### **Folgen übermäßiger UVB-Strahlung**

Werden diese UVB-induzierten Strukturschäden aufgrund einer zu hohen Anzahl nicht in ausreichendem Umfang repariert, entstehen bei der nächsten Replikation durch den fehlerhaften Einbau von Basen Mutationen. Neben dem mutagenen Potential der UV-Schäden können insbesondere eine Inhibition der Transkription die Zellfunktion beeinflussen. Diese Störungen können zum einen dadurch begründet sein, dass die RNA-Polymerase durch die Konformationsänderung der DNS diese nicht ablesen kann und dieses einen Abbruch der Transkription zur Folge hat oder Transkriptionsfaktoren durch die veränderten Basenprodukte erst gar nicht an ihre Promotorregionen binden können (100). Obwohl (6-4)-Photoprodukte *in vitro* mutagene Eigenschaften aufweisen, ist ihr direkter Einfluss auf die UV-induzierte Mutagenese *in vivo* als gering einzuschätzen. Dies ist auf die wesentlich schnellere Reparatur der (6-4)-Photoprodukte im Vergleich zu den CPD zurückzuführen (101, 102). Demnach initiieren (6-4)-Photoprodukte neben einem veränderten Transkriptionsmuster vornehmlich die Inhibierung der DNS-Replikation und hiermit verbunden die Apoptose der betroffenen Zellen (103). CPD hingegen sind direkt an der Entstehung von Hautkrebs beteiligt (104). So finden sich beispielsweise

in entarteten Zellen des Plattenepithelkarzinoms der Haut (105, 106) aber auch in malignen Melanomen (107) vielfache CPD-induzierte Mutationen im Tumorsuppressorgen p53, die eine Eliminierung der mutierten Zellen durch Apoptose verhindern und eine maligne Wucherung der entarteten Zellen fördern.

## 2 GRUNDLEGENDE FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT

Übermäßige UV-Strahlung führt in der Haut akut zu Entzündungsreaktionen, die in Form und Ausprägung von einer leichten Rötung bis zu Verbrennungen mit Ödembildung und Nekrose reichen können. Neben diesen offensichtlichen Erscheinungen werden durch UVB-Strahlung zudem Zell- und DNS-Schäden induziert, die langfristig eine beschleunigte Hautalterung sowie die Formation von Hautkrebs begünstigen. Vergleicht man die UV-induzierte Entzündungsreaktion mit derjenigen nach einer Pathogeninvasion, so lassen sich vielfache Gemeinsamkeiten feststellen. Da Pathogene vorwiegend über konservierte Strukturen von Mustererkennungsrezeptoren erkannt werden, liegt eine Beteiligung von Signalwegen des angeborenen Immunsystems bei der UVB-induzierten Entzündungsreaktion über sterile Gefahrensignale nahe. Maßgebliche Beteiligung an der Signaltransduktion aller TLR mit Ausnahme des TLR3 hat das Adaptorprotein MyD88. Zudem ist MyD88 in die Signalweiterleitung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und IL-18 involviert.

In dieser Arbeit wurde die Rolle von MyD88 bei der akuten UVB-induzierten Entzündungsreaktion im Mausmodell untersucht. Für die Analysen wurden MyD88-defiziente Mäuse herangezogen. Um detaillierter beurteilen zu können, in welchen Zelltypen MyD88-abhängig das angeborene Immunsystem aktiviert wird, wurden weitere Mauslinien verwendet, die spezifisch MyD88 in Keratinozyten oder Makrophagen und Neutrophilen exprimieren, während alle anderen Zellen des Organismus MyD88-defizient sind.

Basierend auf den zuvor getätigten Überlegungen wurden in dieser Arbeit folgende Fragen näher erörtert:

1. Kann akute UVB-Strahlung in Abhängigkeit des zentralen Signaltransduktionsproteins MyD88 als Gefahrensignal fungieren und das angeborene Immunsystem aktivieren?
2. Trägt die Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur Entzündungsreaktion und zur Entstehung von DNS-Schäden bei?
3. Welchen Anteil haben die einzelnen epidermalen und dermalen Zellpopulationen an den UVB-induzierten Hautveränderungen?



### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Technische Ausstattung

- Absorptions-Reader: ELx800, BioTek, Bad Friedrichshall
- Blotting Apparatur: a) Semi-dry-Blotter Maxi, Carl Roth, Karlsruhe  
b) Slot Blot SHM 48 well, Scie-Plas, Cambridge, Großbritannien
- Durchflusszytometer: FACS Canto, BD Biosciences, Heidelberg
- Elektrophoresekammern: a) PerfectBlue Gelsystem, Peqlab, Erlangen  
b) Mini-Protean® Tetra Cell, Biorad, München
- Elektrophoresenetztteil: PowerPac™ Basic Power Supply, Biorad, München
- Feinwaage: Sartorius AG, Göttingen
- Fluoreszenzmikroskop: BZ-9000, Keyence, Essen
- Geldokumentation: DarkHood DH-40/50, Biostep, Jahnsdorf
- Grobwaage: 440-35N, Kern, Balingen-Frommern
- Homogenisator: Precelly's®, Peqlab, Erlangen
- Imager: a) Odyssey® CLx, Li-Cor, Lincoln, USA  
b) Biorad Versa Doc, Biorad, München
- Inkubator: CO<sub>2</sub>-Inkubator C150, Binder, Tuttlingen
- Kryostat: CM3050 S, Leica, Nussloch
- Mikroplatten-Photometer: Tecan Infinite® 200, Tecan Group, Crailsheim
- Real-Time System: CFX96™, Biorad, München
- Rasierapparat: ChroMini Moser®, Wahl, Unterkirnach
- Sicherheitswerkbank: BDk-SK Klasse II, BDk Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
- Spektrophotometer: NanoDrop1000, Peqlab, Erlangen
- Thermocycler: T1, Biometra GmbH, Göttingen
- UV-Lampen a) TL 20W/12 RS, Philips, Amsterdam, Niederlande

- b) PL-S 9W/01/2P 1CT, Philips, Amsterdam, Niederlande
- UV-Meter Variocontrol, Waldmann, Villingen-Schwenningen
- Vakuumpumpe: Laboport, KNF Neuberger, Freiburg
- Zentrifugen: 5810R für Mikrottestplatte/5415R für Reaktionsgefäße, beide Eppendorf, Hamburg

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

- Apoptosedetektionskit: In situ cell death detection kit, Fluorescein, Roche, Mannheim
- Blottingmembranen: Amersham™ Hybond™-ECL Nitrozellulosemembran/Amersham™ Hybond™-N<sup>+</sup> Nylonmembran, GE Healthcare, Solingen
- Detektionsreagenz: Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare, Solingen
- DNS-Isolationskit: DNeasy® Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden
- Einbettform: Tissue-Tek® Cryomold® intermediate, Sakura Finetek, Torrance, USA
- Einbettmedium: Tissue Freezing Medium®, Leica Microsystems, Nussloch
- ELISA-Platte: 96 well ELISA Mikropplatten half area, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- FACS-Röhrchen: FACS-Röhrchen für Durchflusszytometrie, Sarstedt, Nümbrecht
- Fettstift: ImmEdge, Vector Laboratories, Burlingame, USA
- Gel-Blotting Papier: Whatman™ GB005 200 x 200 mm, GE Healthcare, Solingen
- Glasperlen: Reflexperlen aus Kalk-Soda-Glas Ø 1,25 - 1,55 mm, Carl Roth, Karlsruhe

- Objektträger: Superfrost Plus, Thermo Scientific, Waltham, USA
- Reaktionsgefäße: a) 1,5/2 ml, Sarstedt, Nümbrecht  
b) 15/50 ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- RNS-Isolationskits: a) RNeasy® Plus Universal Mini Kit, Qiagen, Hilden  
b) Quick-RNA™ MiniPrep, Zymo Research, Irvine, USA
- Spritzen: BD Plastipak™ 1 ml Sub-Q, BD Biosciences, Heidelberg
- Zellsiebe: BD Falcon™ - Cell strainer nylon 40/70/100 µm, BD Biosciences, Heidelberg

Jegliche nicht näher aufgeführte und titulierte Verbrauchsmaterialien sowie Zellkulturschalen stammen von den Herstellern BD Biosciences (Heidelberg), Greiner Bio-One (Frickenhausen) oder Sarstedt (Nümbrecht).

### 3.1.3 Reagenzien

- β-Mercaptoethanol Sigma Aldrich, Seelze
- ABsolute™ Sybr® Green-Mix Thermo Scientific, Waltham, USA
- Aceton Carl Roth, Karlsruhe
- Agarose Peqlab, Erlangen
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) Sigma Aldrich, Seelze
- Bovine Pituitary Extract Life Technologies, Darmstadt
- Bovines Serumalbumin Sigma Aldrich, Seelze
- Bromphenolblau AppliChem, Darmstadt
- DNase I Roche, Mannheim
- DNS Leiter (100 bp) New England Biolabs, Frankfurt a. M.
- dNTP (100 µM) Solis BioDyne, Tartu, Estland
- DTT (100 µM) Promega, Madison, USA
- Eosin Y Lösung Sigma Aldrich, Seelze
- Epidermal Growth Factor Biochrom, Berlin

• Ethanol	Sigma Aldrich, Seelze
• Ethanolamin	Biochrom, Berlin
• Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
• L-Glutamin	Biochrom, Berlin
• Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
• Hämatoxylin Gill III Lösung	Sigma Aldrich, Seelze
• Heparin Natrium 25.000	Ratiopharm, Ulm
• Hydrocortison	Biochrom, Berlin
• Insulin	Biochrom, Berlin
• Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
• Ketanest® S (25 mg/ml)	Pfizer, Karlsruhe
• Kollagen A (1mg/ml)	Biochrom, Berlin
• Kollagenase D	Roche, Mannheim
• Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich, Seelze
• Mausserum	Sigma Aldrich, Seelze
• MCDB 153 Basalmedium	Biochrom, Berlin
• Myeloperoxidase	Sigma-Aldrich, Seelze
• MyTaq HS Mix	Bioline, Luckenwalde
• Oligo (dT) <sub>18</sub> Primer	Thermo Scientific, Waltham, USA
• Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt
• PBS	Biochrom, Berlin
• Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
• Phosphoethanolamin	Biochrom, Berlin
• Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
• Proteaseinhibitor-Mix	Roche, Mannheim
• Proteinase K	Roche, Mannheim
• Proteinstandard	Thermo Scientific, Waltham, USA
• Reaction Buffer for RT (5x)	Thermo Scientific, Waltham, USA
• Restore™ Stripping Buffer	Thermo Scientific, Waltham, USA
• Reverse Transkriptase	Thermo Scientific, Waltham, USA

- RIPA-Puffer Cell Signaling, Frankfurt a. M.
- RNAlater™ Qiagen, Hilden
- RNase Inhibitor Thermo Scientific, Waltham, USA
- Rompun® (20 mg/ml) Bayer, Leverkusen
- RPMI 1640-Medium PAA Laboratories GmbH, Cölbe
- Sybr®Safe Gel stain Life Technologies, Darmstadt
- TAE-Puffer (ultrapure) Life Technologies, Darmstadt
- TEMED Carl Roth, Karlsruhe
- TMB Plus Substrat Kem-En-Tec Diagnostics, Taastrup, Dänemark
- Toluidinblau O Carl Roth, Karlsruhe
- Trypanblau-Lösung Sigma-Aldrich, Seelze
- Trypsin-EDTA Life Technologies, Darmstadt
- Tween 20 Carl Roth, Karlsruhe

Alle im Folgenden genutzten und nicht näher genannten Feststoffe sowie Säuren und Laugen zur Herstellung von Lösungen und Puffern stammen von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Seelze).

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

- ACT Puffer (Erythrozytenlyse) 17 mM Tris  
+ 160 mM NH<sub>4</sub>Cl  
in Aqua dest. pH 7,2 einstellen
- Blockierungspuffer (Immunhistologie) 5 % BSA  
+ 1 % Mausserum  
in PBS
- Blockierungspuffer (*Western blot*) 5 % Magermilchpulver  
in TBS-T pH 7,5
- Blockierungspuffer (*Southwestern blot*) 5 % Magermilchpulver  
in TBS-T pH 8,0
- Blottingpuffer (*Western blot*) 25 mM Tris  
+ 192 mM Glycin  
+ 20 % Methanol  
in Aqua dest.

- Dimethylsulfoxid-Lösung  
20 % Dimethylsulfoxid  
+ 2 M NaOH  
in Aqua dest.
- HATAB-Puffer (MPO Aktivität)  
50 mM  $K_3PO_4$ , pH 6,0  
+ 5 mg/ml  $C_{19}H_{42}BrN$   
in Aqua dest.
- Injektionsnarkose  
40 % Rompun (20 mg/ml)  
+ 5 % Ketanest (25 mg/ml)  
in NaCl (0,9 %)
- Laemmli Puffer 5x (*Western blot*)  
300 mM Tris, pH 6,8  
+ 10 % SDS  
+ 50 % Glycerol  
+ 20 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
+ 0,05 % Bromphenolblau  
in Aqua dest.
- Lysepuffer (Genotypisierung)  
100 mM Tris, pH 8,5  
+ 5mM EDTA, pH 8,0  
+ 0,2 % SDS  
+ 200 mM NaCl  
+ 0,1 mg/ml Proteinase K  
in Aqua dest.
- Permeabilisierungspuffer (TUNEL)  
0,1 % Tween 20  
+ 0,1 % Natriumcitrat  
in Aqua dest.
- Ponceau S-Lösung (*Western blot*)  
5 % Essigsäure  
+ 0,1 % Ponceau S  
in Aqua dest.
- Sammelgel (*Western blot*)  
0,375 M Tris, pH 6,8  
+ 6 % Polyacrylamid  
+ 0,13 % SDS  
+ 0,1 % APS  
+ 0,1 % TEMED  
in Aqua dest.
- TBS-T pH 7,5 (*Western blot*)  
10 mM Tris  
+ 150 mM NaCl  
+ 0,05 % Tween 20  
in Aqua dest. pH 7,5 einstellen
- TBS-T pH 8,0 (*Southwestern blot*)  
10 mM Tris  
+ 150 mM NaCl  
+ 0,05 % Tween 20  
in Aqua dest. pH 8,0 einstellen

- T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> Puffer (DNS Puffer) 10 mM Tris, pH 8,0  
+ 1 mM EDTA  
in Aqua dest.
  
- Trenngel (*Western blot*) 0,375 M Tris, pH 8,8  
+ 12,5 % Polyacrylamid  
+ 0,08 % SDS  
+ 0,07 % APS  
+ 0,1 TEMED  
in Aqua dest.
  
- Waschpuffer (ELISA) 0,05 % Tween 20  
in PBS

### 3.1.5 Zellkulturmedien

- Medium für DZ 500 ml RPMI 1640-Medium  
+ 50 µM β-Mercaptoethanol  
+ 0,5 % Penicillin-Streptomycin  
+ 1 % L-Glutamin  
+ 2 % GM-CSF  
+ 10 % FCS
  
- Medium für Keratinozyten 500 ml MCDB 153 Basalmedium  
+ 1,4 µM Hydrocortison  
+ 50 µM β-Mercaptoethanol  
+ 0,1 mM Ethanolamin  
+ 0,1 mM Phosphoethanolamin  
+ 0,5 % Penicillin-Streptomycin  
+ 1 % L-Glutamin  
+ 2 % FCS  
+ 10 µg/l Epidermal Growth Factor  
+ 5 mg/l Insulin  
+ 50 mg/l Bovine Pituitary Extract

### 3.1.6 Antikörper

**Tabelle 3–1:** Antikörper für Histologie und Durchflusszytometrie

	Klon	Konjugat	Hersteller
CD11b	M1/70	APC/PeCy7	Biolegend, London, GB
CD11c	N418	APC/Cy7	Biolegend, London, GB
CD24	M1/69	APC	Biolegend, London, GB
Ly6C	HK1.4	PerCP	Biolegend, London, GB
Ly6G	1A8	Pe	Biolegend, London, GB
Keratin 6		purified	Covance, München
I-A/ I-E	M5/114.15.2	PerCP	Biolegend, London, GB
Streptavidin		Alexa 488	Life Technologies, Darmstadt
Streptavidin		Pe	Biolegend, London, GB

**Tabelle 3–2:** Antikörper für Western und Southwestern blot

	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -DNA mouse IgM	AC-30-10	Antibodies-online, Aachen
$\alpha$ -mouse GAPDH		Acris, Herford
$\alpha$ -mouse IgG-HRP		GE Healthcare, Solingen
$\alpha$ -mouse IgM-HRP		Santa Cruz, Heidelberg
$\alpha$ -mouse MyD88		Enzo Life Sciences, Lörrach
$\alpha$ -Thymine Dimer-HRP	KTM53	Kamiya, Seattle, USA
IRDye 680 RD $\alpha$ -mouse IgG		Li-Cor, Lincoln, USA
IRDye 800 CW $\alpha$ -rabbit IgG		Li-Cor, Lincoln, USA
$\alpha$ -Keratin6		Covance, München

### 3.1.7 ELISA-Kits

Alle nachfolgend aufgeführten ELISA-Kits sind gegen murine Proteine gerichtet:

- DuoSet® CCL17/TARC R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® CXCL1/KC R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® GM-CSF R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® IL-1alpha R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® IL-1beta R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® IL-6 R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® IL-10 R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® TGF-beta 1 R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® TNF-alpha R&D Systems, Wiesbaden
- DuoSet® TSLP R&D Systems, Wiesbaden
- MCP-1 Standard ELISA Peprotech, Hamburg



### 3.1.8 Primersequenzen für q-PCR

Tabelle 3–3: Primersequenzen für die q-PCR

Gen	Primersequenz (5' → 3')
CXCL1/KC	Fwd: GCT CTG ATG GCA CCT GTC T Rev: AGA ACT GAA CTA CCA TCG ATG
ERCC-1	Fwd: AAA GCT GGA GCA GAA CTT CCT Rev: TGT TCC AGG GAT CCA AAT GT
ERCC-6	Fwd: ATG CCA GCC TAG AGG AGG A Rev: GCA TGA GCA TAC TGC CAA GA
ERCC-8	Fwd: ACA CAT GTA AAG CAG TGT GTT CC Rev: TCT CCA CGC TGT ATT TGT GAA
GAPDH	Fwd: GAG CCA AAC GGG TCA TCA Rev: CAT ATT TCT CGT GGT TCA CAC C
GM-CSF	Fwd: GCA TGT AGA GGC CAT CAA AGA Rev: CGG GTC TGC ACA CAT GTT A
IL-1beta	Fwd: TTG ACG GAC CCC AAA AGA T Rev: GAA GCT GGA TGC TCT CAT CA
IL-6	Fwd: GCT ACC AAA CTG GAT ATA ATC AGG A Rev: CCA GGT AGC TAT GGT ACT CCA GAA
IL-10	Fwd: CAG AGC CAC ATG CTC CTA GA Rev: TGT CCA GCT GGT CCT TTG TT
IL-20	Fwd: TTT TAA GGA CGA CTG AGT CTT TGA Rev: ACC CTG TCC AGA TAG AAT CTC ACT A
Keratin 1	Fwd: GTT TTG GGT CCG GGT TGT Rev: TTT GCC TCC TTC ATC GAC A
Keratin 5	Fwd: CAT TCT CAG CCG TGG TAC G Rev: CAG AGC TGA GGA ACA TGC AG
Keratin 6	Fwd: AGT GCC CTG TGT ACG GGG TCG Rev: AGA AGC GAG AGG ACA CAG CCT C
Keratin 10	Fwd: TGT GGT GAG TTC CTT GCT CTT Rev: GAA CAA CTT GCA GAA AAG AAT CG
Keratin 14	Fwd: TCG ATC TGC AGG AGG ACA TT Rev: ATC GAG GAC CTG AAG AGC AA
Keratin 16	Fwd: TGA GCT GAC CCT GTC CAG A Rev: CTC AAG GCA AGC ATC TCC TC
Hyaluronansynthase 2	Fwd: GGC GGA GGA CGA GTC TAT G Rev: ACA CAT AGA AAC CTC TC CAA TGC
TNF-alpha	Fwd: TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG Rev: GGT CTG GGC CAT AGA ACT GA
Tyrosinase	Fwd: CAC CAT GCT TTT GTG GAC AG Rev: GGC TTC TGG GTA AAC TTC CAA
XPA	Fwd: ACG AGA TTG GAA ACA TTG TTC A Rev: CTC TTT CCC GCA TTC TTC AC
XPB	Fwd: TCA TGA TCC TTG ACG AGG TG Rev: GCC TGC ACA ATA GTC AGA ACC
XPC	Fwd: GGC TGA AAC TCC GCT ATG G Rev: AGA AGA GAG TCC GCC TCC A
XPD	Fwd: CCT ACT TCC TGG CTC GAT ACT C Rev: GGA TAC CAG GTC TGC GAT CTT
XPF	Fwd: GCA GAA AAT AAG GAG AGC GAA G Rev: ATC GCT TGC ACA GAT CAG C
XPG	Fwd: AGC ACC TGA ATG CCC ATC Rev: GAC TCT TTA TGA GTT TGG CAT CTT G

### 3.1.9 Versuchstiere

**Tierhaltung** Jegliche Mauslinien wurden unter spezifisch Pathogen freien Bedingungen in den institutseigenen Tierhäusern des Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung und des Life & Medical Sciences Institute gehalten. Für die Experimente dieser Arbeit wurden lediglich männliche Tiere verwendet, die ein Alter zwischen 8 und 14 Wochen aufwiesen. Alle Experimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt und unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt.

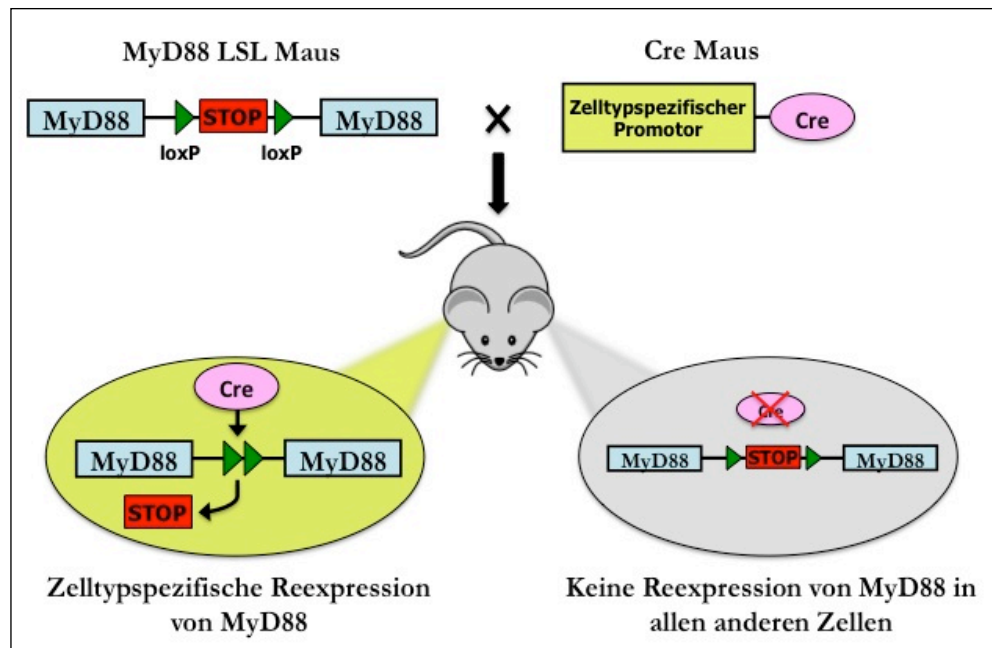
**Mausgenetik** Nachfolgend aufgeführte Mauslinien fanden in der vorliegenden Arbeit Verwendung und basieren auf dem genetischen Hintergrund des Laborstamms C57BL/6J:

- Wildtyp (WT)
- MyD88lox-stop-lox (MyD88LSL)(108)
- Keratin 5-Cre (K5Cre) (109)
- Lysozym M-Cre (LysMCre) (110)
- MyD88LSL x K5Cre
- MyD88LSL x LysMCre

Um die in der Arbeit zu erörternde Fragestellung nach der Rolle des Signaltransduktionsmoleküls MyD88 beantworten zu können, wurden Mäuse verwendet, bei denen eine loxP-flankierte Stop-Kassette eingefügt wurde und damit im ersten Intron des MyD88-Gens ein Transkriptionsstop ausgelöst wird. Befindet sich der Transkriptionsstop auf beiden Allelen des Chromosoms 9 wird in der Folge von MyD88-defizienten Mäusen gesprochen, deren Phänotyp dem einer *knock-out* Maus gleicht. Im Falle einer lediglich heterozygot vorliegenden Stop-Kassette konnte in Vorversuchen gezeigt werden, dass kein nennenswerter Unterschied zu WT-Mäusen besteht (unveröffentlichte Daten). Somit wurden diese als MyD88-profizient bezeichneten Mäuse als Wurfgeschwisterkontrollen in den einzelnen Experimenten herangezogen.

Um einen detaillierteren Einblick bezüglich der Rolle von MyD88 in einzelnen Zellpopulationen zu erlangen, wurden zudem K5Cre-Mäuse sowie LysMCre-Mäuse in den MyD88LSL-Stamm eingekreuzt. Die spezifisch in allen K5- bzw. Lysozym M-exprimierenden Zellen gebildete Cre-Rekombinase erkennt die

loxP-Bindungsstellen innerhalb des MyD88-Lokus und schneidet die Stop-Kassette entlang dieser Bindungsstellen heraus. Mit Hilfe der Einkreuzung dieser Cre-exprimierenden Mausstämmen wird zelltypspezifisch MyD88 in Keratinozyten respektive Granulozyten und Makrophagen reexprimiert, während alle anderen Zellen des Organismus weiterhin MyD88-defizient bleiben. Eine schematische Darstellung der Cre-induzierten Reexpression von MyD88 in spezifischen Zellpopulationen findet sich in Abbildung 3–1.



**Abbildung 3–1: Cre-induzierte Reexpression von MyD88**

Eine Einkreuzung Cre-exprimierender Mausstämmen in den MyD88LSL-Stamm ermöglicht einen zelltypspezifischen MyD88 *knock-in* in den Nachkommen durch Deletion der eingebrachten Stop-Kassette.

### 3.1.10 Software

- AxioVision Rel 4.8 Carl Zeiss AG, Oberkochen
- BZ-II Viewer/Analyzer Keyence, Essen
- CFX Manager™ Biorad, München
- FACSDiva™ BD Biosciences, Heidelberg
- FlowJo 7 TreeStar, Ashland, USA
- Gen5 Biotek Instruments, Bad Friedrichshall
- ImageJ National Institutes of Health, Bethesda, USA
- MS Office Paket 2008 Microsoft, Redmond, USA
- NanoDrop 1000 V3.8.1 Peqlab, Erlangen

- Odyssey Software 3.0      Li-Cor, Lincoln, USA
- Papers 2                      Mekentosj, Dordrecht ,Niederlande
- Prism 6                        GraphPad, La Jolla, USA
- Quantity One 1-D            Biorad, München

### 3.2 Methoden

#### 3.2.1 Primärzellkultur

Die für die Generierung von DZ sowie primären murinen Keratinozyten notwendigen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen aus Mausorganen isoliert. Die anschließende Kultivierung der gewonnenen Zellen erfolgte unter definierten Bedingungen in speziell hierfür vorgesehenen Brutschränken, die eine konstante Temperatur von 37°C und eine Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> aufwiesen.

##### 3.2.1.1 Generierung von ex vivo dendritischen Zellen

Für die Generierung von DZ wurden nach Tötung der Maus die Hinterbeine entfernt. Diese wurden im Anschluss von Haut, Muskeln und Sehnen befreit. Nach kurzer Desinfektion von *Femur* und *Tibia* in 70 % Ethanol wurden die Röhrenknochen unter der Sterilbank sowohl am oberen als auch am unteren Ende mit einer Schere geöffnet, so dass per Zentrifugation das Knochenmark aus den Röhrenknochen gewonnen werden konnte. Das auf diesem Wege erhaltene Knochenmark konnte nunmehr nach Aufnahme in RPMI 1640 Medium inklusive der genannten Zusätze und anschließender Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer in einer Konzentration von 5 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml Medium in 10 cm Petrischalen ausgesät und im Brutschrank kultiviert werden. Nach erneuter Zugabe von 10 ml supplementiertem Medium am 3. Tag wurden die unreifen DZ an Tag 6 aus den Petrischalen gespült und 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 2 ml Medium je well einer 6-well-Platte überführt. Die UVB-Bestrahlung der Zellen mit unterschiedlichen Dosen erfolgte in phosphatgepuffertes Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS). Nach der Bestrahlung wurden die Zellen wiederum in supplementiertes Medium jedoch ohne den Wachstumsfaktor GM-CSF überführt, um nach vier weiteren Stunden im Brutschrank aus den bestrahlten Zellen RNS für Analysen mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*real-time polymerase chain reaction*, q-PCR) zu gewinnen.

### 3.2.1.2 Generierung von ex vivo Keratinozyten

Für die Gewinnung epidermaler Keratinozyten wurden Mausohren verwendet. Nach kurzer Desinfektion der Ohren in 70 % Ethanol und einem anschließend erfolgten Waschen in PBS wurden die Ohren entlang des Ohrknorpels mit Pinzetten in ihren dorsalen und ventralen Teil getrennt. Die somit erhaltenen Ohrhälften wurden unmittelbar nach der Trennung auf einem 0,25 % Trypsin-EDTA-Gemisch für 2 h bei 37°C inkubiert, um einen Verdau der Basallamina zu erzielen. In Folge dessen konnte die Epidermis leicht von den dermalen Hautstrukturen separiert und mit Hilfe eines Stempels durch ein Zellsieb suspensiert werden. Die gewonnenen Einzelzellen wurden in MCDB 153 Basalmedium mit den entsprechenden Zusätzen überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer wurden hiernach  $2 \times 10^5$  Zellen pro 2 ml in im Vorfeld kollagenisierte 3 cm Petrischalen ausgesät und im Brutschrank kultiviert. Die Kollagenisierung der Petrischalen erfolgte durch Zugabe von 2 ml Kollagenlösung (0,5 mg/ml) für 20 min und anschließendem Absaugen der Kollagenlösung. Am 3. und 6. Tag wurde jeweils das Medium entfernt und gegen neues supplementiertes Medium ersetzt. Je nach Morphologie und Dichte der Zellen konnten die differenzierten Keratinozyten an Tag 7 oder 8 der Kultivierung mit verschiedenen Dosen UVB bestrahlt werden. Entsprechend den DZ erfolgte die Bestrahlung in PBS, um einen eventuellen Absorptionseinfluss des gefärbten Mediums auszuschließen. Für q-PCR Analysen wurden die Zellen 4 h nach der Bestrahlung geerntet, so dass sie im Anschluss für die RNS-Isolation lysiert werden konnten. Für Proteinanalysen hingegen wurden erst nach 20 h die Zellkulturüberstände entnommen und für weitere Analysen bei -20°C gelagert.

### 3.2.2 Histologische Verfahren und Färbungen

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten histologischen Färbungen wurden mit Hautpräparaten der murinen Rücken- oder Ohrhaut durchgeführt. Nach der Organentnahme wurden die Gewebe zeitnah in Einbettmedium eingefroren und bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden aus den eingebetteten Präparaten am Kryostat 10 µm dicke Querschnitte der Haut angefertigt, die nach Überführen auf Objektträger und anschließendem Trocknen 10 min in eiskaltem Aceton entwässert und fixiert wurden. Lediglich für die *Terminale desoxy-*

*nukleotidyltransferase mediated dUTP nick end label* (TUNEL)-Färbung erfolgte die Fixierung der Gewebepreparate in 4 % PFA für 15 min bei Raumtemperatur. Für eine weitere Lagerung wurden diese Objektträger mit 99 % Ethanol dehydriert. Zur weiteren Verwendung erfolgte eine kurze Rehydrierung der Gewebeschnitte in PBS, so dass im folgenden die histologischen Färbungen durchgeführt werden konnten.

**Toluidinfärbung** Die Toluidinfärbung stellt eine Übersichtsfärbung dar, mit der man insbesondere die Vesikel von Mastzellen deutlich sichtbar machen kann. Aufgrund von Metachromasie bedingt durch die dichten negativen Valenzen der Glykosaminoglykane erscheinen die Mastzellvesikel in einer violetten Farbe und können somit einfach von den übrigen orthochromatischen blauen Strukturen der Haut abgegrenzt werden.

Für die Färbung wurden die rehydratisierten Gewebeschnitte 10 min in 0,01 % Toluidinblau O-Lösung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit destilliertem Wasser für jeweils 5 min wurden die Objektträger getrocknet, ehe sie mit Euparal eingedeckelt wurden.

**HE-Färbung** Auch die Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung ermöglicht durch die Nutzung zweierlei verschiedener Farbstoffe eine Unterscheidung verschiedener Gewebe- und Zellstrukturen. Hierbei macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass vorwiegend saure (basophile) Strukturen durch das zu Hämalaun oxidierte Hämatoxylin blau erscheinen, während basische (acidophile) Gewebekomponenten durch Eosin rot gefärbt werden. Somit zeigt das mikroskopische Bild nukleinsäurehaltige Strukturen wie beispielsweise den Zellkern in einer tiefen Blaufärbung wohingegen Zytoplasma, Kollagen und Keratin in verschiedenen Rottönen gefärbt sind.

Zu Beginn der Färbung wurden die rehydrierten Gewebeschnitte für 10 min in Hämatoxylin Lösung modifiziert nach Gill gefärbt. Im Anschluss daran erfolgte nach kurzem Waschen mit Leitungswasser und Spülen in 70 % Ethanol mit 1 % HCl die Bläuung der Präparate für 10 min in Leitungswasser. Nach einem erneuten kurzen Spülschritt mit 70 % Ethanol erfolgte die Färbung mit Eosin Lösung für eine Minute. Zur Entwässerung wurden die Präparate zunächst in 95 % Ethanol und hiernach in 99 % Ethanol jeweils 2 min inkubiert, so dass sie nach Klärung in Xylol mit Euparal eingedeckelt werden konnten.

**Immunfluoreszenzfärbung** Mit der Immunfluoreszenzfärbung lassen sich im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Übersichtsfärbungen gezielt über Antikörper-Antigen Wechselwirkung Proteine detektieren. Hierbei werden fluoreszenzgekoppelte Antikörper genutzt, um eine spezifische Markierung der zu detektierenden Proteine (Antigene) sichtbar zu machen.

Um eine spezifische Färbung zu erhalten, wurden die rehydrierten Gewebepreparate für 1 h in Blockierungspuffer inkubiert. Hierdurch werden unspezifische Bindungsstellen besetzt, so dass keine unspezifische Bindung der Antikörper an diese möglich ist. Nach einem kurzen Waschschrift in PBS wurden 100 µl des 1:100 in PBS verdünnten fluoreszenzgekoppelten Antikörpers auf jeden Schnitt verteilt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Wurden hingegen Kombinationen aus Primärantikörper und fluoreszenzgekoppeltem Sekundärantikörper genutzt, so wurde der Primärantikörper ebenfalls über Nacht inkubiert, während nach dreimaligem Waschen der Sekundärantikörper lediglich 1-2 h auf den Schnitten verblieb. Im Anschluss erfolgten drei Waschschrift mit PBS und nachfolgend einer mit destilliertem Wasser für jeweils 5 min, so dass die Schnitte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-haltigem Einbettmedium eingedeckelt und nach Aushärtung am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden konnten.

**TUNEL-Färbung** Die TUNEL-Färbung stellt eine spezielle Methode dar, um apoptotische Zellen fluoreszenzmikroskopisch zu identifizieren. In der apoptotischen Zelle wird - neben vielfachen weiteren zellulären Abbauprozessen - die nukleäre DNS initiiert durch Endonukleasen fragmentiert. Die dabei entstehenden freien Hydroxylgruppen werden durch die terminale Desoxyribonukleotidyltransferase erkannt und somit mit Fluorescein-markierten Nukleotide gelabelt, so dass apoptotische Zellen im Gewebeverband klar identifizierbar sind.

Für die Durchführung der TUNEL-Färbung wurde ein spezielles Apoptosedetektionskit der Firma Roche genutzt. Die in PBS rehydrierten und vor der Lagerung fixierten Gewebepreparate wurden zunächst für 2 min auf Eis mit Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem unmittelbar vorher präparierten Gemisch aus Enzym und Fluorescein-markierten Nukleotiden für 60 min in einer feuchten Kammer. Erneutes Waschen mit PBS und anschließendes Eindeckeln mit Euparal er-

möglichte die direkte Analyse der Gewebepräparate unter dem Fluoreszenzmikroskop. Zusätzlich wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die Positivkontrolle wurde vor der Inkubation zur Induktion von DNS-Strangbrüchen für 10 min mit 500 U/ml DNase I behandelt. Für die Negativkontrolle erfolgte die Inkubation lediglich mit Fluorescein-markierten Nukleotiden jedoch ohne die reaktionskatalysierende terminale Desoxyribonukleotidyltransferase.

### 3.2.3 q-PCR

Die q-PCR ist ein Verfahren, welches neben der Amplifikation von DNS-Fragmenten und somit dem qualitativen Nachweis auch eine Quantifizierung ebendieser ermöglicht. Hierdurch kombiniert die q-PCR sowohl die Vervielfältigung von Nukleinsäuren als auch ihre Detektion in einem Schritt. Die gängigste Möglichkeit eines quantitativen Nachweises liegt in der Nutzung des Cyanin-Farbstoffs Sybr® Green. Dieser interkaliert vorwiegend in doppelsträngige DNS und emittiert nur in der gebundenen Form nach Anregung grüne Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 521 nm. Die detektierte Fluoreszenzintensität verhält sich proportional zur Menge doppelsträngiger DNS und gibt so Aufschluss über die Quantität amplifizierter DNS-Fragmente.

Bevor die q-PCR durchgeführt werden konnte, musste aus den generierten Zellen bzw. dem verwendeten Hautgewebe RNS isoliert und diese in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben werden. Die RNS-Isolation aus DZ oder Keratinozyten konnte direkt nach Abkratzen der Zellen aus den Gewebekulturschalen mit Hilfe des RNS-Isolationskits der Firma Zymo erfolgen. Für die Isolierung der RNS aus Hautgewebe wurden 25-30 g der in RNAlater gelagerten Proben abgewogen, mit einer Skalpelklinge zerkleinert und in dem vom Hersteller Qiagen empfohlenen Puffer homogenisiert. Die Homogenisation erfolgte mit Glaskugeln im Precelly's® Homogenisator bei 6500 rpm 3 x 25 s. Die weitere Isolierung wurde entsprechend den Instruktionen des jeweiligen Herstellers durchgeführt und die RNS Konzentration per Nanodropmessung bestimmt.

Das Umschreiben der isolierten RNS in den komplementären DNS Strang wurde mit Hilfe einer viralen Transkriptase durchgeführt. Pro Ansatz wurden 2 µg RNS ad. 22,4 µl RNase freies Wasser und 2 µl Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer für



10 min bei 70°C im Thermocycler inkubiert, um eventuell gebildete RNS-Dimere zu trennen und eine Anlagerung der Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer zu gewährleisten. Im Anschluss wurden 17,6 µl des in Tabelle 3–4 dargestellten Mastermix zugegeben, um das Umschreiben für 60 min bei 42°C einzuleiten.

**Tabelle 3–4:** 1 x Ansatz für die cDNS Synthese

8,0 µl RT-Puffer
4,0 µl DTT (100 mM)
4,0 µl dNTP (10 mM)
0,8 µl RNase Inhibitor
0,8 µl Reverse Transkriptase

Für die nachfolgende q-PCR wurden je Ansatz 5 µl der 1:10 verdünnten cDNS mit 7,5 µl Sybr®Green, 2,1 µl Wasser und 0,2 µl je Primer (10 µM) vermischt und eingesetzt. Folgende Bedingungen wurden für die q-PCR genutzt:

- **Aktivierung der Polymerase:**

95°C 15 min

- **Amplifikation:**

95°C 20 s

60°C 40 s (40 Zyklen)

- **Schmelzkurvenanalyse:**

Temperaturerhöhung von 65°C auf 95°C um 0,5°C alle 5 Sekunden

Die relative Quantifizierung und Berechnung der x-fachen Induktion der Gene wurde nach der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode wie folgt bestimmt, wobei die Normalisierung mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen erfolgte:

1.  $\Delta C_t = C_t (\text{Zielgen}) - C_t (\text{Referenzgen})$
2.  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{Behandlung}) - \Delta C_t (\text{Kontrolle})$
3. x-fache Induktion =  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ .

### 3.2.4 ELISA

Der *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) beschreibt ein sehr sensitives immunologisches Verfahren, welches auf der Reaktion von Antikörpern mit einem Antigen beruht. Aufgrund dieser spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion können lösliche Probenbestandteile detektiert und über entsprechende Kalibrierungsreihen quantifiziert werden.

Alle in der vorliegenden Arbeit genutzten ELISA-Verfahren basieren auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Hierbei wird zunächst ein Fängerantikörper an

das Trägermaterial gebunden. Das in der Probenlösung befindliche Antigen kann somit an den Fängerantikörper binden. Die Detektion des Antigens erfolgt mit einem meist Peroxidase-gekoppeltem Antikörper. Grundvoraussetzung für die Funktionsfähigkeit des ELISA sind unterschiedliche Epitopspezifitäten des Fänger- und des enzymmarkierten Detektionsantikörpers.

Für die Bestimmung von Proteinen in Hautgewebe musste im Vorfeld der Analysen ein Lysat generiert werden. Hierfür wurden 50-60 mg der in RNA-Later gelagerten Haut, nach Abkratzen des subkutanen Fettgewebes, mit einer Skalpellklinge zerkleinert und in ein mit Glasperlen befülltes Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 700 µl Ripa-Puffer mit Proteaseinhibitor wurde die Haut im Homogenisator bei 6500 rpm 3 x 25 s lysiert und anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren. Darauf folgendes Auftauen im Wasserbad und Abzentrifugieren der nicht gelösten Bestandteile bei 13.000 rpm für 15 min führten zur Gewinnung des Proteinlysates. Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden mittels Nanodropmessung bestimmt.

Für die durchgeführten Analysen wurden die ELISA Mikrotiterplatten mit dem proteinspezifischen jeweiligen Fängerantikörper beschichtet und bei 37°C für 2 h inkubiert. Nach Entfernen des überschüssigen Antikörpers durch mehrfaches Waschen der ELISA-Platten mit ELISA-Waschpuffer wurden die unspezifischen Bindungsstellen des Fängerantikörpers für 1 h mit Blockierungspuffer bestehend aus 1 % BSA in PBS gesättigt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde - neben einer proteinspezifischen Standardreihe und einer Negativprobe bestehend aus PBS - der Zellüberstand von Keratinozyten bzw. das hergestellte Proteinlysate aus Hautgewebe in geeigneter Verdünnung auf die Platte aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Alle nicht gebundenen Probenbestandteile konnten am nächsten Tag durch dreimaliges Waschen entfernt werden. In der Folge wurde der gegen ein zweites Epitop des Proteins gerichtete Biotin-gekoppelte Detektionsantikörper für 1-2 h zugegeben, der nach wiederholtem Waschen mit einem Streptavidin-Merrettichperoxidase-Komplex markiert werden konnte. Nach letztmaligem Waschen wurde durch die Zugabe von 50 µl TMB-Substrat eine Peroxidase-induzierte Farbreaktion eingeleitet, die bei ausreichender Blaufärbung der Kalibrierungsreihe mit 25 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) abgestoppt wurde. Die Absorptionsmessung erfolgte unmittelbar im Anschluss photometrisch bei 450 nm und 630 nm (Referenzwellenlänge),

so dass die Proteinkonzentration der Probe anhand der Kalibrierungsgeraden absolut quantifiziert werden konnte.

### 3.2.5 Durchflusszytometrie

Das *Fluorescence activated cell sorting*, kurz FACS, wird häufig für eingehende Untersuchung und Charakterisierung von Einzelzellsuspensionen verwendet. Hierbei können aufgrund des hohen Leistungsvermögens eines Durchflusszytomers von bis zu 20.000 Zellen pro Sekunde innerhalb kurzer Zeit vielfache Informationen über die quantitative Zusammensetzung von Zellpopulationen aus Organen sowie Expressionsstärke und -dichte von einzelnen Antigenen gewonnen werden. Grundlage von FACS-Analysen stellen Reaktionen von fluoreszenzmarkierten Antikörpern mit Antigenen der Zelle dar. Nach Inkubation der Einzelzellsuspension mit den spezifischen Antikörpern werden die Zellen hydrodynamisch durch eine feine Kapillare gesaugt, durch den Flüssigkeitsstrom vereinzelt und passieren in der Durchflusszelle einzeln einen Laserstrahl. Anhand des Streulichts können erste Rückschlüsse über Granularität und Größe der Zellen gewonnen werden. Gleichzeitig lassen sich verschiedene Zellpopulationen, die mit fluoreszierenden Antikörpern gegen zellspezifische Proteine markiert wurden, über das emittierte Fluoreszenzsignal nachweisen und voneinander abgrenzen.

*Ex vivo* generierte Zellen konnten direkt nach der Kultivierung und Behandlung zur Antikörperfärbung herangezogen werden. Im Vorfeld der FACS-Analysen des Blutes erfolgte unmittelbar nach Blutabnahme durch Punktion der *vena fascialis* eine Vermischung des Blutes mit Heparin zu gleichen Anteilen, um eine Gerinnung der gewonnenen Proben zu unterbinden. Anschließend wurden 100 µl des Blut-Heparin-Gemisches in FACS-Röhrchen überführt und bei 1200 rpm 5 min zentrifugiert, um die Blutzellen zu pelletieren. Um die zahlreich vorhandenen Erythrozyten zu lysieren und zu eliminieren, wurden die Proben 5-6 min mit 2 ml ACT versetzt und anschließend abzentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen mit 50 µl der entsprechenden Antikörpergemische 45 min gefärbt und konnten nach Abzentrifugieren der nicht gebundenen Antikörper analysiert werden. Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Lunge sowie der hautdrainierenden brachialen Lymphknoten musste zuallererst eine Einzelzellsuspension herge-

stellt werden. Hierfür wurden die mit 10 ml PBS perfundierten und präparierten Lungen sowie die brachialen Lymphknoten nach vorheriger mechanischer Zerkleinerung in PBS versetzt mit 1 mg/ml Kollagenase D und 500 U/ml DNase im Falle der Lunge für 90 min bzw. bei den Lymphknoten lediglich 15 min inkubiert. Die Suspensionen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt und in PBS aufgenommen. Nach Pelletieren der Lungenzellen respektive Lymphknotenzellen in FACS-Röhrchen wurde die Zellfärbung analog den Blutanalysen durchgeführt. War eine Messung der Proben am selben Tag nicht möglich, wurde eine Fixierung der Zellen mit 1 % PFA in PBS vorgenommen, um eine Lagerung bei 4°C bis zum nächsten Tag zu gewährleisten.

### 3.2.6 Western blot

*Western blot* bezeichnet ein Verfahren, welches vorwiegend einen qualitativen Nachweis von Proteinen nach Übertragung auf eine Trägermembran gewährleistet. Diese Proteine können nach Übertragung auf die Membran, anschließender Antikörperinkubation und einer geeigneten Visualisierungsmethode nachgewiesen werden. Für die Durchführung eines *Western blot* ist die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe notwendig. Hierbei wird die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet, bei der die Proteine je nach Größe in einem Polyacrylamidgel, angeschlossen an ein elektrisches Feld, unterschiedlich weit laufen. In einem weiteren Schritt werden die aufgetrennten Proteinbanden ebenfalls mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf die Trägermembran transferiert.

Die *Western blots* wurden sowohl mit Hautlysaten als auch mit *ex vivo* generierten Zellen durchgeführt. Die Herstellung der Proteinlysate aus der Haut erfolgte analog zu der im Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Methode. Für die Proteinisolation aus Zellen wurden diese nach pelletieren mit 200 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Der bei 1200 rpm abzentrifugierte Überstand wurde nach Messung der Proteinkonzentration via Nanodrop für die weiteren Analysen herangezogen.

Für die Proteinauftrennung der Lysate mittels SDS-PAGE wurden die Proben im ersten Schritt mit PBS auf vergleichbare Konzentrationen eingestellt und im Verhältnis 5:1 mit Laemmli Puffer 5x suspendiert. Nach fünfminütiger Inkuba-

tion der Proben bei 95°C wurden 20 µl der Proteinlysate in die Taschen des Polyacrylamidgels pipettiert. Zudem wurde zur Identifikation der Proteingröße eine Tasche mit dem Proteinstandard befüllt. Nach Überführen des Gels in die Gelelektrophoresekammer und dem Anschluss der Kammer an das elektrische Feld erfolgte die Trennung des Proteingemischs bei 100 mV bis eine gut sichtbare Auftrennung des Standards erkennbar war. Das Transferieren der Proteinbanden auf die Nitrocellulosemembran wurde ebenfalls elektrophoretisch mit einer speziellen Blotting Apparatur durchgeführt. Beim sogenannten *semi-dry blot* wurde das Gel hierfür auf die Membran überführt und zwischen je zwei Lagen mit Blottingpuffer durchtränktem *Whatman* Papier platziert. Nach Anlegen einer Spannung von 90 mA pro Gel für 1,5 h wurden die Proteinbanden durch ein senkrecht zur Laufrichtung des Gels fließendes elektrisches Feld auf die Membran übertragen. Nach Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen mit Blockierungspuffer für eine Stunde erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für mindestens zwei Stunden, welcher spezifisch gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist. Hiernach wurde durch dreimaliges Waschen der Membran für je 5 min mit TBS-T der nicht gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Der Nachweis des Primärantikörpers erfolgt mit einem fluoreszierenden Antikörperkonjugat. Das gegen die Spezies, aus der der Primärantikörper gewonnen wurde, gerichtete Konjugat wurde 45 min mit der Membran inkubiert und im Anschluss erneut 3x mit TBS-T gewaschen. Der Nachweis des Fluoreszenzsignals und die Aufnahme der Membran erfolgten am Infrarot-Imager. Als Positivkontrolle wurde GAPDH genutzt. Je nach Größe des zu detektierenden Proteins konnte die Inkubation des GAPDH-Antikörpers entweder zeitgleich mit dem Primärantikörper gegen das gesuchte Protein erfolgen oder musste nach Entfernen der Antikörper mit Stripping Puffer entsprechend den vorherigen Ausführungen in einer separaten Analyse durchgeführt und detektiert werden.

### 3.2.7 Southwestern blot

Das *Southwestern blotting* kombiniert zwei wichtige molekularbiologische Verfahren: *Western blot* und *Southern blot*. Mit ihm können DNS-Fragmente mittels Antikörper detektiert werden und geben somit Aufschluss über bestimmte Strukturveränderungen oder Schäden der DNS.

Für den Nachweis von DNS-Schäden in Form von CPD mittels *Southwestern blot* wurden zu verschiedenen definierten Zeitpunkten nach einmaliger UVB-Bestrahlung die Versuchstiere mit CO<sub>2</sub>-Überdosierung getötet und ein 1 cm<sup>2</sup> großes Stück Rückenhaut entnommen, in RNAlater überführt und bei -80°C gelagert. Die DNS wurde mit dem DNS-Isolationskit der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers extrahiert. Die Quantifizierung der DNS erfolgte photometrisch mittels Nanodropmessung. Anhand der ermittelten DNS Konzentrationen konnten je 1 µg der Proben-DNS in T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-Puffer gelöst werden, die im Wasserbad 5 min bei 100°C erhitzt wurden, um eine Denaturierung der DNS zu gewährleisten. Die denaturierte DNS konnte nun nach schnellem Abkühlen in Eiswasser mittels einer Slot Blot-Apparatur auf eine durch Wässerung aktivierte positiv geladene Nylonmembran transferiert werden. Für eine weitere Denaturierung und Trennung der komplementären DNS-Stränge wurde die Membran für 1 h auf ein mit 0,4 M NaOH getränktes *Whatman* Papier überführt. Nach Blocken der unspezifischen Bindungen mit Blockierungspuffer erfolgte die Inkubation mit dem 1:2500 in Blockierungspuffer verdünnten Anti-Thymindimer Antikörper bei 4°C für mindestens 8 h. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Nylonmembran mit dem Peroxidase gekoppeltem IgG Sekundärantikörper (1:5000 in Blockierungspuffer) 1-2 h inkubiert. Gefolgt von erneutem dreimaligem Waschen konnte die Membran nach kurzer Inkubation mit der Detektionsreagenz am Biorad Imager belichtet und aufgenommen werden.

Der für die relative Quantifizierung notwendige DNS-Abgleich erfolgte nach Entfernung der membrangebundenen Antikörper mit Stripping Puffer analog zu den vorherigen Ausführungen. Als Erstantikörper wurde ein Anti-DNS Antikörper (1:1000 in Blockierungspuffer) genutzt, der mittels Peroxidase gekoppeltem IgM Antikörper (1:5000 in Blockierungspuffer) detektiert und nach dem Entwickeln sichtbar gemacht werden konnte.

Die Quantifizierung der erhaltenen Banden wurde anhand einer absoluten Dichtemessung mit der Software ImageJ durchgeführt. Zur Berechnung des relativen Dichtewertes mit Bezug zur detektierten DNS-Menge wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Relativer Dichtewert (Probe)} = \frac{\text{Dichtemessung (CBPD)}}{\text{Dichtemessung (DNS)}}$$

### 3.2.8 Bestimmung der Myeloperoxidase Aktivität

Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, welches hauptsächlich in aktivierten neutrophilen Granulozyten – ferner auch in Monozyten und einigen Gewebemakrophagen - vorkommt und in Neutrophilen bis zu 5 % des Gesamtproteingehalts ausmachen kann. Die zugrundeliegende MPO-katalysierte Enzymreaktion ist eine Oxidation von Chloridionen ( $\text{Cl}^-$ ) zu Hypochlorid ( $\text{OCl}^-$ ), bei der Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) als Oxidationsmittel dient. Anhand der MPO-Aktivität lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl aktivierter neutrophiler Granulozyten in den untersuchten Geweben ziehen. Die Bestimmung der Aktivität der Myeloperoxidase erfolgt anhand einer MPO-katalysierten Farbreaktion, so dass mittels einer Standardreihe die Konzentration der Myeloperoxidase in der Gewebeprobe bestimmt werden kann.

Die MPO-Aktivität wurde sowohl in Lungengewebe als auch in Haut analysiert. Hierfür wurden 15-25 mg des jeweiligen Gewebes unmittelbar nach der Entnahme zerschnitten und in ein mit Glaskugeln und 300  $\mu\text{l}$  HATAB-Puffer befülltes Schraubgefäß überführt. Im Anschluss wurde das Gewebe im Homogenisator bei 6500 rpm 3 x 25 s homogenisiert und hiernach in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach direktem Auftauen bei 55°C im Wasserbad und Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 15 min wurde das Zelllysate in neue Eppis pipettiert, die Proteinkonzentration per Nanodrop bestimmt und für weitere Analysen verwendet. Hierfür wurde das Lungenlysate 1:10 in HATAB-Puffer vorverdünnt, während die Hautlysate unverdünnt eingesetzt wurden. Neben der MPO-Standardreihe isoliert aus humanen Leukozyten mit einer Ausgangskonzentration von 1 U/ml wurden je 100  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Lyrate sowie eine Negativkontrolle bestehend aus HATAB-Puffer auf eine 96-well Platte aufgetragen. In der Folge konnte die Farbentwicklung mit TMB-Substrat eingeleitet und bei ausreichender Blaufärbung der Standardreihe mit 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 M) abgestoppt werden. Die Absorption wurde bei 450 nm und 630 nm photometrisch bestimmt, so dass die Konzentration der Proben anhand der Standardreihe mit Bezug zur Proteinmenge berechnet werden konnte.

### 3.2.9 Melaninbestimmung

Die in der Basalschicht der Epidermis befindlichen Melanozyten sind in der Lage durch die Produktion von Melanin benachbarte Keratinozyten vor nu-

kleären UV-induzierten Schädigungen zu schützen. Hierbei wird Melanin über Zytoplasma-Verzweigungen in Form von Melanosomen in die umliegenden Keratinozyten geschleust. Das nun in den Keratinozyten befindliche Melanin kann sich zum Schutz der DNS um die Zellkerne formieren und dort die in der UV-Strahlung befindliche Energie durch Streuung und Absorption mindern.

Für die Melaninbestimmung wurden beide Ohren der Maus in 500 µl Lysepuffer über Nacht bei 56°C verdaut. Im Anschluß wurden die Lysate durch ein 70 µm Zellsieb gedrückt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 14.000 rpm wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 400 µl Dimethylsulfoxid-Lösung resuspendiert und für 2 h bei 70°C inkubiert. Im Rahmen einer Doppelbestimmung wurde die Absorption von je 150 µl des aufbereiteten Probenmaterials im Mikroplatten-Photometer bei 335 und 405 nm bestimmt. Als Referenzwellenlänge wurden 630 nm gewählt.

### 3.2.10 Genotypisierung der Mauslinien

Die Genotypisierung der Versuchsmäuse wurde mittels PCR durchgeführt. Die hierfür präparierten Schwanzbiopsien der Mäuse wurden über Nacht bei 56°C in 500 µl Lysepuffer verdaut. Am Folgetag wurden unverdaute Probenbestandteile durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß geschüttet. Nach Gabe von 500 µl Isopropanol und Fällung der DNS durch Invertierung erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibende DNS nochmals mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min wurde der Überstand erneut vollständig durch vorsichtiges Absaugen entfernt. Die verbleibende pelletierte DNS wurde in 200 µl T<sub>10</sub>E<sub>1</sub>-Puffer verdünnt. Nach einstündiger Inkubation bei 40°C zur besseren Löslichkeit konnte die DNS zur PCR-Analyse eingesetzt werden.

Der für die Genotypisierung der Mäuse notwendige PCR-Ansatz ist in Tabelle 3–5 beschrieben. Die verschiedenen PCR-Programme sowie die Primersequenzen finden sich in Tabelle 3–6 und Tabelle 3–7. Die Produkte der PCR, eine 100bp Leiter und entsprechende Positivkontrollen

**Tabelle 3–5:** 1 x Ansatz für die Typisierungs-PCR

4,0 µl MyTaq Puffer
0,7 µl Fwd. Primer
0,7 µl Rev. Primer
0,05 µl MyTaq Polymerase
13,05 µl Aqua dest.
1,5 µl DNS



wurden im Anschluss an die PCR in die Taschen eines Agarose-Gels (2 % Agarose in TAE-Puffer) pipettiert, welches mit dem in die DNS interkalierenden Farbstoff SybrSafe versetzt war. Die DNS-Banden konnten nach Auftrennung des Gels in der Elektrophoresekammer mittels UV-Licht detektiert und für die weitere Auswertung fotografiert werden.

**Tabelle 3–6:** Primersequenzen für die Genotypisierung

Gen	Allel	Primersequenz (5' → 3'-Richtung)
MyD88LSL	WT	Fwd: ACA CTG TAG CTG CCT GCA GAC ACA C Rev: GGA CTC CTG GTT CTG CTG CTT ACC T
	LSL	Fwd: CTA GCC TTG GCA TAT TAA TCT TG Rev: CTG AAG AGG AGT TTA CGT CCA G
LysMCre	WT	Fwd: CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC Rev: TTA CAG TCG GCC AGG CTG AC
	ko	Fwd: CTT GGG CTG CCA GAA TTT CTC Rev: CCC AGA AAT GCC AGA TTA CG
K5Cre		Fwd: ATG CCA ATG CCC CCT CAG TTC CT Rev: TGC CCC TTT TTA TCC CTT CCA GA

**Tabelle 3–7:** PCR-Programme für die Genotypisierung

		Denaturation	Melting	Annealing	Elongation
MyD88LSL	WT	5 min 94°C	30 sec 94°C	30 sec 62°C	60 sec 72°C
	LSL	5 min 94°C	30 sec 94°C	45 sec 60°C	75 sec 72°C
LysMCre	WT	5 min 94°C	60 sec 94°C	60 sec 62°C	60 sec 72°C
	ko	5 min 94°C	60 sec 94°C	60 sec 62°C	60 sec 72°C
K5Cre		5 min 94°C	30 sec 94°C	40 sec 62°C	60 sec 72°C

### 3.2.11 UVB-Bestrahlung

Die für alle *in vivo* Experimente sowie für die Bestrahlung der DZ genutzten UVB-Lampen (TL 20W/12 RS) wurden von der Firma Philips bezogen. Ihr Emissionsmaximum liegt bei 313 nm. Lediglich für die Bestrahlung der Keratinozyten wurde aus Gründen der Mobilität der Lampe eine Handlampe (PL-S 9W/01/2P 1CT) mit einem Emissionsmaximum von 311 nm verwendet. Die UVB-Strahlung der verschiedenen Lampen wurde mit einem UV-Meter der Firma Waldmann ermittelt.

Soweit nicht anders angegeben wurden für die *in vivo* Analysen die Versuchstiere einmalig durch intraperitoneale Injektion von 200 µl eines Rompun/Ketanest-Gemisches gelöst in physiologischer Kochsalzlösung narkotisiert und großflächig am Rücken rasiert. Anschließend erfolgte an zwei aufein-

anderfolgenden Tagen im Abstand von 24 h jeweils eine Bestrahlung mit 178,5 mJ/cm<sup>2</sup>. Nach weiteren 20 h wurden die Tiere per zervikaler Dislokation getötet und die relevanten Organe entnommen. Einzig die Bestrahlung für die Analysen zum DNS-Schaden wurde einmalig durchgeführt. Die *ex vivo* generierten DZ wurden nach Austausch des Kulturmediums durch PBS einmalig mit 10, 20 und 30 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Keratinozyten wurden - ebenfalls in PBS - mit Strahlungsdosen von 10 und 30 mJ/cm<sup>2</sup> behandelt.

### 3.2.12 Statistische Auswertung

Die graphische sowie statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mithilfe der Software GraphPad Prism 6 durchgeführt. Die Berechnung der Signifikanzniveaus wurde, bei Annahme einer Normalverteilung, unter Verwendung des Student'schen t-Tests bestimmt. Unterschiede, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ergaben, wurden als statistisch signifikant gewertet. Falls nicht anders deklariert werden in dieser Arbeit drei Signifikanzniveaus mit verschiedener Anzahl an Sternchen unterschieden:

$$p < 0,05 (*); p < 0,01 (**); p < 0,001 (***)$$

Berechnungen, die eine Irrtumswahrscheinlichkeit größer als 5 % aufwiesen, wurden als nicht signifikant titulierte. Der Standardfehler wurde als Streuungsmaß in die Abbildungen integriert.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Funktion von MyD88 bei der akuten UVB-induzierten Entzündungsreaktion

Eine zu intensive UVB-Strahlung führt zu akuten Entzündungsreaktionen der Haut (111). Solch eine Entzündungsreaktion ist gekennzeichnet durch eine erhöhte Expression verschiedener Zytokine und Chemokine (72, 73) sowie einer verstärkten Synthese von Adhäsionsmolekülen für eine verbesserte Rekrutierung und Infiltration von weiteren Entzündungszellen in die geschädigten Hautareale (82). Welche genauen Prozesse diese Immunreaktion hervorrufen, konnte jedoch bis heute nicht im Detail geklärt werden. Eine maßgebliche Rolle bei der Erkennung von endogenen Gefahrensignalen und der daraus resultierenden Expression proinflammatorischer Zytokine nimmt das TLR-System mit seinem zentralen Adaptorprotein MyD88 ein (18). In diesem Abschnitt soll vordergründig erörtert werden, ob UVB-Strahlung als endogenes Gefahrensignal fungiert und welchen Beitrag MyD88 bei der UVB-induzierten Aktivierung des Immunsystems besitzt. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden MyD88-profiziente und MyD88-defiziente Mäuse sowie Mäuse, die durch Cre-induzierte Reexpression MyD88 spezifisch in Keratinozyten (siehe Abschnitt 4.2) oder Makrophagen und Granulozyten (108) exprimieren, *in vivo* nach UVB-Bestrahlung hinsichtlich der Zytokinexpression und der Infiltration von Entzündungszellen verglichen.

#### 4.1.1 Expression von Zytokinen in bestrahlter Rückenhaut

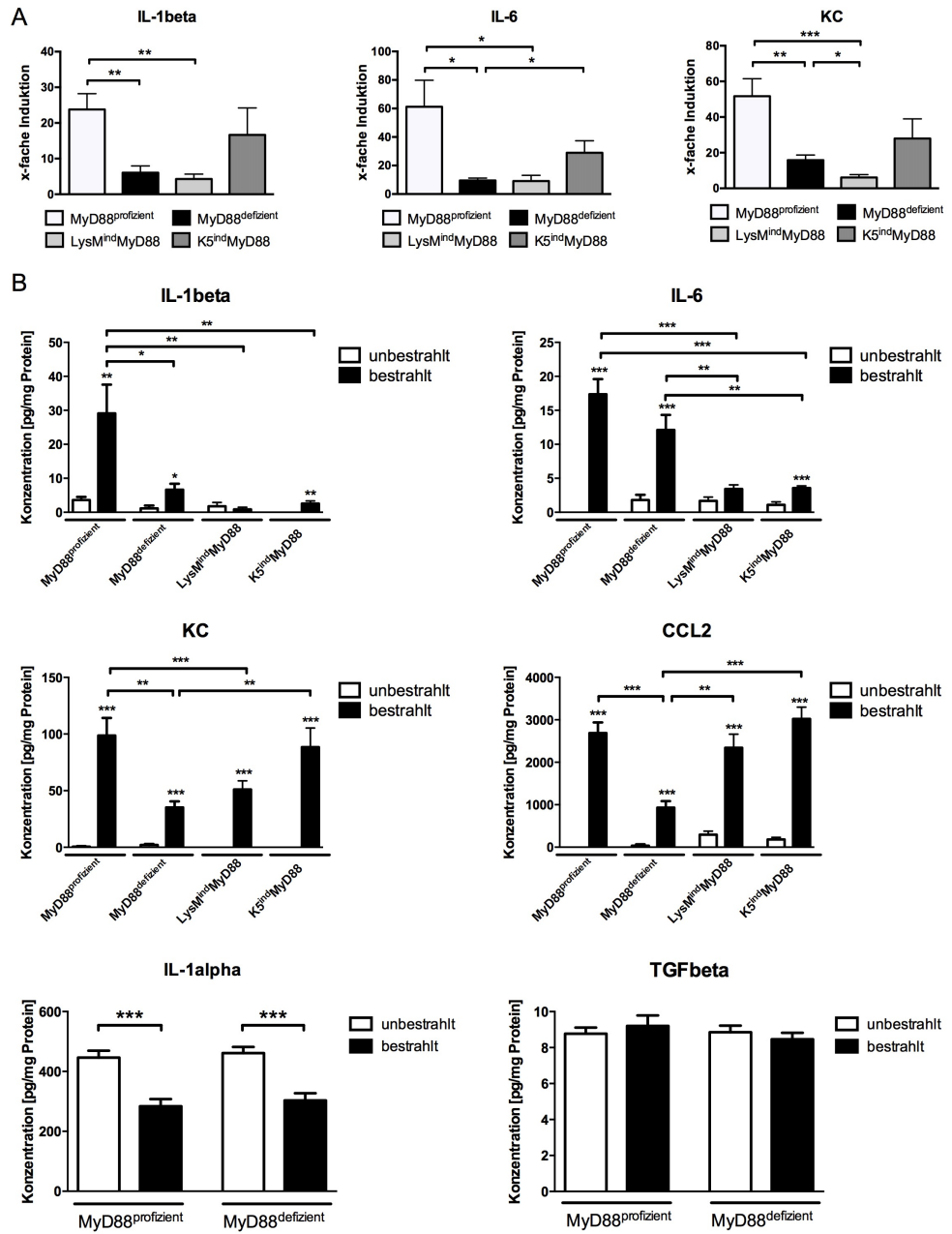
Um einen Überblick zu erlangen, welche Entzündungsmediatoren in der Haut MyD88-abhängig nach UVB-Bestrahlung induziert oder verstärkt exprimiert werden, wurden sowohl q-PCR Analysen als auch Messungen der Proteinkonzentration verschiedener Mediatoren in muriner Rückenhaut vorgenommen. Für diese Untersuchungen wurde vorerst die rasierte Rückenhaut von WT-Mäusen einmalig mit  $200 \text{ mJ/cm}^2$  UVB-Strahlung behandelt. Diese literaturbasierte akute Bestrahlungsdosis (112) zeigte in den Vorversuchen keine nennenswerte Entzündungsreaktion. Durch Erhöhung der Gesamtbestrahlungsdosis auf je  $178,5 \text{ mJ/cm}^2$  an zwei aufeinanderfolgenden Tagen konnten hingegen Entzündungsmarker in der Haut detektiert werden, so dass dieses Bestrahlungsprotokoll *in vivo* Grundlage der vorliegenden Arbeit wurde. Für die

weiteren nachfolgend aufgeführten Expressionsanalysen wurde die murine Rückenhaut von MyD88-defizienten Mäusen und ihrer profizienten Wurfgeschwister sowie von LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen 20 h nach der zweiten Bestrahlung entnommen. Im Anschluß erfolgte zum einen eine Isolierung der mRNA aus den gewonnenen Hautstücken und zum anderen wurde ein Proteinlysate aus der bestrahlten Rückenhaut sowie den unbestrahlten Kontrolltieren aller verwendeter Mauslinien hergestellt.

Abbildung 4–1A zeigt die Expression der mRNA dreier wichtiger proinflammatorischer Entzündungsmediatoren berechnet als x-fache Induktion mit Bezug zur jeweiligen Genotypkontrolle. Sowohl IL-1beta als auch IL-6 und KC, das murine Homolog des humanen IL-8, zeigten in ihrem Expressionsverhalten eine Abhängigkeit von MyD88. Während UVB-Bestrahlung in MyD88-profizienten Mäusen eine starke Induktion aller drei Zytokine hervorrief, war diese in den MyD88-defizienten Versuchstieren lediglich marginal ausgeprägt und im Vergleich zu den profizienten Wurfgeschwistern signifikant vermindert. Auch die Ergebnisse der Zytokinexpression in den induzierten Mausstämmen zeigten ein einheitliches Induktionsmuster. Kam es durch MyD88-Reexpression in Makrophagen und Neutrophilen zu keiner Induktion von IL-1beta, IL-6 und KC, so konnte durch MyD88-Signaltransduktion in Keratinozyten eine deutlich verstärkte UVB-induzierte Zytokinexpression beobachtet werden.

Um nachfolgend die in den q-PCR-Analysen erhaltenen Daten zu verifizieren und zudem durch die Untersuchung weiterer Zytokine die Entzündungsreaktion näher zu charakterisieren, wurden mittels ELISA die Proteinkonzentrationen verschiedener in Abbildung 4–1B aufgeführter Mediatoren in den Hautlysaten bestimmt. In der bestrahlten Maushaut MyD88-profizienter Tiere zeigte sich - analog zu den Ergebnissen der q-PCR-Analysen - eine starke und im Vergleich zu den defizienten Tieren signifikant erhöhte Induktion der Proteine IL-1beta und IL-6. Entsprechend den q-PCR-Analysen ist die MyD88-abhängige Signaltransduktion in Makrophagen und Neutrophilen nicht für die Expression von IL-1beta und IL-6 nach UVB-Bestrahlung verantwortlich. Auch durch Reexpression von MyD88 in Keratinozyten zeigten beide Zytokine nach UVB-Bestrahlung keine stärkere Induktion als in komplett defizienten Mäusen. Demzufolge müssen andere immunkompetente Zellen der Haut, wie

etwa Fibroblasten oder Mastzellen, für die Synthese von IL-1beta und IL-6 nach UVB-Bestrahlung verantwortlich sein.



**Abbildung 4-1: Expression proinflammatorischer Entzündungsmediatoren in muriner Rückenhaut nach UVB-Bestrahlung**

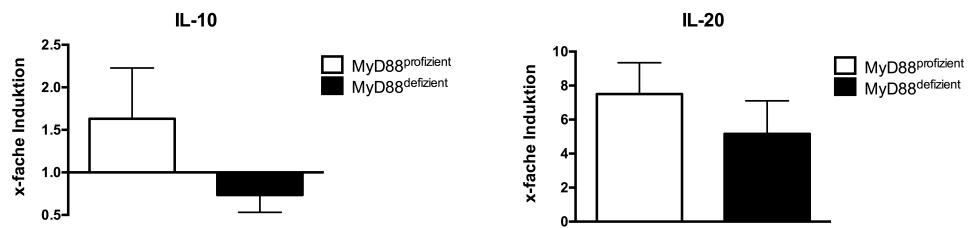
Für die dargestellten Expressionsanalysen wurden MyD88-profiziente, MyD88-defiziente, LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Als Kontrollen fanden unbestrahlte Mäuse der entsprechenden Genotypen Verwendung. 20 h nach der zweiten Bestrahlung wurde aus den unbestrahlten und bestrahlten Hautarealen der Rückenhaut sowohl RNS isoliert als auch Proteinlysate hergestellt. Die Diagramme in (A) zeigen die mittels q-PCR analysierte x-fache Induktion von IL-1beta, IL-6 und KC nach UV-Bestrahlung. In (B) sind die Proteinkonzentrationen verschiedener Entzündungsmediatoren in den Hautlysaten der murinen Rückenhaut dargestellt. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Akute UVB-Bestrahlung führte in MyD88-profizienten Tieren zu einer erhöhten Expression von KC und *chemokine (C-C motif) ligand (CCL) 2*, die in MyD88-defizienten Tieren stark abgeschwächt war. Durch Reexpression von MyD88 in Keratinozyten konnten Chemokinkonzentrationen erreicht werden, die mit denen von MyD88-profizienten Mäusen vergleichbar waren. Versuchstiere, die lediglich in Makrophagen und Neutrophilen MyD88 exprimierten, zeigten eine schwache und nicht signifikante Erhöhung der Proteinkonzentration von KC im Vergleich zu MyD88-defizienten Tieren, wohingegen die CCL2 Konzentration fast vollständig wiederhergestellt werden konnte. Diese Ergebnisse implizieren, dass MyD88-abhängige Signalwege in Keratinozyten essentiell für die Synthese von CCL2 und KC sind. Zudem sind auch hautresidente oder eingewanderte Makrophagen und Neutrophile für die MyD88-abhängige Synthese von CCL2 verantwortlich.

Hinsichtlich der Proteinkonzentration der Mediatoren IL-1alpha und TGF-beta konnten keinerlei MyD88-abhängige Unterschiede beobachtet werden. Die verminderte Detektion des in Keratinozyten konstitutiv exprimierten und intrazellulär vorliegenden IL-1alpha (113) nach UVB-Bestrahlung ist wahrscheinlich bedingt durch eine verstärkte UVB-induzierte Apoptose von Keratinozyten. Eine wesentliche Aufgabe von TGF-beta in der Haut ist die Rückführung von aktivierten, hyperproliferativen Keratinozyten in den basalen Aktivierungsstatus. Insbesondere dermale Fibroblasten sind für die verstärkte Synthese von TGF-beta verantwortlich und vermitteln den Keratinozyten hierdurch, dass der pathologische Zustand beendet ist (33). Die nicht veränderte Expression von TGF-beta in den bestrahlten Versuchstieren verdeutlicht somit einen zum Tötungszeitpunkt weiterhin präsenten inflammatorischen Status der Haut.

Auch wurde neben den vorwiegend proinflammatorischen Mediatoren die Expression zweier Zytokine der IL-10 Familie auf mRNA-Ebene untersucht (Abbildung 4–2). IL-10 wird in der Haut insbesondere von infiltrierten Makrophagen (114) aber auch von Keratinozyten (115) und Mastzellen (116) gebildet und inhibiert die Expression proinflammatorischer Zytokine (117). Die mRNA-Expression von IL-10 zeigte nach zweimaliger Bestrahlung jedoch keine nennenswerte Induktion in den untersuchten Genotypen. Auch konnte in den Proteinlysaten der unbestrahlten sowie bestrahlten Mauhaut kein IL-10

detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Da die Analysen von TGF-beta ebenfalls darauf hinweisen, dass die Entzündungsreaktion noch andauert, wäre ein verstärktes immunsuppressives Milieu in der Haut auch erst zu einem späteren Zeitpunkt nach der Bestrahlung zu erwarten. Das in der Haut vorwiegend von Keratinozyten synthetisierte proinflammatorische Zytokin IL-20 zeigte nach akuter UVB-Bestrahlung eine zwar MyD88-unabhängige jedoch verstärkte Expression. In Untersuchungen von BLUMBERG et al. (118) führte eine Überexpression von IL-20 in transgenen Mäusen zu starken Anomalien wie Hyperkeratose, Akanthose und gestörtem Wachstum. Diese pathologischen Zustände der Epidermis sind charakteristisch für verschiedene chronische entzündliche Erkrankungen, wie beispielsweise Psoriasis. Somit liegt eine Beteiligung von IL-20 an den epidermalen Veränderungen in UVB-bestrahlter Haut nahe.

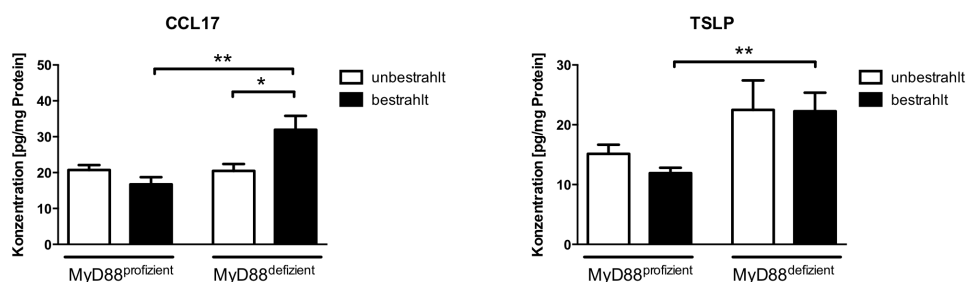


**Abbildung 4-2: Expression von Zytokinen der IL-10 Familie in muriner Rückenhaut nach UVB-Bestrahlung**

MyD88-profiziente und -defiziente Mäuse wurden zweimal innerhalb von zwei Tagen mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Als Kontrollen wurden unbestrahlte Mäuse der entsprechenden Genotypen verwendet. 20 h nach der Bestrahlung wurde die Rückenhaut entnommen, mRNA aus ihr isoliert und die relative Veränderung der Genexpression von IL-10 und IL-20 nach UVB-Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Genotypkontrollen bestimmt. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 3 Mäusen pro Experimentalgruppe.

STUTTE et al. (119) konnten nachweisen, dass das Chemokin CCL17, welches unter anderem auch von DZ gebildet wird, die Migration von Langerhanszellen aus der Epidermis in die drainierenden Lymphknoten induziert und steuert. *Thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) ist ein Typ I Zytokin, welches vorwiegend in Keratinozyten und anderen Epithelien von Barriereorganen synthetisiert wird (120). Bei atopischer Dermatitis führt die Produktion von TSLP zu einer intensivierten Expression von CCL17 in DZ (121). Ob die TSLP-Expression nach UVB-Bestrahlung verstärkt wird und hiermit einhergehend ein Anstieg an CCL17 induziert wird, wurde durch Messung der Proteinexpression in MyD88-profizienten und MyD88-defizienten Versuchstieren vor und nach UVB-Bestrahlung bestimmt (Abbildung 4-3). Während die Konzentration von

CCL17 in den Proteinlysaten der Haut nach Bestrahlung in MyD88-profizienten Versuchstieren unverändert blieb, konnte in den defizienten Tieren eine signifikante Erhöhung dieses Chemokins nach UVB-Bestrahlung beobachtet werden. Die Proteinexpression von TSLP wurde nicht durch UVB-Bestrahlung beeinflusst. Interessanterweise ergaben sich jedoch genotypspezifische Unterschiede. So konnte in unbestrahlten als auch bestrahlten MyD88-defizienten Mäusen eine höhere TSLP-Sekretion im Vergleich zu profizienten Wurfgeschwistern nachgewiesen werden. Ob ein initialer Zusammenhang zwischen der erhöhten TSLP-Produktion und der Induktion von CCL17 in MyD88-defizienten Tieren nach Bestrahlung besteht muss weiterführend untersucht werden. Möglicherweise ist die erhöhte CCL17-Produktion nach der Bestrahlung in der bestrahlten Maushaut auch ein Indiz dafür, dass die Langerhanszellen zwar aktiviert wurden, aber aufgrund der MyD88-Defizienz nicht auswandern können.



**Abbildung 4–3: Proteinexpression von CCL17 und TSLP in muriner Rückenhaul nach UVB-Bestrahlung**

Die Proteinkonzentration von CCL17 und TSLP wurde mittels ELISA aus Proteinlysaten bestrahlter und unbestrahlter muriner Rückenhaul bestimmt. Hierfür wurden MyD88-profiziente und MyD88-defiziente Tiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01).

#### 4.1.2 Lokale Entzündungsreaktionen in bestrahlter Rückenhaul

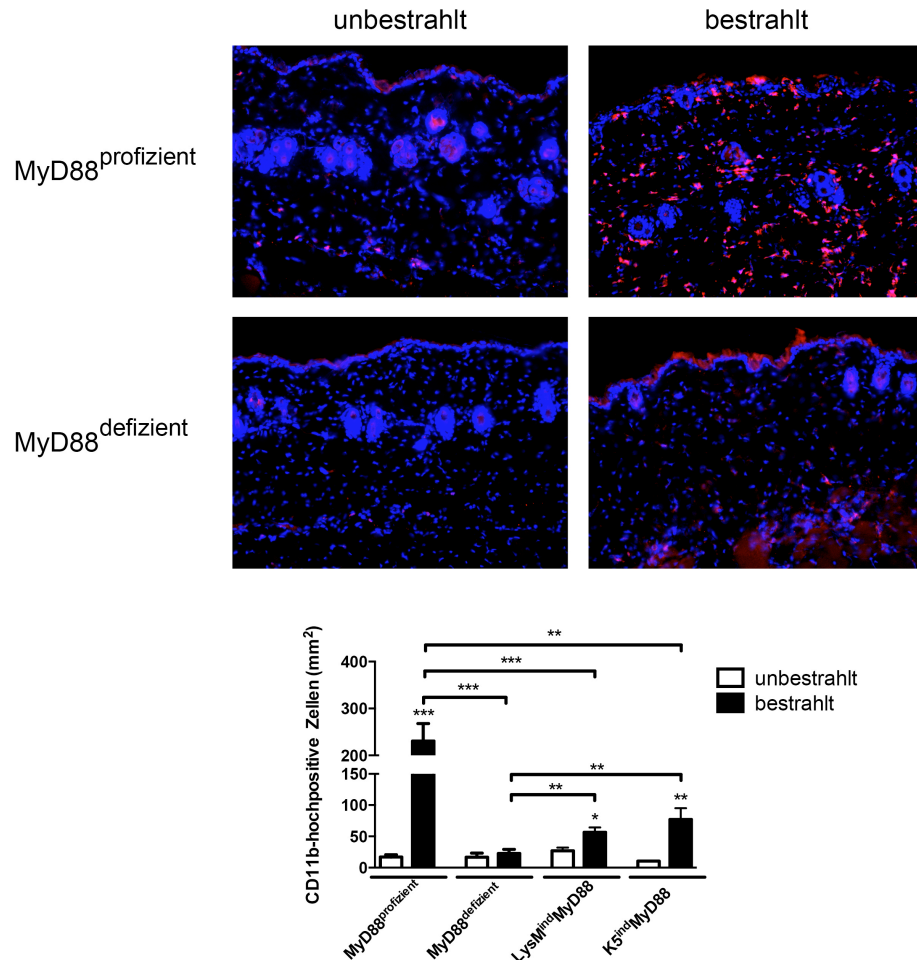
Eine lokale Entzündungsreaktion ist geprägt von vielfachen Veränderungen im betroffenen Gewebe. Neben der Aktivierung verschiedenster Zellpopulationen und einer vermehrten Sekretion von Mediatoren ist insbesondere mit Veränderungen der zellulären Zusammensetzung des Gewebes zu rechnen. Neben der Migration von Langerhanszellen aus der Haut in die drainierenden Lymphknoten (122), können ebenfalls Zellen der angeborenen Immunität unmittelbar nach einem Trauma in die geschädigten Hautareale einwandern.



#### 4.1.2.1 Einwanderung myeloider Zellen in die Haut

Charakteristisch für eine lokale Entzündungsreaktion ist die Einwanderung von Zellen myeloiden Ursprungs, die vorwiegend phagozytotische Aktivitäten aufweisen (1). Ein gut beschriebener Oberflächenmarker, der auf allen myeloiden Zellen wie Monozyten, DZ, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert wird, ist CD11b. Wie zuvor gezeigt, sind insbesondere die an der Infiltration von Makrophagenvorläufern und Neutrophilen beteiligten Chemokine CCL2 und KC in der Haut stark MyD88-abhängig exprimiert. Um einen Überblick über die Infiltration dieser beiden Entzündungszellen der angeborenen Immunität nach UVB-Bestrahlung zu erlangen und mögliche MyD88-abhängige Unterschiede zu detektieren, wurde eine immunhistologische Färbung von CD11b durchgeführt. Hierfür wurden Gefrierschnitte bestrahlter und unbestrahlter Maushaut angefertigt und mit einem Antikörper gegen CD11b gefärbt. Die Visualisierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI. Die Auszählung der CD11b<sup>++</sup> Zellen wurde an 6 bis 9 Bildern pro Maus innerhalb einer definierten Fläche vorgenommen. Wie erwartet stieg die Anzahl an CD11b<sup>++</sup> Zellen in den MyD88-profizienten Mäusen nach UVB-Bestrahlung signifikant an (Abbildung 4–4).

MyD88-defiziente Tiere zeigten hingegen keinerlei Veränderungen hinsichtlich der Infiltration von myeloiden Entzündungszellen. Durch Reexpression von MyD88 in Makrophagen und Neutrophilen respektive Keratinozyten konnte ebenfalls ein erhöhtes entzündliches Infiltrat detektiert werden. Zwar war dieser Anstieg signifikant, erreichte dennoch nicht die Anzahl an CD11b<sup>++</sup> Zellen wie in MyD88-profizienten Tieren.



**Abbildung 4–4: Infiltration von CD11b<sup>++</sup> myeloiden Zellen in die Haut nach UVB-Bestrahlung**

MyD88-profiziente, MyD88-defiziente, LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Als Kontrollen wurden unbestrahlte Mäuse der entsprechenden Genotypen verwendet. 20 h nach der zweiten Bestrahlung wurden die CD11b<sup>++</sup> Zellen (rot) in der Dermis gezählt (200-fache Vergrößerung). Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit dem in die nukleäre DNS interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI (blau). Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Somit wird deutlich, dass neben der Expression verschiedenster Entzündungsmediatoren ebenso die Infiltration CD11b-exprimierender Entzündungszellen wie Neutrophile und Monozyten, aus denen reife Makrophagen differenzieren können, nach UVB-Bestrahlung stark MyD88-abhängig ist. Obwohl insbesondere in den K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen die Proteinkonzentrationen von CCL2 und KC vergleichbar mit denen von MyD88-profizienten waren, war die Menge an infiltrierenden Entzündungszellen deutlich reduziert. Damit Makrophagen und Neutrophile entlang eines Chemokingradienten aus der Blutbahn zum Entzündungsherd rekrutiert werden können, sind verschieden-

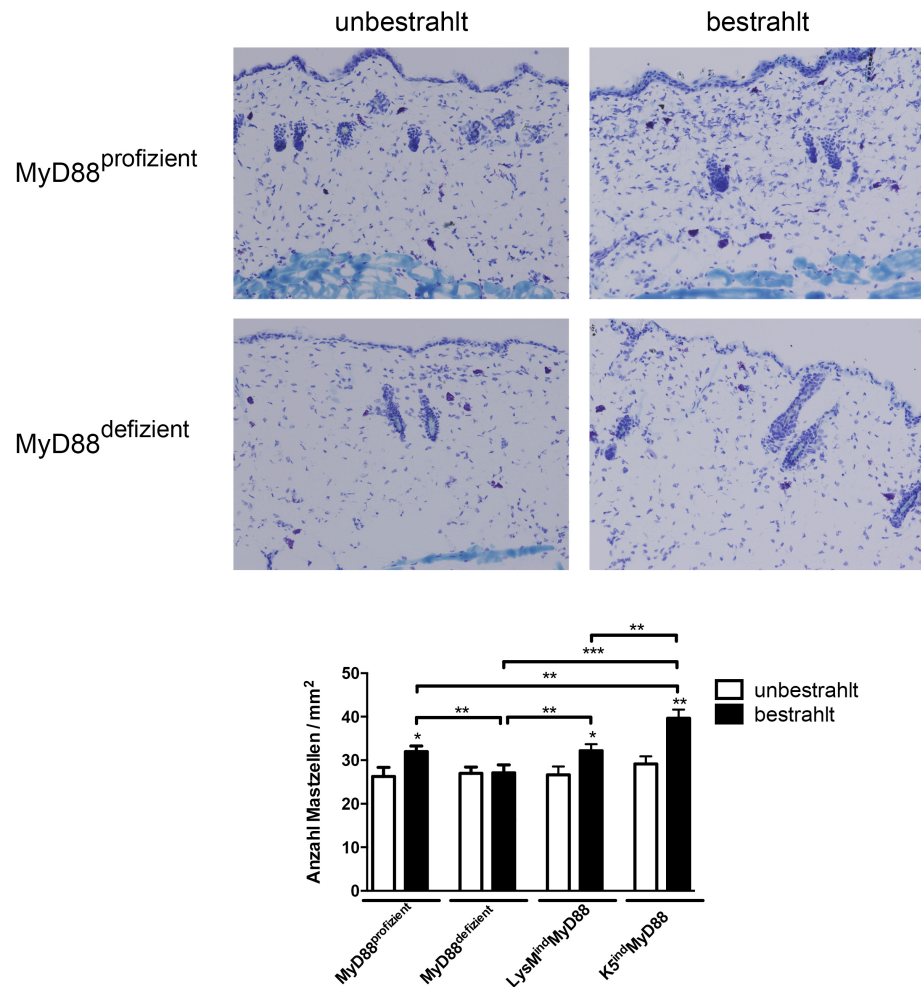
ste Interaktionen mit Adhäsionsmolekülen notwendig (123, 124). Möglicherweise ist die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen wie E-Selektin, ICAM oder VCAM MyD88-abhängig, so dass die myeloiden Zellen nicht in ausreichendem Maße mit den Endothelzellen interagieren und weiterhin im Blut zirkulieren. Auch könnte eine verminderte Expression von Oberflächenmolekülen auf Neutrophilen bei fehlender MyD88-Signaltransduktion verantwortlich für die verminderte Einwanderung sein. So könnte zum Beispiel durch eine verminderte Expression von *chemokine (C-X-C motif) receptor* (CXCR) 1 auch nur eine reduzierte Anzahl an Neutrophilen entlang des Chemokingradienten zum Ort der Entzündung vordringen.

#### 4.1.2.2 Aktivierung von Mastzellen

Neben Neutrophilen und Makrophagen sind die in Phänotyp und Funktion vielfältigen Mastzellen eine weitere wichtige Zellpopulation myeloider Zellen. Im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten, die als reife Zellen aus dem Blut in entzündetes Gewebe migrieren, wandern die im Blut zirkulierenden Vorläufer von Mastzellen in Barriereorgane wie die Haut oder das Darmsystem ein und reifen dort zu ausdifferenzierten Mastzellen. Obwohl Mastzellen häufig im Kontext allergischer Reaktionen genannt werden, haben sie zudem weitere multiple immunmodulierende Funktionen bei entzündlichen Prozessen (125–128). METZ et al. (129) konnten zeigen, dass Mastzellen an den entzündlichen Prozessen nach akuter UVB-Bestrahlung beteiligt sind. Auch ist nach chronischer UV-Bestrahlung eine verstärkte Einwanderung von Mastzellen in die Haut zu beobachten (130). Ob eine Rekrutierung bzw. ein vermehrtes Auftreten von Mastzellen nach UVB-Bestrahlung in diesem Bestrahlungsmodell ebenfalls zu beobachten ist und zudem MyD88-abhängige Signalkaskaden involviert sind, wurde im Folgenden untersucht.

Für die Analysen der Mastzellanzahl wurde die rasierte Rückenhaul der Versuchstiere zweimalig mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die Kontrolltiere blieben unbestrahlt. Nach 20 h wurde die Rückenhaul entnommen und zeitnah in Einbettmedium eingefroren. Die im Anschluß gefertigten Gefrierschnitte wurden mit Toluidinblau O-Lösung inkubiert, so dass anhand der violettgefärbten Vesikel der Mastzellen eine leichte Identifikation und Zählung der Mastzellen möglich war. Nach UVB-Bestrahlung konnte eine erhöhte Anzahl an Mastzel-

len in der Rückenhaut von MyD88-profizienten Tieren detektiert werden, während in den bestrahlten MyD88-defizienten Mäusen kein Anstieg der Mastzellen erkennbar war (Abbildung 4–5). Eine Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen wie auch in Keratinozyten führt wiederum zu einem Anstieg der Mastzellzahl in der murinen Rückenhaut und übertraf in den K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen sogar die Anzahl der Mastzellen in MyD88-profizienten Mäuse. Hinsichtlich der Anzahl an Mastzellen in der unbestrahlten Haut war kein Unterschied zwischen den verwendeten Mauslinien sichtbar.



**Abbildung 4–5: Infiltration von Mastzellen in die Haut nach UVB-Bestrahlung**

Die histologischen Bilder (200-fache Vergrößerung) zeigen repräsentative Aufnahmen toluidingefärbter Rückenhaut von MyD88-profizienten und MyD88-defizienten Tieren im unbestrahlten Zustand sowie nach zweimaliger Bestrahlung mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup>. Die Anzahl der als dunkle violette Zellen zu erkennenden Mastzellen wurde bestimmt. Zusätzlich zu den exemplarisch dargestellten Genotypen wurden ebenfalls LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäuse analysiert. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Neben der stark MyD88-abhängigen Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen scheinen auch geringfügige MyD88-abhängige Veränderungen in der Anzahl von Mastzellen nach UVB-Bestrahlung existent zu sein. Ob diese Veränderungen auf einer verstärkten MyD88-abhängigen Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen basieren oder UVB-Strahlung möglicherweise zu einer Proliferation von Mastzellen führt, muss jedoch weiterführend analysiert werden.

## 4.2 Spezifische Rolle von MyD88 in Keratinozyten

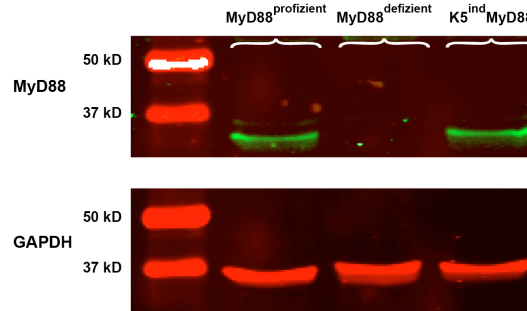
Um die spezifische Rolle von MyD88 bei der UVB-induzierten Entzündungsreaktion untersuchen zu können, wurden neben der Analyse von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen auch Mäuse verwendet, die eine zelltypspezifische Expression von MyD88 erlauben. Durch die Verkreuzung von K5Cre- oder LysMCre-Mäusen mit MyD88LSL-Mäusen konnte in den Nachkommen eine Deletion der Stop-Kassette spezifisch in Keratinozyten respektive Makrophagen und Granulozyten erzielt werden. Dies ermöglichte eine Reexpression von MyD88 in Keratinozyten (K5<sup>ind</sup>MyD88) sowie Makrophagen und Granulozyten (LysM<sup>ind</sup>MyD88), so dass die zelltypspezifische Rolle MyD88-abhängiger Signalwege in diesen wichtigen Effektorzellen näher ergründet werden konnte.

### 4.2.1 MyD88-Expression in K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen

Für einen Nachweis der spezifischen Reexpression von MyD88 in Keratinozyten und somit der Funktionalität der generierten K5<sup>ind</sup>MyD88 Mäusen wurden Keratinozyten aus Mausohren sowohl von K5<sup>ind</sup>MyD88 Mäusen als auch von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen *ex vivo* generiert. Im Anschluß wurden die hergestellten Zellysate mittels *Western blot* hinsichtlich der Proteinexpression von MyD88 untersucht. Als konstitutiv exprimierte Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet (Abbildung 4–6).

Die mittels photometrischer Messung angegliche Proteinkonzentration der Zellysate zeigte eine einheitlich starke GAPDH-Bande, so dass von vergleichbaren Proteinmengen in den Lysaten ausgegangen werden konnte. Bezüglich der Expression von MyD88 war sowohl in Keratinozyten von MyD88-profizienten als auch von K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen eine spezifische Bande zu er-

kennen, die in Keratinozyten generiert aus den Ohren MyD88-defizienter Mäuse vollständig fehlte. Hierdurch wird ersichtlich, dass in Keratinozyten von K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen und MyD88-profizienten Mäusen vergleichbare Mengen an MyD88 gebildet werden. Somit konnte die zelltypspezifische Reexpression von MyD88 in Keratinozyten nachgewiesen werden.



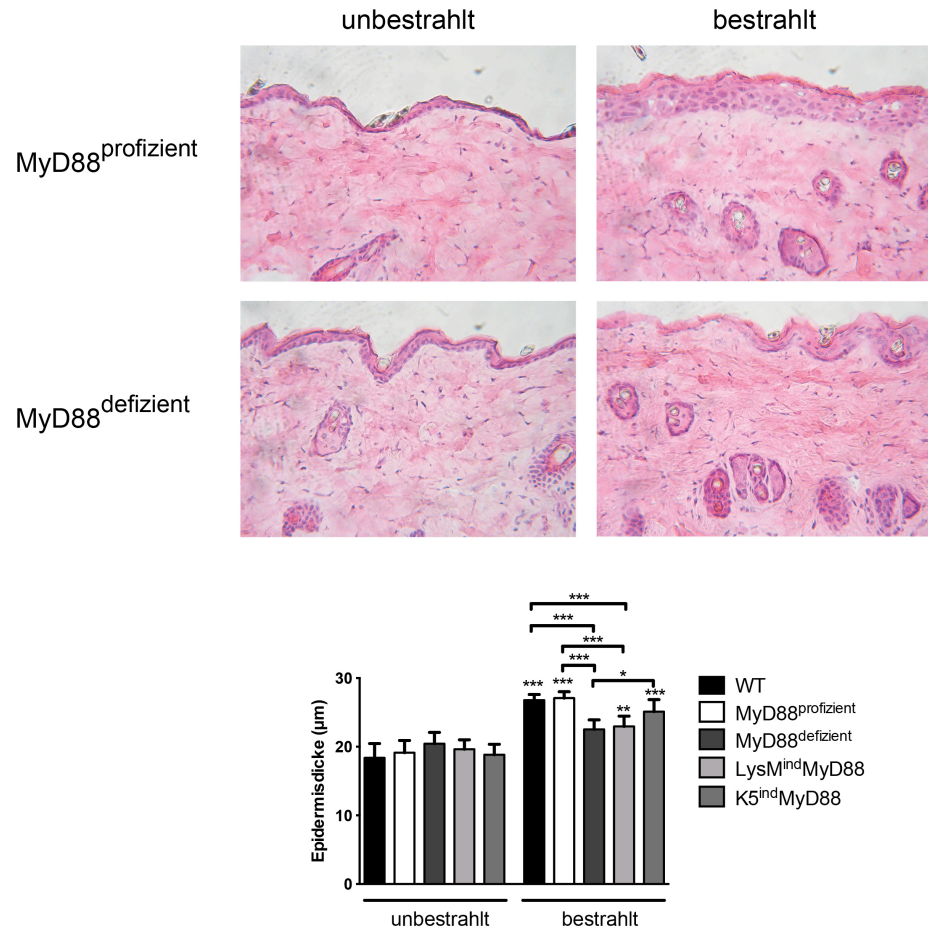
**Abbildung 4–6: Expression von MyD88 in Keratinozyten im Western blot**

Zellysate von Keratinozyten aus MyD88-profizienten, MyD88-defizienten und K5<sup>ind</sup>MyD88 Mäusen wurden mit Antikörpern gegen MyD88 und GAPDH als Ladekontrolle inkubiert. Sowohl in Zellysaten aus MyD88-profizienten als auch K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen konnte eine spezifische Expression von MyD88 nachgewiesen werden.

#### 4.2.2 Epidermale Akanthose nach UVB-Bestrahlung

Wie vielfach in der Literatur beschrieben, führt akute und wiederholte UVB-Strahlung zu einer Verdickung der Epidermis (131, 132). Diese ist vorwiegend auf eine Aktivierung und Hyperproliferation der Keratinozyten als Antwort auf die verstärkte Expression von Zytokinen zurückzuführen (33).

Um die epidermalen Veränderungen in muriner Rückenhaul nach UVB-Bestrahlung beurteilen zu können, wurden die Mäuse an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. 20 h nach der zweiten Bestrahlung wurde die im Vorhinein rasierte Rückenhaul entnommen, so dass nach entsprechender Weiterverarbeitung Gefrierschnitte der Rückenhaul angefertigt werden konnten. Mittels HE-Färbung erfolgte die Quantifizierung der Epidermisdicke in unbestrahlter sowie bestrahlter Haut aller für diese Arbeit verwendeter Mauslinien (Abbildung 4–7). Für die Berechnung der Epidermisdicke einer einzelnen Maus wurde der Mittelwert aus insgesamt 18 Messpunkten auf 9 verschiedenen Aufnahmen gebildet.



**Abbildung 4–7: Epidermisdicke nach UVB-Bestrahlung**

WT, MyD88-profiziente, MyD88-defiziente, LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Als Kontrollen wurden unbestrahlte Mäuse der entsprechenden Genotypen verwendet. 20 h nach der zweiten Bestrahlung wurde die durchschnittliche Epidermisdicke jeder Maus in HE-gefärbten Gefrierschnitten (400-fache Vergrößerung) ermittelt. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Sowohl in bestrahlter Haut von WT-Mäusen als auch von MyD88-profizienten Mäusen konnte nach UVB-Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der Epidermisdicke im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollmäusen festgestellt werden. Weiterhin konnte kein Unterschied in der Ausprägung der UVB-induzierten Akanthose zwischen diesen beiden Mauslinien verzeichnet werden, so dass eine Verwendung von MyD88-profizienten Tieren als Wurfgeschwisterkontrollen in den durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit vertretbar war. Im Gegensatz hierzu konnte in bestrahlten MyD88-defizienten Mäusen keine Akanthose detektiert werden. Die Epidermis von LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen zeigte hingegen wieder eine UVB-induzierte Verdickung

der Epidermis, die jedoch nicht die Dicke der MyD88-profizienten Mäuse erreichte.

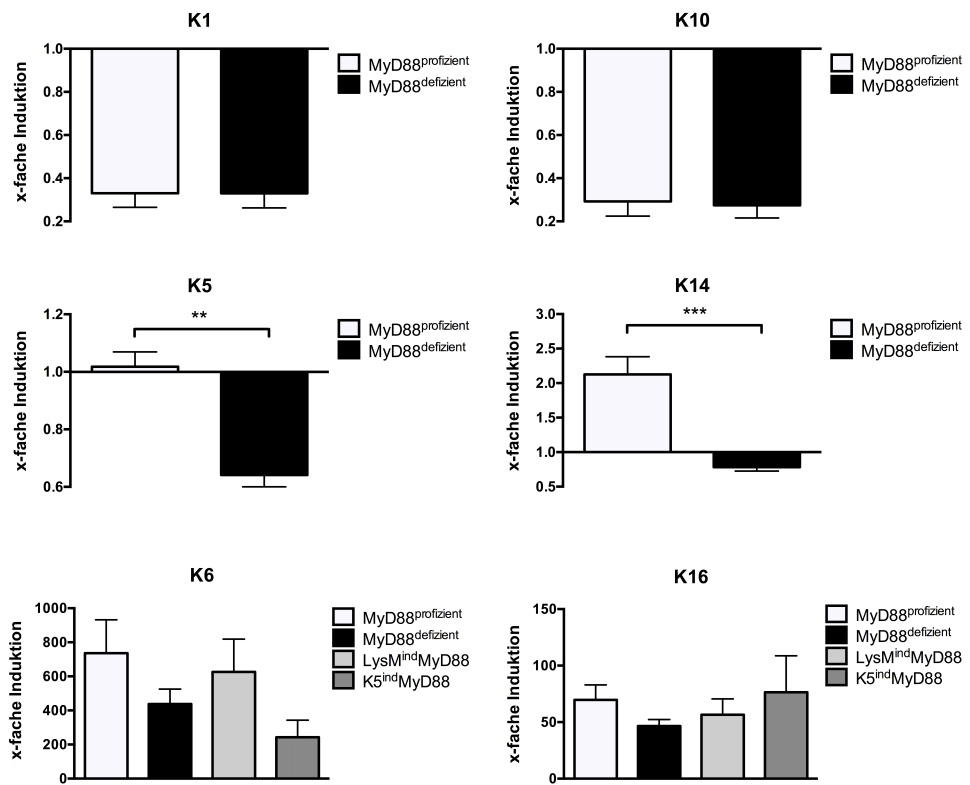
Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die akute UVB-induzierte Akanthose *in vivo* MyD88-abhängig ist. Verantwortung für die verstärkte Proliferation der Keratinozyten tragen sowohl die MyD88-Signaltransduktion in den Keratinozyten selbst als auch in myeloiden Entzündungszellen.

#### 4.2.3 UVB-induzierte Expression von Zytokeratinen

Die verstärkte Synthese verschiedener Zytokeratine stellt ein valides Mass für die Beurteilung des jeweiligen Aktivierungszustandes der Keratinozyten dar. Während die Keratine K1 und K10 vorwiegend in Keratinozyten synthetisiert werden, die den normalen Differenzierungsprozess durchlaufen, ist die vermehrte Expression der Zytokeratine K6 und K16 in aktivierten Keratinozyten zu finden. Dieser unter pathologischen Konditionen hervorgerufene hyperproliferative Zustand wird insbesondere durch die Wirkung verschiedener proinflammatorischer Zytokine induziert und aufrechterhalten. Erst nach Abklingen der Entzündungsreaktion können die Keratinozyten in einen deaktivierten, basalen Zustand zurückgeführt werden, der durch die Expression der Zytokeratine K5 und K14 gekennzeichnet ist (33).

**RNS-Expression** Um einen ersten umfassenden Eindruck über den Aktivierungszustand der Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung zu gewinnen sowie die Frage der Beteiligung von MyD88 näher erörtern zu können, wurden q-PCR Analysen hinsichtlich der Genexpression von K1, K5, K6, K10, K14 und K16 durchgeführt. Da es zwischen MyD88-profizienten und MyD88-defizienten Mäusen im unbestrahlten Zustand keine Unterschiede in den gemittelten Ct-Werten gab (Daten nicht gezeigt), erfolgte die Berechnung der x-fachen Induktion mit Bezug zu den jeweiligen unbestrahlten Kontrollen eines jeden Genotyps (Abbildung 4–8).





**Abbildung 4–8: RNS-Expression von Zytokeratinen in muriner Rückenhaul nach UVB-Bestrahlung**

Die Diagramme zeigen die via q-PCR detektierte Expression verschiedener Zytokeratine nach zweimaliger Bestrahlung mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> in der Rückenhaul. Berechnet wurde die x-fache Induktion der Keratingene mit Bezug zu den unbestrahlten Kontrollen eines jeden Genotyps. Verwendung fanden hierfür MyD88-profiziente und MyD88-defiziente Mäuse sowie im Falle der Zytokeratine K6 und K16 zusätzlich LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäuse. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001).

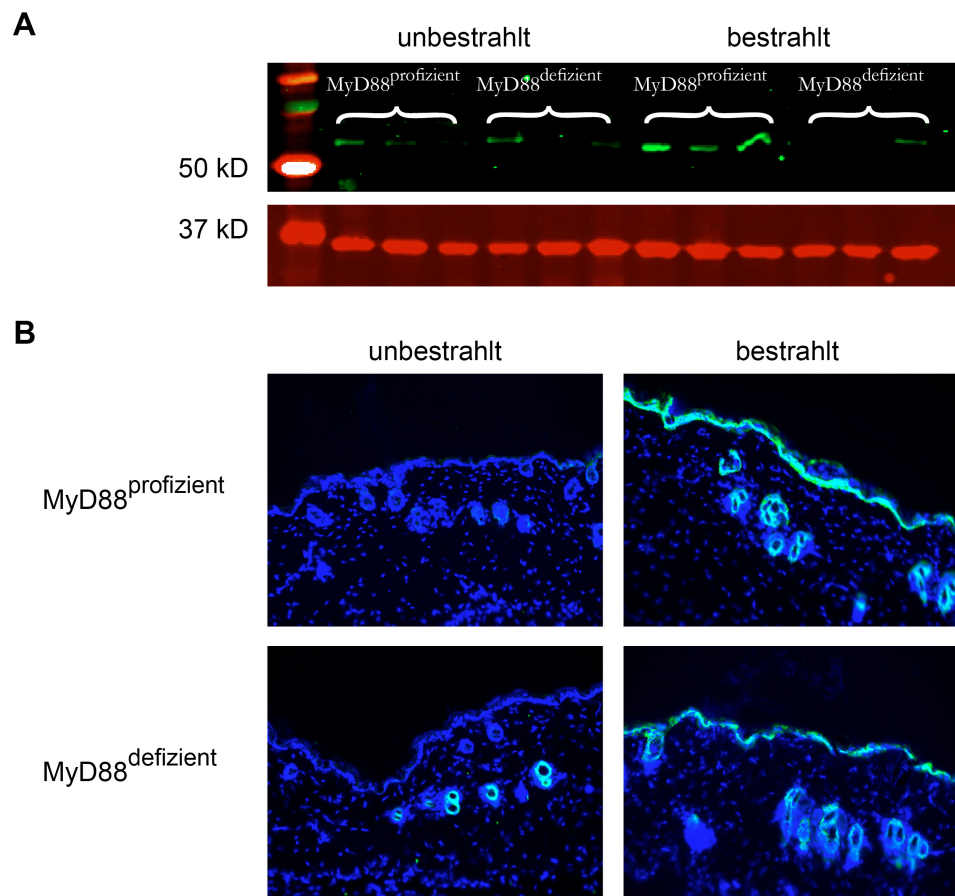
Betrachtet man die q-PCR Ergebnisse für die Zytokeratine K1 und K10, so ist sowohl bei MyD88-profizienten als auch bei MyD88-defizienten bestrahlten Versuchstieren eine verminderte Expression dieser Zytokeratine erkennbar. Da jedoch keinerlei genotypspezifische Unterschiede im Ausmaß der verminderten Expression beobachtet werden konnten, kann eine Rolle des Signalgebers MyD88 bei der Inhibierung der Keratinozytendifferenzierung ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse für die Zytokeratine 5 und 14 zeigen signifikante Unterschiede in der Genexpression der untersuchten Genotypen. Es ist jedoch fraglich, ob aufgrund der schwachen Repression bzw. Induktion eine biologische Relevanz besteht. Möglicherweise lässt sich die erhöhte Induktion von K14 in den MyD88-profizienten Tieren mit der erhöhten Anzahl an aktivierten Keratinozyten, die in den basalen Zustand zurückkehren, begründen. Entgegen diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Expression von K6 und

K16 nach UVB-Strahlung stark induziert wird. Sowohl K6 als auch K16 offenbaren eine MyD88-abhängige Induktion. Dennoch konnte anhand der Ergebnisse für MyD88-defiziente Mäuse gezeigt werden, dass auch MyD88-unabhängige Signalwege für die Aufregulation ebendieser Zytokeratine verantwortlich sind. Betrachtet man die Resultate für die zelltypspezifisch exprimierenden MyD88 *knock-in* Modelle, so ist im Falle von K16 die MyD88-Signaltransduktion in Keratinozyten ausschlaggebend für die verstärkte Zytokeratinexpression, wohingegen Granulozyten und Makrophagen eine eher untergeordnete Rolle zuteil wird. Die Ergebnisse für K6 verhalten sich jedoch invers zu denen für K16. Maßgeblichen Einfluss bei der Expression von K6 scheinen MyD88-abhängige Signalwege in Makrophagen und Granulozyten zu haben. Im Gegensatz ist nach Reexpression von MyD88 in Keratinozyten keine Veränderung der K6-Expression im Vergleich zu MyD88-defizienten Tieren zu verzeichnen. Dennoch muss beachtet werden, dass im Falle der K6-Expression sehr große Schwankungen, erkennbar an einem großen Fehlerbalken, innerhalb der genotypspezifischen Ergebnisse vorhanden sind. Diese starken Schwankungsbreiten begründet durch Ausreißer und starke Variationen zwischen den einzelnen unabhängigen Experimenten können fehlerhafte Tendenzen bedingen.

### **Proteinexpression von K6**

Um die in der q-PCR erworbenen Ergebnisse zu verifizieren, wurde in weiterführenden Experimenten die MyD88-abhängige Induktion von K6 auf Proteinebene mittels *Western blot* und in der Immunhistologie analysiert (Abbildung 4–9). Der *Western blot* wurde mit Lysaten aus der Rückenhaut unbestrahlter und bestrahlter Versuchstiere durchgeführt. Für die histologischen Analysen wurden analog zu den zuvor beschriebenen HE-Färbungen Gefrierschnitte der Rückenhaut angefertigt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper gegen K6 markiert.

Sowohl im *Western blot* als auch in der Immunhistologie konnten lediglich marginale Signale für K6 in den unbestrahlten Kontrollen detektiert werden. In der Rückenhaut der bestrahlten Tiere zeigte sich hingegen ein MyD88-abhängiges Expressionsmuster. Während in den MyD88-profizienten Tieren eine starke Expression von K6 vorzufinden war, konnte lediglich eine schwache Induktion in den MyD88-defizienten Mäusen nachgewiesen werden.



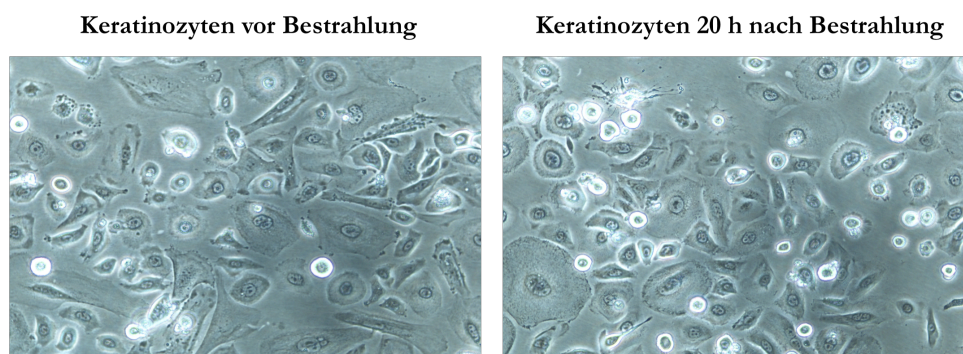
**Abbildung 4–9: Proteinexpression von K6 in muriner Rückenhaut nach UVB-Bestrahlung**

MyD88-profiziente und MyD88-defiziente Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Als Kontrollen wurden unbestrahlte Mäuse der entsprechenden Genotypen verwendet. 20 h nach der zweiten Bestrahlung erfolgte die Entnahme der Rückenhaut. **(A)** zeigt einen repräsentativen *Western blot* der Proteinexpression von K6 (grün) in Proteinlysaten aus der Rückenhaut. Als Ladekontrolle wurde GAPDH (rot) verwendet. In **(B)** finden sich immunhistologische Färbungen (200-fache Vergrößerung) der K6 Expression (grün) in Gefrierschnitten. Die Zellkernfärbung wurde mit DAPI (blau) durchgeführt. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 3 Mäusen pro Experimentalgruppe.

Die vorliegenden Ergebnisse ließen, basierend auf der RNS- und Proteinexpression der Keratine 6 und 16, eine verstärkte MyD88-abhängige Aktivierung von Keratinozyten erkennen. Dies könnte erklären, warum die MyD88-Expression zell-intrinsisch zur beobachteten Hyperproliferation der Keratinozyten und Akanthose nach UVB-Bestrahlung beiträgt. Welchen jeweiligen Einfluss die einzelnen Effektorzellen der Haut wie Keratinozyten und Zellen myeloiden Ursprungs bei dieser Aktivierung besitzen bedarf weiterführender Untersuchungen. Dennoch scheinen, basierend auf den Ergebnissen für K6 und K16, Granulozyten und Makrophagen sowie die Keratinozyten selbst partiell für die UVB-induzierte Aktivierung der Keratinozyten verantwortlich zu sein.

#### 4.2.4 Expression proinflammatorischer Zytokine nach UVB-Bestrahlung (in vitro)

Weiterführend wurde untersucht, welche Entzündungsmediatoren MyD88-abhängig speziell in Keratinozyten als Antwort auf UVB-Bestrahlung gebildet werden und somit zur UVB-induzierten Entzündungsreaktion beitragen könnten. Hierfür wurden *ex vivo* Keratinozyten aus Mausohren von MyD88-profizienten und MyD88-defizienten Mäusen isoliert und in einheitlicher Zellzahl ausgesät und kultiviert. Nach morphologischer Begutachtung wurden die differenzierten Keratinozyten am 7. oder 8. Tag nach ihrer Isolierung mit 10 und 30 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt. Als Kontrollen dienten unbestrahlte Keratinozyten. Abbildung 4–10 zeigt die unveränderte Morphologie der generierten Keratinozyten unmittelbar vor der Bestrahlung und 20 h nach der Bestrahlung mit 30 mJ/cm<sup>2</sup>.



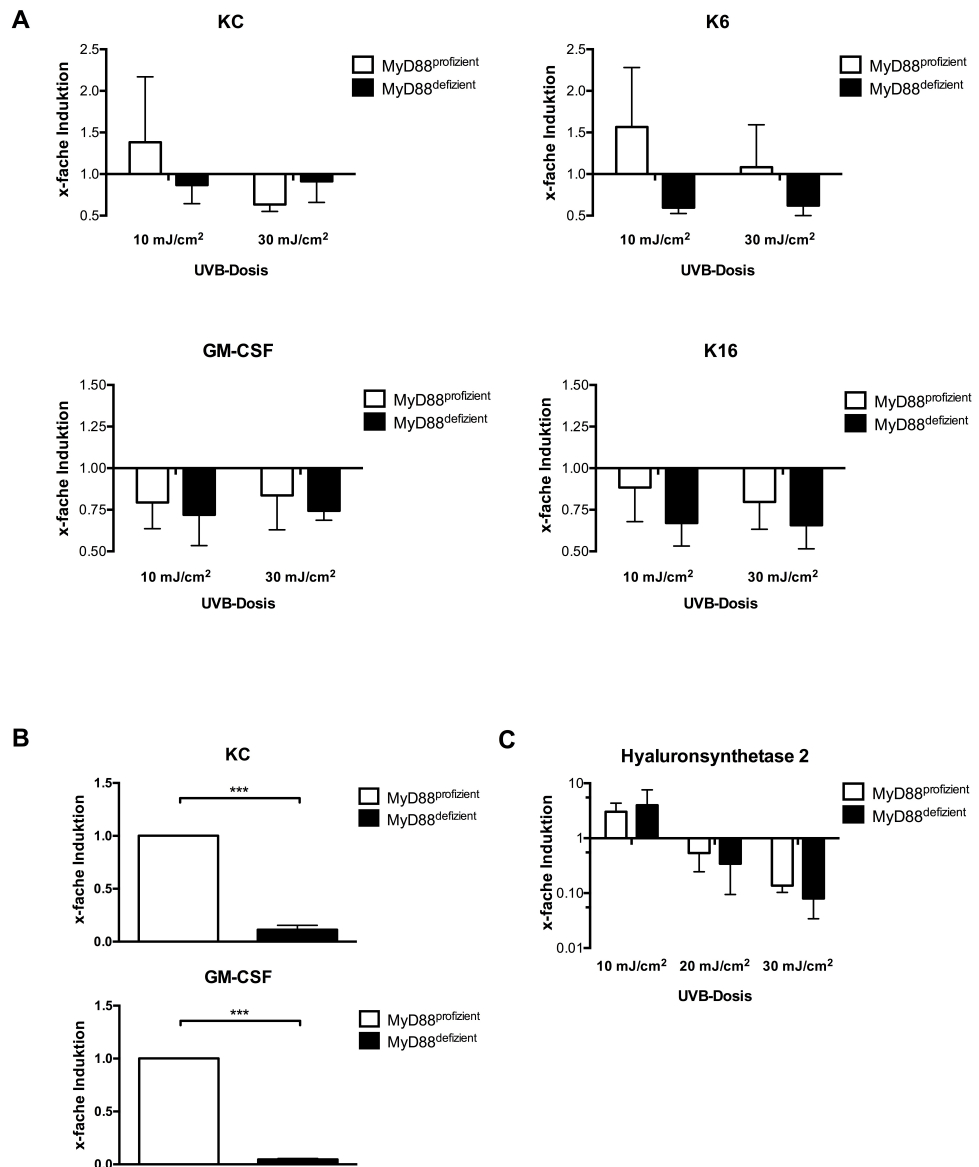
**Abbildung 4–10: Morphologie von *ex vivo* generierten Keratinozyten vor und nach UVB-Bestrahlung**

Generierte Keratinozyten unmittelbar vor der Bestrahlung (links) und 20 h nach der UVB-Bestrahlung mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> (rechts).

**RNS-Expression** Um die Zytokinexpression nach der UVB-Bestrahlung zu charakterisieren, wurden die kultivierten Keratinozyten 20 h nach Bestrahlung direkt in den Gewebekulturschalen lysiert und die RNS aus dem Lysat isoliert. Im Anschluss daran wurden q-PCR Analysen für verschiedene potentiell von Keratinozyten gebildete Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Zytokeratine durchgeführt (Abbildung 4–11). Alle weiteren untersuchten Mediatoren, wie z.B. TNF-alpha, IL-6, IL-33 und HSP27, zeigten in Voruntersuchungen keine oder lediglich marginale Veränderungen in der Expressionsstärke nach UVB-Bestrahlung, so dass sie nicht näher untersucht wurden. Ebenfalls konnten für die Zytokine KC und GM-CSF nach Behandlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> und 30 mJ/cm<sup>2</sup> keine Ver-

änderungen der Expression mit Bezug zur jeweiligen unbestrahlten Genotypkontrolle beobachtet werden (Abbildung 4–11A). Wie in Abbildung 4–11B ersichtlich, bestehen jedoch signifikante phänotypische Unterschiede in der Genexpression der beiden Zytokine bereits in unbestrahlten Keratinozyten. Sowohl die Expression von KC als auch von GM-CSF ist in MyD88-defizienten Keratinozyten im Vergleich zu MyD88-exprimierenden Keratinozyten *in vitro* stark supprimiert. Auch die ausschließlich in Keratinozyten gebildeten Zytokeratine 6 und 16 ließen nach UVB-Bestrahlung keine veränderte Expression erkennen, obwohl in den *in vivo* Analysen starke MyD88-abhängige und -unabhängige Induktionen zu finden waren.

Hyaluronsäure ist neben den Kollagenfasern ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix und aufgrund seiner starken Wasserbindungskapazität essentiell für den Gewebsturgor in der Haut und den Wasserhaushalt des Körpers. Das integrale Membranprotein Hyaluronsynthetase 2 ist an der Synthese und Membrantranslokation von Hyaluronsäure in dermalen Fibroblasten aber auch in epidermalen Keratinozyten beteiligt (133). Bei entzündlichen Prozessen in der Haut wird Hyaluronsäure vermehrt abgebaut und kann als endogenes Gefahrensignal durch TLR4 und TLR2 erkannt werden (134, 135). Ob die UVB-induzierten inflammatorischen Prozesse einen Einfluss auf die Synthese der Hyaluronsäure haben, wurde ebenfalls in Keratinozyten untersucht. Die Ergebnisse für die Hyaluronsynthetase 2 zeigten ein verändertes Expressionsmuster abhängig von der verwendeten UVB-Strahlung (Abbildung 4–11C). Während die q-PCR Analysen nach einer geringfügigen Bestrahlungsdosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> MyD88-unabhängig eine verstärkte Expression der Synthase erkennen ließen, erfolgte bei höheren Bestrahlungsdosen eine dosisabhängige verminderte Genexpression. Diese Suppression war in MyD88-defizienten Keratinozyten tendenziell verstärkt ausgeprägt, zeigte jedoch keine Signifikanz. Vermutlich sind Keratinozyten in der Lage bei moderater UVB-Strahlung die negativen Einflüsse auf die extrazelluläre Matrix über eine verstärkte Produktion von Hyaluronsäure zu kompensieren. Bei höheren Bestrahlungsdosen scheinen diese Kompensationsmechanismen jedoch nicht mehr zu erfolgen. Dies könnte zu einer verminderten Hyaluronsäuresynthese beitragen, wie bei dem vielfach beschriebenen Verlust an Bindegewebsmatrix während extrinsischer Hautalterung (61).

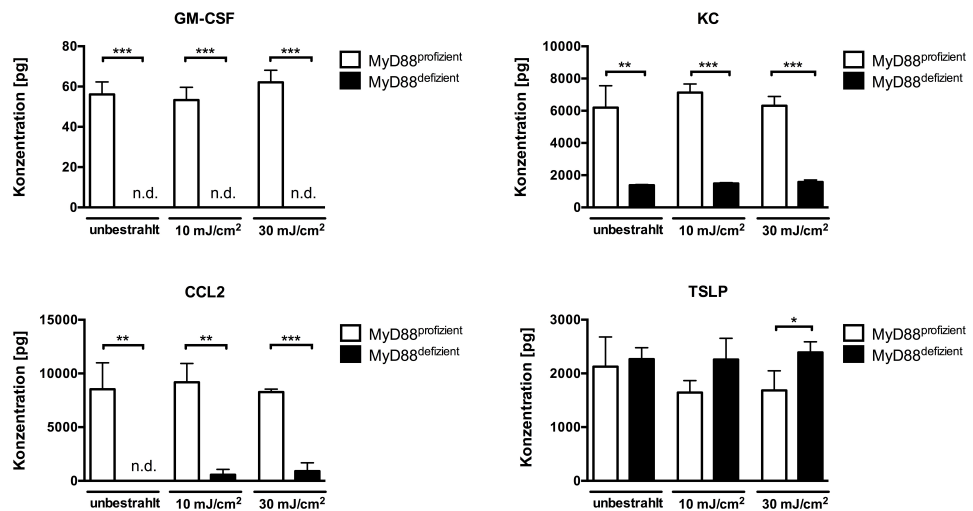


**Abbildung 4–11: RNS-Expression verschiedener Mediatoren in ex vivo generierten Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung**

Die Diagramme zeigen die mit q-PCR ermittelte RNS-Expression verschiedener Zytokine und Zytokeratine sowie der Hyaluronsynthetase 2 nach verschiedenen UVB-Dosen in Keratinozyten *in vitro*. Die Keratinozyten wurden aus MyD88-profizienten sowie -defizienten Mäusen generiert. **(A)** und **(C)** zeigen die Expression von KC, GM-CSF, K6 und 16 sowie Hyaluronsynthetase 2 nach Bestrahlung mit 10 und 30 mJ/cm<sup>2</sup> respektive 10, 20 und 30 mJ/cm<sup>2</sup>. Die Berechnung der x-fachen Induktion erfolgte immer mit Bezug zur jeweiligen Genotypkontrolle. **(B)** stellt die unterschiedliche Genexpression von KC und GM-CSF im unbestrahlten Zustand dar. Die unbestrahlten Keratinozyten von MyD88-profizienten Tieren dienten hier als Bezug zur Berechnung der Induktion. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ).

**Proteinexpression** Neben der RNS Isolation und den nachfolgend durchgeführten Genexpressionsanalysen wurden zudem die Zellkulturüberstände 20 h nach der UVB-Bestrahlung gesammelt, um Unterschiede in der Proteinexpression verschiedener Zytokine und Chemokine nachzuweisen.

Sowohl nach Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> als auch mit 30 mJ/cm<sup>2</sup> konnte mittels ELISA keine veränderte Proteinexpression der Chemokine KC und CCL2 sowie der Zytokine GM-CSF und TSLP im Vergleich zu den jeweiligen unbestrahlten Genotypkontrollen im Überstand detektiert werden (Abbildung 4–12). Obwohl keine weitere Stimulierung der Proteinexpression durch UVB-Strahlung induziert wurde, konnten dennoch Informationen über die Abhängigkeit der Proteinsynthese von MyD88 gewonnen werden. Während die Expression der Entzündungsmarker KC, CCL2 und GM-CSF fast vollständig MyD88-abhängig war und nur marginale Mengen in MyD88-defizienten Keratinozyten messbar waren, konnten im Falle des T<sub>H2</sub>-Immunantworten stimulierenden Mediators TSLP leicht erhöhte Proteinkonzentrationen in MyD88-defizienten Keratinozyten im Vergleich zu MyD88-exprimierenden Keratinozyten nachgewiesen werden.



**Abbildung 4–12: Proteinexpression von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren in ex vivo generierten Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung**

Primäre Keratinozyten von MyD88-profizienten und MyD88-defizienten Mäusen wurden *in vitro* mit 10 und 30 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. 20 h nach der Bestrahlung wurden die Zellkulturüberstände entnommen und mittels ELISA die Proteinkonzentration der Entzündungsmarker GM-CSF, KC, CCL2 und TSLP bestimmt. Als Kontrollen wurden unbestrahlte Keratinozyten der entsprechenden Genotypen verwendet. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in UVB-bestrahlten Keratinozyten *in vitro* – mit Ausnahme der Hyaluronsynthetase 2 – keinerlei Veränderungen hinsichtlich der Gen- und Proteinexpression ausgewählter Entzündungsmediatoren vorgefunden werden konnten. Lediglich eine MyD88-

abhängige phänotypische Expression der untersuchten Mediatoren GM-CSF, KC, CCL2 und TSLP konnte auf Protein- und im Falle von GM-CSF und KC zusätzlich auf RNS-Ebene nachgewiesen werden. Möglicherweise werden die kultivierten Keratinozyten durch TLR-Liganden im Medium schon im unbehandelten Zustand stimuliert, so dass eine weitere externe Stimulierung nicht möglich ist. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in unveröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe. Auch hier konnte in *ex vivo* kultivierten und differenzierten Keratinozyten eine konstitutive Expression verschiedener Entzündungsmediatoren gemessen werden, die jedoch auf weitere TLR-Stimuli wie LPS oder Pam3CSK4 nicht reagierten. Somit eignen sich *ex vivo* generierte Keratinozyten nur bedingt, um die genaue Rolle der Keratinozyten bei der UVB-induzierten Entzündungsreaktion zu erörtern und die *in vivo* Daten zu stützen.

### **4.3 Funktion von dendritischen Zellen nach UVB-Bestrahlung**

DZ in peripheren Geweben, so auch die Langerhanszellen und verschiedene dermale DZ in der Haut, sind in der Lage, sowohl Pathogene als auch endogene Gefahrensignale zu erkennen und infolgedessen schnellstmöglich eine Immunantwort einzuleiten. Werden die unreifen DZ der Haut aktiviert, migrieren sie in die drainierenden Lymphknoten und initiieren dort eine Immunreaktion durch Präsentation der aufgenommenen Antigene an naive T-Zellen (38, 136). Die Rolle der DZ insbesondere nach UV-Bestrahlung wird dennoch kontrovers diskutiert. In Folge chronischer UV-Bestrahlung mit geringen suberythemalen Dosen werden hauptsächlich immunsuppressive Effekte beobachtet. Neben der vermehrten Synthese antiinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. das vorwiegend von Makrophagen gebildete IL-10 (114), stehen DZ der Haut im Mittelpunkt der Entstehung der Immunsuppression (137–139). Dennoch ist bis heute nicht eindeutig geklärt, welchen Einfluss akute UVB-Bestrahlung auf DZ hat. Im Folgenden wurden zur Beantwortung dieser Fragestellung *in vivo* die migratorischen Eigenschaften der DZ sowie die Fähigkeit der Zytokinproduktion *in vitro* nach akuter UVB-Bestrahlung untersucht.

#### **4.3.1 Auswanderung von dendritischen Zellen in die brachialen Lymphknoten**

Verantwortung für die immunsuppressiven Effekte nach UVB-Bestrahlung tragen vorwiegend multiple Veränderungen in Langerhanszellen (137). Zum



einen kann durch direkte UVB-induzierte DNS-Schäden, wie etwa die Formierung von CPD, die Apoptose in Langerhanszellen eingeleitet werden (140, 141). Desweiteren ist eine reduzierte Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wie etwa MHCII, B7 und ICAM auf Langerhanszellen zu beobachten (142–144). Dennoch können veränderte und geschädigte Langerhanszellen, sofern ihr Schädigung den Grenzwert für die Einleitung der Apoptose nicht überschreitet, in die hautdrainierenden Lymphknoten migrieren. Möglicherweise führen die UV-induzierten Veränderungen der Oberflächenmoleküle in Kombination mit einer verstärkten IL-10 Sekretion in der Haut zu einer Stimulierung einer  $T_{H2}$ -Immunantwort bei gleichzeitiger Suppression von  $T_{H1}$ -Zellen, die zu einem tolerogenen und somit immunsuppressiven Phänotyp führen (145–147).

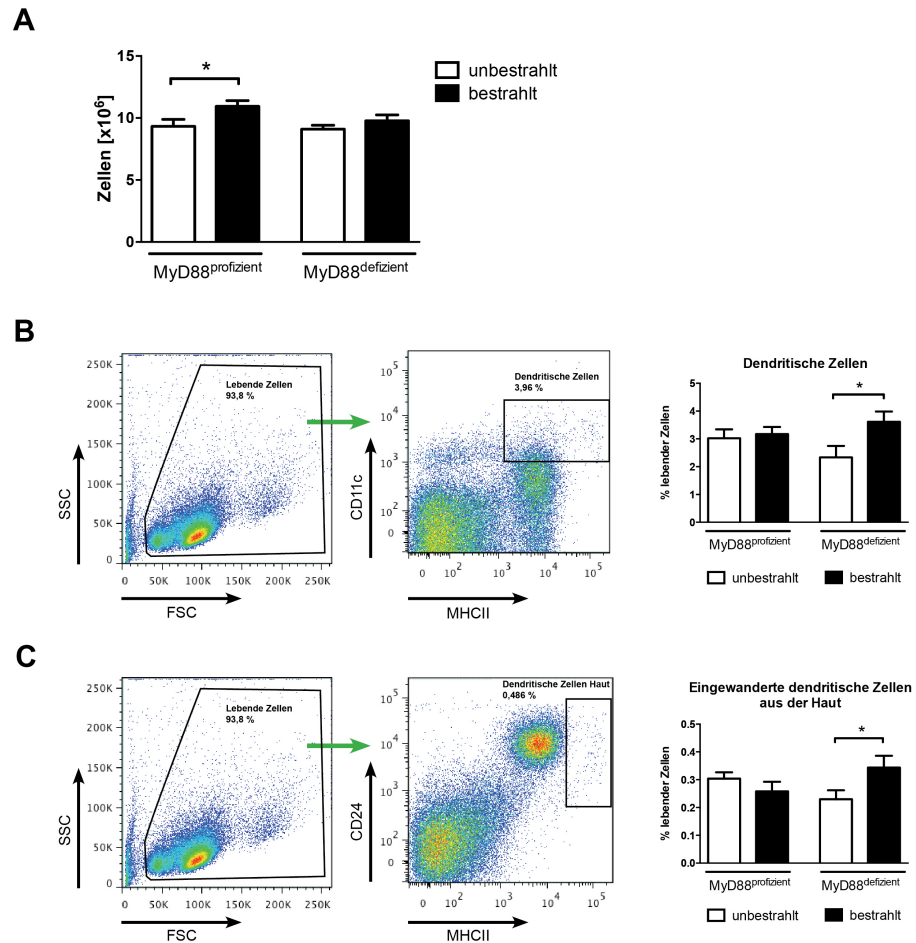
Um die Frage zu erörtern, welches migratorische Verhalten Langerhanszellen und dermale DZ nach akuter UVB-Bestrahlung aufweisen, wurden sowohl immunhistologische Färbungen der Haut als auch durchflusszytometrische Analysen der hautdrainierenden brachialen Lymphknoten durchgeführt. Hierfür wurden MyD88-profiziente sowie -defiziente Versuchstiere an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die Kontrolltiere wurden nicht bestrahlt jedoch ebenfalls einer Rasur unterzogen, damit mögliche bestrahlungsunabhängige Hautirritationen und die Aktivierung von epidermalen Zellen nicht fälschlicherweise auf die UVB-Bestrahlung zurückgeführt werden.

Die histologischen Untersuchungen sollten darüber Aufschluss geben, ob zum einen eine Reduktion und somit Auswanderung von Langerhanszellen aus der Epidermis nach UVB-Bestrahlung stattfindet und zum anderen diese Migration MyD88-abhängig ist. Für diese Analysen wurden Gefrierschnitte der unbestrahlten und bestrahlten murinen Rückenhaut mit Antikörpern gegen MHCII und Langerin (CD207) gefärbt, um Langerhanszellen eindeutig in der Epidermis zu identifizieren. Obwohl die beschriebene Färbung in unserer Arbeitsgruppe etabliert war, konnten in diesem Modell der akuten UVB-Bestrahlung auch nach mehrmaligen Färbeversuchen und Modifizierungen des Färbeprotokolls keine doppelt positiven Zellen in der Epidermis detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso waren keine MHCII<sup>+</sup> und Langerin<sup>+</sup> Zellen in der Dermis vorhanden. Dies könnte zwar ein Indiz für eine ausbleibende Migration

sein, scheint aber in Anbetracht der Tatsache, dass eine Subpopulation residen-ter dermalen DZ auch Langerin exprimiert, fragwürdig (148). Auch ist eine beobachtete und in der Literatur beschriebene reduzierte Expression von Oberflächenmarkern wie beispielsweise MHCII (142–144) nach UVB-Bestrahlung nicht der Grund für ein Fehlen der doppelt positiven Zellen, da eine Doppelfärbung ebenso in den unbestrahlten Kontrollen ausblieb.

Um dennoch eine Aussage über das Migrationsverhalten von DZ treffen zu können, wurden von den unbestrahlten und bestrahlten Mäusen die brachialen Lymphknoten entnommen und hinsichtlich der absoluten Zellzahl sowie der prozentualen Anteile an DZ durchflusszytometrisch untersucht (Abbildung 4–13).

Die Ermittlung der absoluten Zellzahl erfolgte mit der Neubauer Zählkammer. Wie in Abbildung 4–13A zu erkennen ist, konnten nach zweimaliger UVB-Bestrahlung lediglich marginale Veränderungen der Zellzahl in MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen verzeichnet werden. Auch waren keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen zu erkennen. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden die Zellsuspensionen der Lymphknoten mit Antikörpern gegen CD11c, MHCII und CD24 gefärbt. Hinsichtlich der Gesamtzahl an DZ in den brachialen Lymphknoten, die sowohl MHCII als auch CD11c exprimieren, war lediglich ein leichter prozentualer Anstieg von 2,5 % auf 3,5 % mit Bezug zur Anzahl lebender Zellen nach UVB-Bestrahlung erkennbar (Abbildung 4–13B). Da die CD24-Expression auf aktivierten MHCII<sup>++</sup> DZ der Haut strikt mit der Expression von Langerin korreliert (149), können durch ein entsprechendes gating dieser Population in die Lymphknoten eingewanderte DZ der Haut leicht identifiziert werden. Nach entsprechender Färbung konnte keine Einwanderung von aktivierten MHCII stark exprimierenden und zugleich CD24<sup>+</sup> Zellen in MyD88-profizienten Mäusen beobachtet werden (Abbildung 4–13C). Analog zu den Ergebnissen der Gesamtzahl an DZ war in Abwesenheit von MyD88 ein leichter Anstieg von aktivierten aus der Haut emigrierten DZ zu erkennen.



**Abbildung 4–13: Migration von DZ der Haut in die brachialen Lymphknoten nach UVB-Bestrahlung**

MyD88-profiziente und MyD88-defiziente Mäuse wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen dorsal mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Tiere verwendet. 20 h nach der zweiten Bestrahlung wurden die brachialen Lymphknoten präpariert und die Zellen isoliert. In **(A)** erfolgte die Bestimmung der Zellzahlen in den Lymphknotensuspensionen mittels Neubauer Zählkammer. **(B)** und **(C)** zeigen die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Analysen der Lymphknotenellen nach Inkubation mit Antikörpern gegen CD11c, MHCII und CD24. Während die Gesamtzahl der DZ mittels CD11c/MHCII-Färbung bestimmt wurde, erfolgte die Detektion der eingewanderten DZ über die Expression von MHCII und CD24. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05).

Basierend auf den Daten, die hier gewonnen wurden, kann keine umfassende Aussage über das Migrationsverhalten der DZ der Haut nach UVB-Bestrahlung getroffen werden. Die vielfach postulierte Auswanderung der DZ nach UVB-Bestrahlung konnte in diesem Modell nach den durchflußzytometrischen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Lediglich eine leichte Erhöhung der Anzahl migrierender DZ war in MyD88-defizienten Tieren zu erkennen. Welche Gründe für eine fehlende Auswanderung Verantwortung tragen, kann abschließend nur vermutet werden. Möglicherweise war die Bestrahlungs-

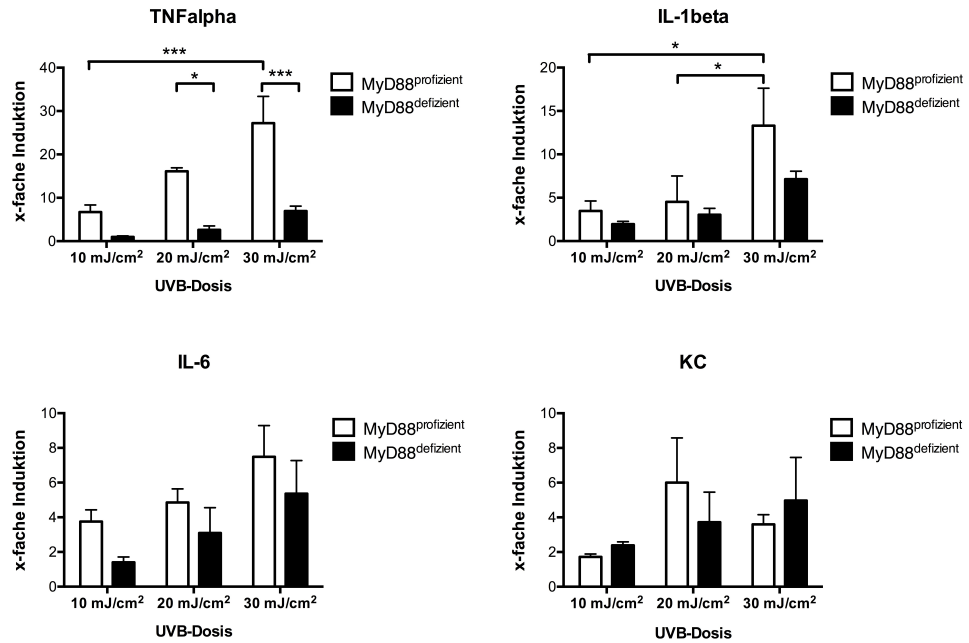
intensität so hoch, dass auswandernde Langerhanszellen und dermale DZ übermäßig geschädigt wurden und direkt oder auf dem Weg zu den Lymphknoten den programmierten Zelltod induzierten. Um eine genau Aussage darüber treffen zu können, ob die DZ der Haut auswandern und nur nicht im Lymphknoten ankommen oder aber der Stimulus für eine Auswanderung vielleicht auch zu gering ist, muss in nachfolgenden Experimenten geklärt werden.

#### 4.3.2 Aktivierung von ex vivo generierten dendritischen Zellen

Wie in Abschnitt 4.1 gezeigt, wird die UVB-induzierte Expression verschiedener Zytokine in der Haut sowohl MyD88-abhängig als auch -unabhängig gesteuert. Besondere Beteiligung an der Ausbildung des UVB-induzierten Zytokinprofils haben die epidermalen Keratinozyten (150, 151). Dennoch sind auch andere Zellen der Epidermis und Dermis dazu befähigt, Zytokine zu sekretieren und haben somit Einfluss auf das Zytokinprofil nach UVB-Bestrahlung. Ob mit den DZ eine weitere wichtige Zellpopulation der Epidermis und Dermis einen Anteil an der Zytokinexpression nach UVB-Bestrahlung besitzt, wurde an *ex vivo* generierten knochenmarksabgeleiteten DZ untersucht.

Für die Untersuchungen der Zytokinexpression von DZ wurden die generierten Zellen an Tag 6 der Kultivierung in PBS überführt und mit 10, 20, und 30 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die Kontrollzellen wurden ebenso in PBS überführt, blieben jedoch unbestrahlt. 4 h nach der Bestrahlung erfolgte die Isolierung der RNS aus den kultivierten und bestrahlten knochenmarksabgeleiteten DZ. Im weiteren Verlauf wurden q-PCR-Analysen durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 4–14 dargestellt sind. Für die Zytokine TNF-alpha, IL-1beta und IL-6 ließ sich eine dosisabhängige verstärkte Expression nach UVB-Bestrahlung nachweisen. Zudem zeigte sich, dass insbesondere die Expression der Zytokine TNF-alpha und IL-1beta stark MyD88-abhängig war. Interessanterweise war die Induktion von IL-6 nur schwach MyD88-abhängig. Möglicherweise ist in DZ eine MyD88-unabhängige Signaltransduktion für die Expression von IL-6 verantwortlich. Beispielsweise könnten TLR-unabhängige Mechanismen oder die TRIF-abhängige Signaltransduktion über TLR4 in die UVB-induzierte IL-6 Expression involviert sein. So konnte nach Infektion von Mäusen mit *Klebsiella pneumoniae* in Lungenlysaten von TRIF *knock-out* Mäusen eine wesentlich stärkere Suppression von IL-6 verglichen mit WT Mäusen ge-

funden werden als in gleichbehandelten MyD88 *knock-out* Tieren (152). Die Resultate der q-PCR Analysen für KC waren jedoch inkonsistent. Hier war weder eine dosisabhängige Wirkung der UVB-Strahlung erkennbar, noch konnte eine einheitliche MyD88-abhängige Expression festgestellt werden.



**Abbildung 4–14: RNS-Expression proinflammatorischer Zytokine in ex vivo generierten knochenmarksabgeleiteten DZ nach UVB-Bestrahlung**

Die Diagramme zeigen die mit q-PCR ermittelte RNS-Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine nach verschiedenen UVB-Dosen in knochenmarksgenerierten DZ *in vitro*. Die DZ wurden aus MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen generiert. Dargestellt ist die Expression von TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 und KC nach Bestrahlung mit 10, 20 und 30 mJ/cm<sup>2</sup>. Die Berechnung der x-fachen Induktion erfolgte immer mit Bezug zur jeweiligen Genotypkontrolle. Die Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001).

Die Expressionsanalysen der primären *ex vivo* generierten DZ zeigen, dass DZ durchaus in der Lage sind, aktiviert durch UVB-Strahlung verstärkt Zytokine zu bilden. Insbesondere die Zytokine TNF-alpha und IL-1beta waren stark exprimiert und wurden im Falle von TNF-alpha nahezu ausschließlich über MyD88-abhängige Signalwege induziert. Ob diese Ergebnisse auch *in vivo* Relevanz haben, muss möglichst durch Einkreuzung von CD11c-Cre bzw. Langerin-Cre Mäusen in den MyD88<sup>LSL</sup>-Stamm ermittelt werden. Hierdurch würden Mäuse generiert werden, die nur in allen CD11c<sup>+</sup> Zellen respektive Langerin<sup>+</sup> Zellen MyD88 exprimieren, so dass die Rolle der dendritischen Zellen in der Haut spezifisch analysiert werden kann.

#### 4.4 Systemische Entzündungsreaktion nach UVB-Bestrahlung

Neben UVB-induzierten lokalen Entzündungsreaktionen werden insbesondere bei langfristiger chronischer UV-Bestrahlung vielfach systemische immunsuppressive Effekte beschrieben (153–155). Dennoch kann UVB-Strahlung auch in akuten Bestrahlungsmodellen systemisch wirken (156, 157). Zumeist beschränkten sich diese Untersuchungen jedoch lediglich auf die Aktivierung und Inhibierung verschiedener T-Zell-Populationen. Da in diesem Bestrahlungsmodell eine starke MyD88-abhängige Neutrophileninfiltration in die Dermis nach akuter UVB-Bestrahlung beobachtet wurde, soll im Folgenden die Rolle dieser wichtigen Effektorzelle in Blut und Lunge näher untersucht werden.

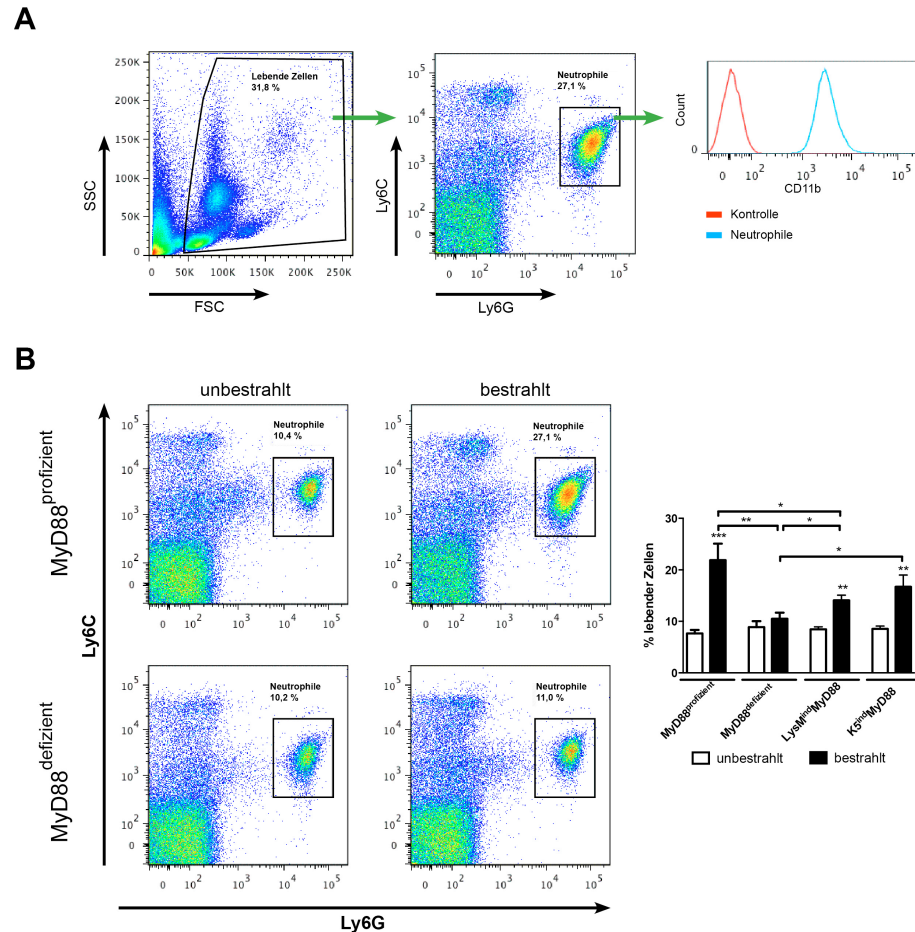
##### 4.4.1 Neutrophile und Monozyten im Blut

CD11b<sup>+</sup> Zellen, zu denen auch die Neutrophilen gehören, wurden nach UVB-Bestrahlung MyD88-abhängig in die Haut rekrutiert (siehe 4.1.2). Ob die beobachtete ausgebliebene Immigration von neutrophilen Granulozyten aus dem Blut in die Haut MyD88-defizienter Tiere lediglich auf einer verminderten Expression von chemotaktisch aktiven Mediatoren, wie z.B. KC oder CCL2, basiert oder auch ein vermindertes Auftreten von Neutrophilen im Blut für diese Resultate Verantwortung trägt, wurde in nachfolgenden Analysen erörtert.

Für die Bestimmung der Neutrophilenpopulation im Blut unbestrahlter und bestrahlter Mäuse wurden MyD88-profiziente und -defiziente Mäuse sowie die zelltypspezifisch in myeloiden Zellen und Keratinozyten exprimierenden MyD88 *knock-in* Tiere zweimal mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> an aufeinanderfolgenden Tagen bestrahlt. Aus dem per retroorbitaler Punktion gewonnenen Blut konnten in der Folge nach Erythrozytenlyse die zellulären Bestandteile per Zentrifugation pelletiert und die Zellsuspension nach Färbung mit Antikörpern gegen CD11b, Ly6C und Ly6G durchflusszytometrisch untersucht werden.

Wie die Analysen in Abbildung 4–15 zeigen, war nach UVB-Bestrahlung in MyD88-profizienten Tieren ein deutlicher und signifikanter Anstieg an Ly6G<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten zu verzeichnen. In MyD88-defizienten Mäusen fiel dieser Anstieg signifikant geringer aus. Wurde MyD88 in myeloiden Zellen respektive Keratinozyten reexprimiert, konnte ein signifikanter Anstieg an Neutrophilen nach UVB-Bestrahlung detektiert werden. Dieser fiel zwar in K5<sup>ind</sup>MyD88 Mäusen höher aus als in LysM<sup>ind</sup>MyD88 Mäusen, erreich-

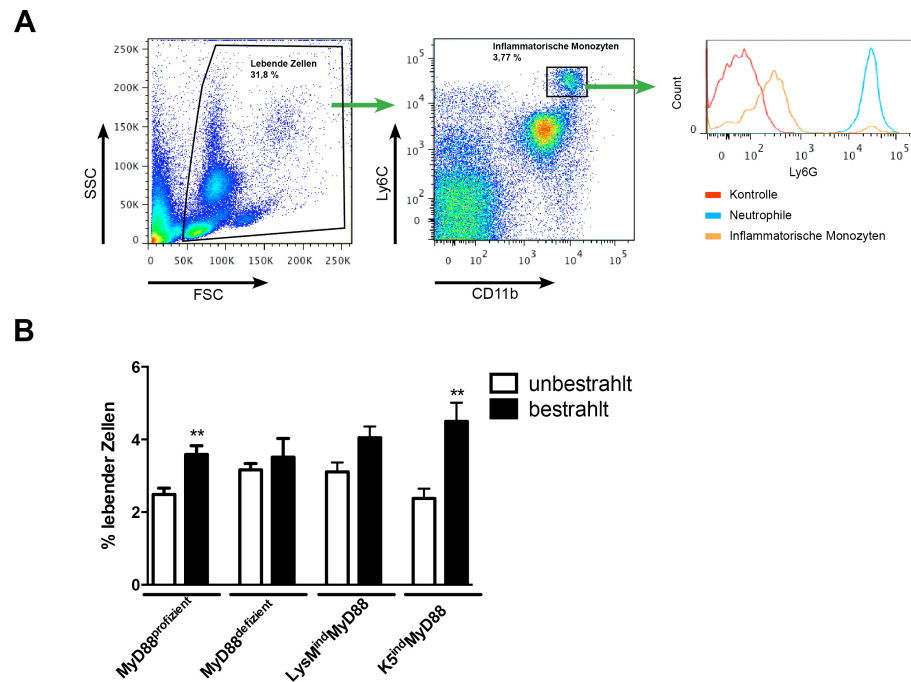
te jedoch nicht die Neutrophilenzahl der MyD88-profizienten Tiere. Demzufolge tragen MyD88-abhängige Signale sowohl von Keratinozyten als auch von myeloiden Zellen additiv zur systemischen Entzündungsreaktion nach UVB-Bestrahlung bei.



**Abbildung 4–15: Anzahl der Neutrophilen im Blut UVB-bestrahlter Mäuse**

Blutzellen von zweimalig mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten MyD88-profizienten und MyD88-defizienten sowie LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen wurden 20 h nach der Bestrahlung isoliert, mit anti-CD11b, -Ly6C und -Ly6G Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** beschreibt exemplarisch die Gating-Strategie für die Analyse der Neutrophilen. Das abgebildete Histogramm zeigt die CD11b-Expression der Ly6C<sup>+</sup> und Ly6G<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu ungefärbten Kontrollzellen. In **(B)** sind die prozentualen Anteile der Neutrophilen mit Bezug zu den lebenden Zellen dargestellt. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Mit Blick auf inflammatorische Monozyten, die als CD11b<sup>+</sup> und Ly6C<sup>+</sup> jedoch Ly6G<sup>-</sup> Zellen beschrieben werden (158, 159), konnten hinsichtlich der prozentualen Anteile im Blut zwar leichte Anstiege in allen Experimentalgruppen nach UVB-Strahlung ermittelt werden, die allerdings keine genotypspezifischen Unterschiede erkennen ließen (Abbildung 4–16).



**Abbildung 4–16: Anzahl der inflammatorischen Monozyten im Blut UVB-bestrahlter Mäuse**

Blutzellen von zweimalig mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten MyD88-profizienten und MyD88-defizienten sowie LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen wurden 20 h nach der Bestrahlung isoliert, mit anti-CD11b, -Ly6C und -Ly6G Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. **(A)** beschreibt exemplarisch die Gating-Strategie für die Analyse der inflammatorischen Monozyten. Das abgebildete Histogramm zeigt die mit ungefärbten Kontrollzellen vergleichbare Ly6G-Expression der inflammatorischen Monozyten im Gegensatz zur Ly6G-Expression in Neutrophilen. In **(B)** sind die prozentualen Anteile der inflammatorischen Monozyten mit Bezug zu den lebenden Zellen dargestellt. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*\*p < 0,01).

#### 4.4.2 Neutrophileninfiltration in die Lunge

Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren lediglich die Hälfte der reifen Neutrophilen im Blut, wohingegen die verbleibenden 50 % intravaskulär in Knochenmark, Milz, Leber und Lunge zu finden sind. Bei Infektionen oder Entzündungsreaktionen steigt nicht nur die Anzahl an zirkulierenden Neutrophilen im Blut sondern auch in diesen peripheren Organen an. Diese erhöhte Retention resultierend aus einer längeren Transitzeit durch verstärkte adhäsive Interaktionen mit den Endothelzellen dient auf der einen Seite dem Schutz der genannten Organe und auf der anderen Seite der schnellen Mobilisierung reifer Neutrophiler bei pathologischen Zuständen (160, 161).

Neben der MyD88-abhängigen Immigration von Neutrophilen in die UVB-bestrahlte Haut, konnten in dieser Arbeit ebenfalls Unterschiede in der Neutrophilenzahl im Blut nachgewiesen werden. Um herauszufinden, ob MyD88-

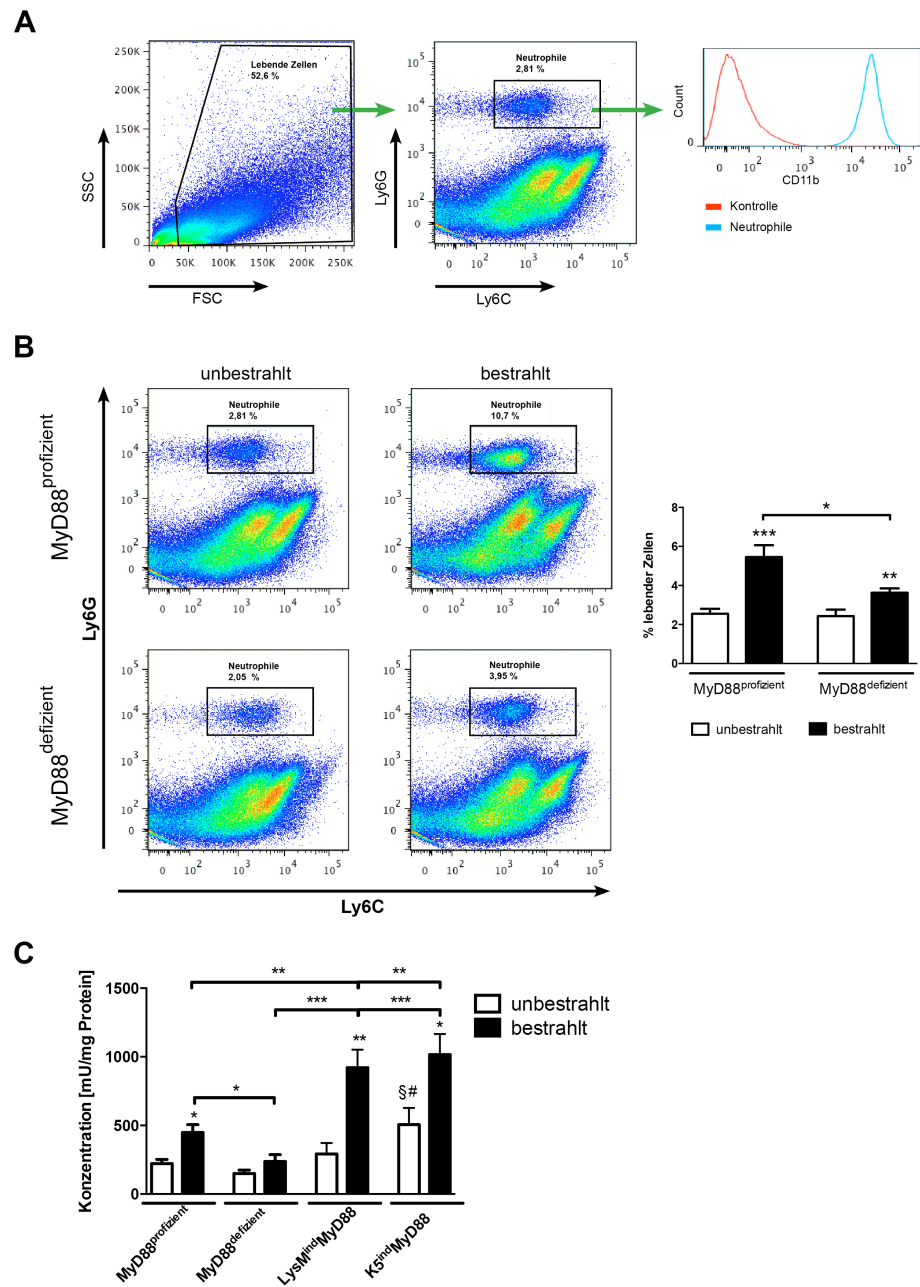


abhängig zudem Veränderungen der Neutrophilenzahl im Barrierorgan Lunge zu beobachten sind, wurden sowohl FACS-Analysen als auch Untersuchungen zur MPO-Aktivität des Lungengewebes durchgeführt.

Die FACS-Analysen zur Identifikation der Neutrophilen in der Lunge wurden nach Verdau des Lungengewebes und anschließender Isolierung der Zellen analog zu den durchflußzytomtrischen Untersuchungen des Blutes durchgeführt. Für die Messung der MPO-Aktivität wurde das Lungengewebe homogenisiert und die verdünnten Lungenlysate der unbestrahlten und bestrahlten Tiere eingesetzt, um die MPO-induzierte Farbreaktion zu stimulieren.

Wie in Abbildung 4–17B und C erkennbar, sind die Ergebnisse der FACS-Analysen und der MPO-Aktivität in MyD88-profizienten und -defizienten Versuchstieren in 3 unabhängigen Experimenten nahezu kongruent. Demzufolge besteht eine positive Korrelation zwischen der MPO-Aktivität und dem quantitativen Auftreten der Neutrophilen. Da die MPO-Aktivität somit ein valides Maß für die Neutrophilenzahl darstellt, wurden die weiteren Untersuchungen zur Neutrophilenzahl in der Lunge in  $\text{LysM}^{\text{ind}}$ MyD88- und  $\text{K5}^{\text{ind}}$ MyD88-Mäusen lediglich mittels Messung der MPO-Aktivität durchgeführt.

Sowohl in den Analysen zur MPO-Aktivität (Abbildung 4–17C) als auch in den durchflußzytomtrischen Analysen wurde nach UVB-Bestrahlung eine verstärkte MyD88-abhängige Einwanderung von Neutrophilen in die Lunge festgestellt. Auffällig ist jedoch, dass die MyD88-Expression in myeloiden Zellen wie in Keratinozyten ausreicht, um im Vergleich zu MyD88-profizienten Tieren nicht nur eine vergleichbare sondern sogar höhere MPO-Aktivität zu induzieren.



**Abbildung 4–17: Immigration von Neutrophilen in die Lunge UVB-bestrahlter Mäuse**

Lungen von zweimalig mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlten MyD88-profizienten und MyD88-defizienten sowie LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen wurden 20 h nach der Bestrahlung entnommen. Die Lungenzellen wurden isoliert, mit anti-CD11b, -Ly6C und -Ly6G Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zudem wurden Lungensysate hergestellt, in denen über eine kolorimetrische Messung die Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase bestimmt wurde. Die Dot-Plots in (A) beschreiben exemplarisch die Gating-Strategie für die Analyse der Neutrophilen. Das abgebildete Histogramm zeigt die CD11b-Expression der Ly6C<sup>+</sup> und Ly6G<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu ungefärbten Kontrollzellen. In (B) sind die prozentualen Anteile der Neutrophilen in MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen mit Bezug zu den lebenden Zellen dargestellt. (C) zeigt die Ergebnisse der MPO-Aktivitätsmessung, welche als valides Maß für die Neutrophilenanzahl herangezogen werden kann. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 2-3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; §: p < 0,05 für MyD88<sup>profizient</sup> vs. K5<sup>ind</sup>MyD88; #: p < 0,05 für MyD88<sup>defizient</sup> vs. K5<sup>ind</sup>MyD88).

Betrachtet man die hier erhaltenen Ergebnisse im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Neutrophilenanzahl in Haut und Blut, scheinen durch die Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen und Keratinozyten die notwendigen Signale für eine Emigration der Neutrophilen vom Knochenmark ins Blut sowie vom Blut in die Haut gegeben. Dennoch ist die Rekrutierung der Neutrophilen ins Blut und in die Haut im Vergleich zu MyD88-profizienten Tieren supprimiert. Möglicherweise fehlt ein zweites MyD88-abhängiges Signal anderer Zelltypen, welches für die Einwanderung der Neutrophilen in das Blut und in die Haut essentiell ist. Somit zirkulieren die Neutrophilen weiterhin im Blut und akkumulieren vermehrt in der Lunge. In weiteren Arbeiten muss nunmehr geklärt werden, warum die MyD88-abhängige Signaltransduktion in myeloiden Zellen sowie Keratinozyten nicht ausreicht, um die UVB-induzierte Immigration der Neutrophilen in die Haut zu steuern. Ebenfalls wäre interessant zu wissen, ob die vermehrte Einwanderung von Neutrophilen lediglich in die Lunge erfolgt oder aber die anderen Reservoirs für Neutrophile wie Leber, Milz und Knochenmark ebenfalls betroffen sind.

### **4.5 UVB-induzierte DNS-Schäden und Apoptose**

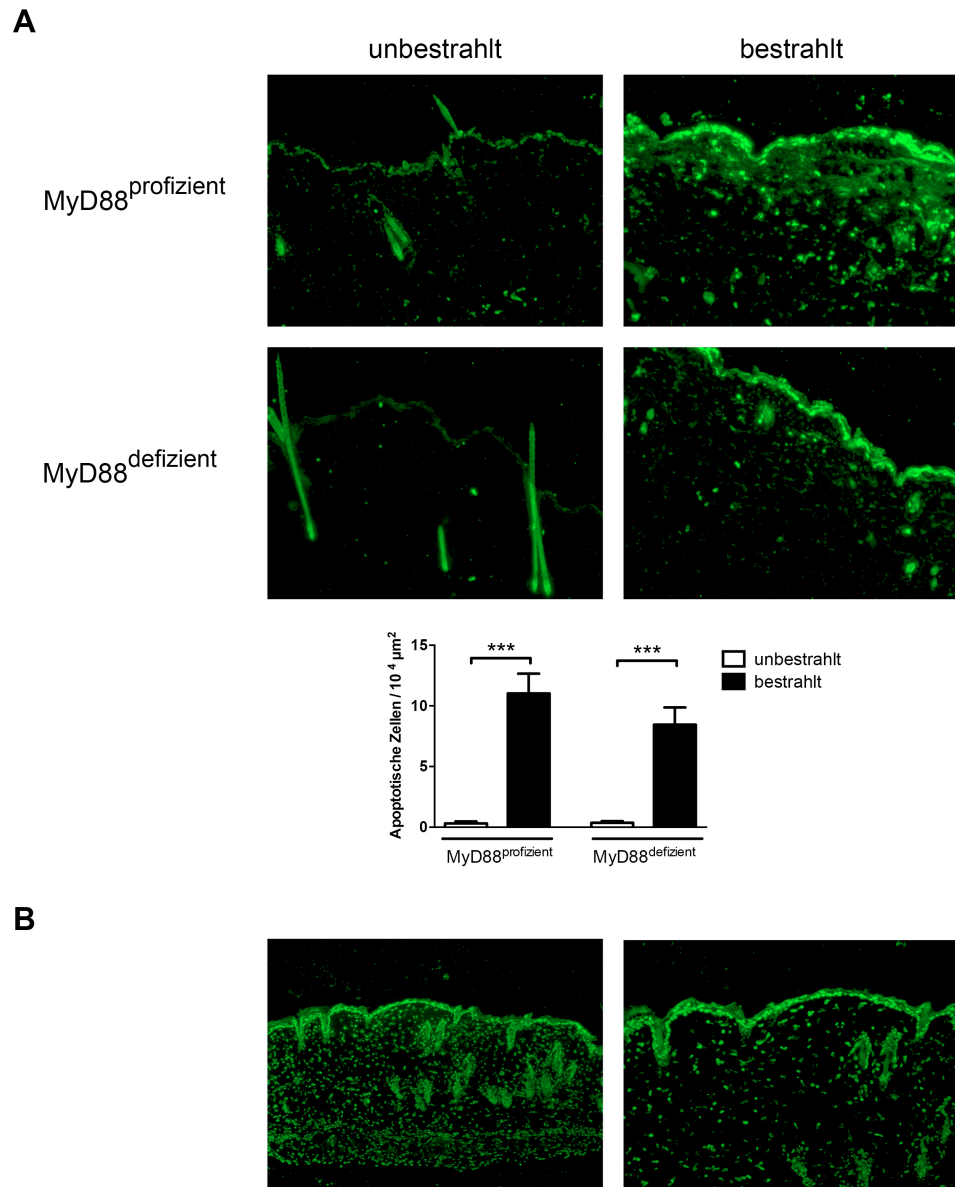
Akute UV-Strahlung führt, neben entzündlichen Reaktionen der betroffenen Hautareale, zur Entstehung von DNS-Schäden und programmiertem Zelltod. Die UV-induzierte Apoptose ist jedoch keineswegs ein für den Organismus durchweg negativer Vorgang. Vielmehr muss er als eine Art Präventionsmechanismus gegenüber malignen Veränderungen insbesondere in geschädigten Keratinozyten verstanden werden (59). Dennoch kann Apoptose wie etwa in Langerhanszellen der Haut bei wiederholter UVB-Bestrahlung durch die fehlende Auswanderung ebendieser in die hautdrainierenden Lymphknoten auch immunsuppressiv wirken (64). Um einen eventuellen direkten oder indirekten Einfluss von MyD88 auf die Einleitung der Apoptose oder die Entstehung von DNS-Schäden zu ergründen, wurden erneut MyD88-profiziente und -defiziente Tiere mit UVB-Strahlung behandelt und hinsichtlich der Apoptoserate und DNS-Schäden untersucht.

#### 4.5.1 Apoptoserate in bestrahlter muriner Rückenhaut

Eine vielfach genutzte Methode, um Apoptose in Geweben sichtbar zu machen, stellt die TUNEL-Färbung dar. Hierbei werden Fluorescein-markierte Nukleotide über eine Transferase an die beim Fragmentierungsprozess der DNS entstehenden freien Hydroxylgruppen (sog. *nicks*) gebunden, so dass apoptotische Zellen klar identifizierbar sind.

Die TUNEL-Färbung wurde auf Gefrierschnitten der Rückenhaut von Mäusen durchgeführt, die zuvor *in vivo* zweimalig mit einer Dosis von 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt wurden. Die anschließende Quantifizierung der apoptotischen Zellen erfolgte lediglich in der Epidermis, da die zum Teil zu starken Fluoreszenzsignale innerhalb der Dermis eine genaue und valide Auszählung unmöglich machten.

Wie in Abbildung 4–18A zu erkennen ist, zeigte sich nach UVB-Bestrahlung ein deutlicher Anstieg in der Anzahl apoptotischer Zellen. Fanden sich in den unbestrahlten Genotypkontrollen nur vereinzelt positive Zellen, so konnte nach Bestrahlung sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis eine große Anzahl apoptotischer Zellen detektiert werden. Nach Quantifizierung der apoptotischen Zellen in der Epidermis zeigten beide Genotypen einen signifikanten Anstieg nach UVB-Bestrahlung, der jedoch MyD88-unabhängig war. Ob die Apoptose nur in Keratinozyten oder auch in Langerhanszellen induziert wird, muss in weiteren Analysen näher erörtert werden. Dennoch kann vermutet werden, dass – basierend auf den Ergebnissen in Abschnitt 4.3.1 über die unveränderte Anzahl von emigrierten Langerhanszellen in die hautdrainierenden Lymphknoten – im vorliegenden Bestrahlungsmodell auch Langerhanszellen apoptotisch werden. Zudem scheinen weniger apoptotische Zellen in der Dermis präsent zu sein. Vor dem Hintergrund, dass jedoch auch das entzündliche Infiltrat in MyD88-defizienten Mäusen stark reduziert ist (siehe Abschnitt 4.1.2), erscheint eine Abhängigkeit von MyD88 unwahrscheinlich.



**Abbildung 4–18: Bestimmung der Apoptoserate in der Epidermis nach UVB-Bestrahlung**

MyD88-profiziente und MyD88-defiziente Mäuse wurden *in vivo* an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. 20 h nach der letzten Bestrahlung wurde die Rückenhaut gewonnen und die Apoptoserate in gefertigten Gefrierschnitten (200-fache Vergrößerung) bestimmt (**A**). Als Kontrolle wurde unbestrahlte Rückenhaut der entsprechenden Genotypen verwendet. In (**B**) sind die Positivkontrollen der TUNEL-Färbung nach DNS-Verdau mit DNase I in 100- und 200-facher Vergrößerung dargestellt. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*\*p < 0,001).

Abschließend kann festgehalten werden, dass UVB-Strahlung in der Epidermis sowie in den distalen Schichten der Dermis Apoptose induziert. Dennoch konnte kein Unterschied zwischen den untersuchten Genotypen festgestellt werden, so dass ein Einfluss von MyD88 auf die UVB-induzierte Apoptose ausgeschlossen werden kann.

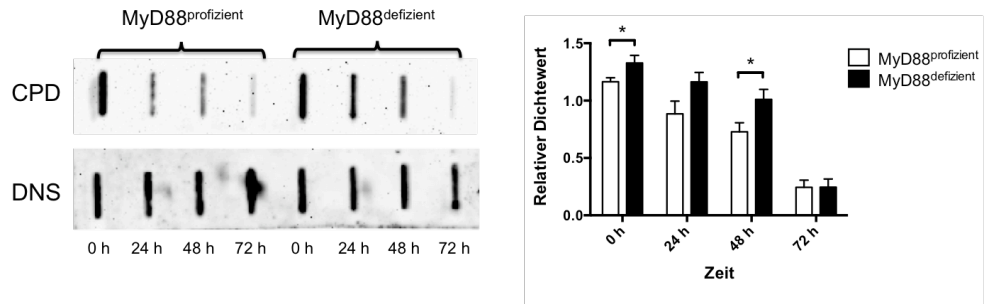
#### 4.5.2 Cyclobutanpyrimidin-Dimere

Sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung ist in der Lage, in epidermalen und dermalen Zellen der Haut vielfache DNS-Schäden hervorzurufen. Insbesondere die wesentlich energiereichere UVB-Strahlung kann aufgrund des Absorptionsmaximums der Purin- und Pyrimidinbasen direkt die DNS schädigen (86). Neben den (6-4)-Photoprodukten sind CPD der dominierende UVB-induzierte DNS-Schaden und machen mehr als 80 % der UV-Schäden durch UVB aus (104, 162, 163). CPD sind, bei nicht ausreichender Reparatur, verantwortlich für vielfältige Mutationen, die maligne Veränderungen und somit die Karzinogenese in der Haut begünstigen (104).

#### Formation und Reparatur von CPD

In Untersuchungen von SCHWARZ et al. (164) konnte nach intrakutaner Injektion von IL-18 *in vivo* eine verminderte CPD-Formation nach einmaliger UVB-Bestrahlung beobachtet werden. Da sowohl die Produktion als auch die Signaltransduktion von IL-18 MyD88-abhängig verläuft, wurde innerhalb dieser Arbeit in weiteren Analysen untersucht, ob MyD88 einen Einfluss auf die Entstehung und Reparatur von DNS-Schäden hat. Um diese Frage zu beantworten wurden MyD88-profiziente und -defiziente Tiere einmalig mit 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt und die Rückenhaut zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 h) nach der Bestrahlung entnommen. Aus der Rückenhaut wurde hiernach die DNS isoliert. Mittels *Southwestern blot* sowie geeigneten Antikörpern gegen CPD und die DNS wurde die Menge an CPD und der DNS als absolute Zahlenwerte bestimmt. Die gemessenen absoluten Intensitäten der DNS- und CPD-Banden dienten als Grundlage für die Berechnung des relativen Dichtewertes.

Anhand des exemplarischen *Blots* und der berechneten relativen Dichtewerte in Abbildung 4–19 ist ersichtlich, dass UVB-Strahlung unmittelbar (Zeitpunkt 0 h) CPD in der Haut der bestrahlten Tiere induzierte, deren Menge mit fortschreitender Zeit abnahm. Interessanterweise war die Menge an CPD direkt nach der Bestrahlung in MyD88-defizienten Tieren im Vergleich zu den MyD88-profizienten Mäusen signifikant erhöht. Betrachtet man hingegen die Effizienz der CPD-Reparatur, so konnte kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen beobachtet werden. Somit scheinen die zellulären Reparaturmechanismen, die vorwiegend auf NER beruhen dürften, MyD88-unabhängig eingeleitet zu werden.



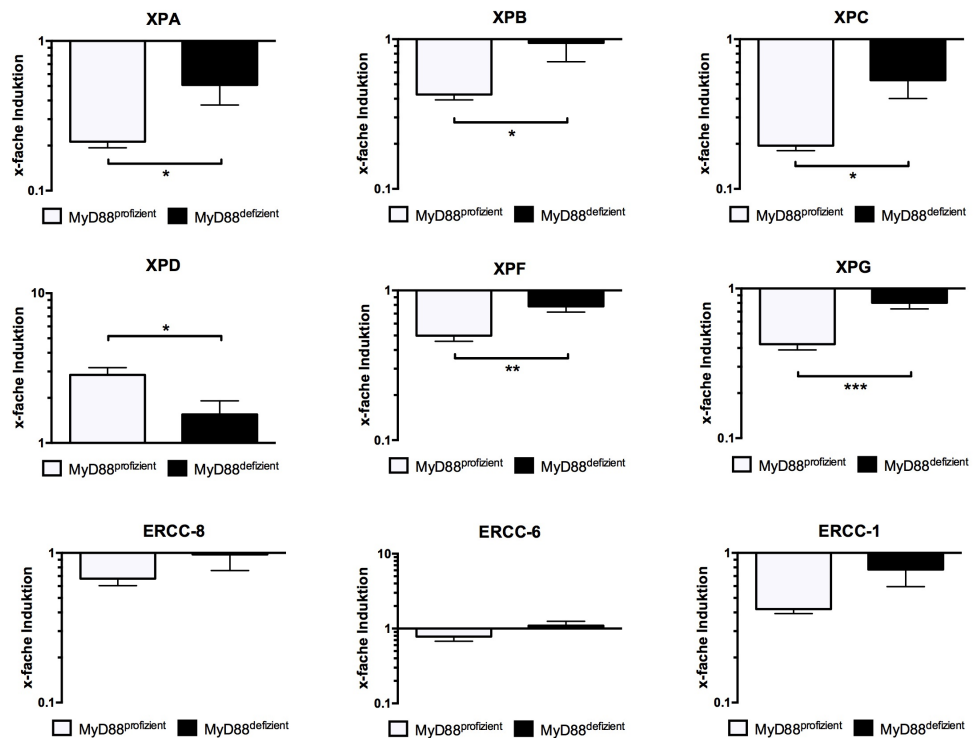
**Abbildung 4–19: Formation und Reparatur von CPD in der Rückenhaut von Mäusen nach UVB-Bestrahlung**

Um den DNS-Schaden in der Haut nach UVB-Bestrahlung zu quantifizieren, wurden MyD88-profiziente und -defiziente Mäuse einmalig mit 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde nach der Bestrahlung die Rückenhaut entnommen, genomische DNS isoliert und mittels *Southwestern blot* die Menge an CPD bestimmt. Die Normalisierung erfolgte mit einem anti-DNS Antikörper. Der relative Dichtewert beschreibt den Quotienten aus dem Dichtewert für CPD und DNS. Die dargestellten *blots* zeigen jeweils einen repräsentativen Versuch der genutzten Antikörper. Die ermittelten Daten stammen aus 4 unabhängigen Experimenten mit je 2 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05).

### Expression von Reparaturgenen

Um die Beobachtung MyD88-unabhängiger Reparaturmechanismen zu verifizieren, wurde weiterführend in q-PCR Analysen die Genexpression verschiedener an der NER beteiligter Proteine nach UVB-Bestrahlung untersucht (Abbildung 4–20). Hierbei wurden vorwiegend die Gene untersucht, die an den Phasen der initialen Schadenserkenkung und der Öffnung der DNS-Doppelhelix samt Entfernung der geschädigten Stelle beteiligt sind.

Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung nach Isolation der mRNS aus zweimalig bestrahlter Rückenhaut zeigten für fast alle untersuchten Gene eine verminderte Expression. Zudem war eine stärkere Suppression der Genexpression in MyD88-profizienten Tieren zu beobachten. Einzig die Expression von XPD ließ eine leichte Induktion der Genexpression erkennen, die in MyD88-profizienten Tieren geringfügig höher ausfiel als in MyD88-defizienten. ERCC-6 wurde nicht reguliert.



**Abbildung 4–20: Expression verschiedener Komponenten der NER nach UVB-Bestrahlung mittels q-PCR**

Die Diagramme zeigen die via q-PCR detektierte Expression verschiedenster Komponenten nach zweimaliger Bestrahlung mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> in der Rückenhaut MyD88-profizienter und -defizienter Tiere. Berechnet wurde die x-fache Induktion der Gene mit Bezug zu den unbestrahlten Genotypkontrollen. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Aufgrund der starken konstitutiven Expression der NER-Gene in beiden Genotypen, die anhand der Ct-Werte der unbestrahlten Kontrollen ableitbar sind, ist jedoch fraglich, ob die marginalen Veränderungen der Expression eine funktionelle Bedeutung haben. Zudem können posttranslationale Regulationsmechanismen, beispielsweise über die Acetylierung einzelner NER-Komponenten, die Aktivität der Proteine bestimmen (165). Auch könnte die erhöhte Apoptoserate nach zweimaliger Bestrahlung (siehe Abschnitt 4.5.1) einen negativen Einfluss auf Menge und Qualität der mRNS haben. Demnach sollten die Ergebnisse der q-PCR Analysen auch auf Proteinebene quantifiziert werden, um die genotypspezifischen Unterschiede beurteilen zu können.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass MyD88-defiziente Tiere nach einmaliger akuter UVB-Bestrahlung eine erhöhte Menge an CPD aufwiesen. Somit scheint eine Korrelation zwischen der MyD88-abhängigen Signaltransduktion



und der Menge an UVB-induzierten DNS-Schäden zu bestehen. Überdies scheint ein Einfluss von MyD88 auf die Reparaturmechanismen unwahrscheinlich. Dieser Schluss basiert auf der beobachteten gleichwertigen Behebung der CPD im *Southwestern blot* und den lediglich marginalen und zum Teil inversen Unterschieden (XPD) in der Expression verschiedener NER-Proteine.

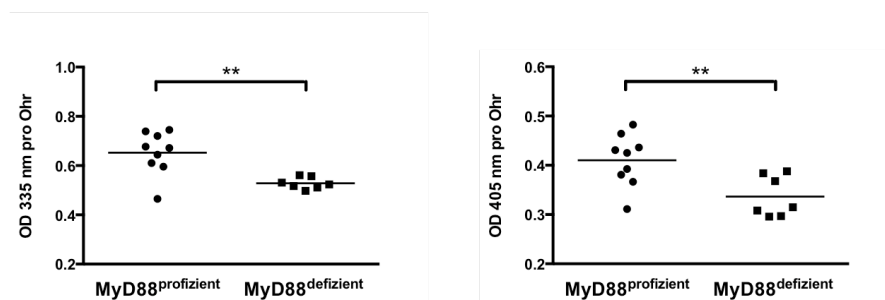
#### 4.5.3 Einfluss von Melanin auf die Entstehung von DNS-Schäden

Die im vorherigen Abschnitt durchgeführten Analysen zur Entstehung und Beseitigung von UVB-induzierten DNS-Schäden zeigten eine verstärkte initiale Bildung von CPD in MyD88-defizienten Mäusen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein verminderter Schutz gegen UV-induzierte DNS-Schäden in Abwesenheit des Signalgebers MyD88 besteht. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine abgeschwächte Melaninproduktion in Melanozyten sein. Melanin wird in der Haut in Form von Melanosomen an die umliegenden Keratinozyten abgegeben und legt sich dort schützend um die nukleare DNS. Durch Absorption und Streuung der in der schädigenden UV-Strahlung enthaltenen Energie kann Melanin die negativen Einflüsse einer übermäßigen UV-Strahlung vermindern (44).

Um herauszufinden, ob ein phänotypischer Unterschied hinsichtlich der Melaninproduktion in unbestrahlter Haut beider untersuchter Genotypen besteht, wurden Mausohren von MyD88-profizienten und -defizienten Tieren gewonnen. In diesem Experiment fanden Mausohren Verwendung, da zum einen der Melaningehalt in den Ohren höher ist als in der Rückenhaut und zum anderen die wenig behaarten Ohren nicht den haarzyklusabhängigen starken Schwankungen im Melaningehalt unterliegen (166, 167). Bei der Auswahl der Tiere wurde auf ein vergleichbares durchschnittliches Alter der Mäuse geachtet (MyD88-profizient: 55,2 Tage; MyD88-defizient: 57,4 Tage). Da die Tiere zur eindeutigen Identifikation im Tierhaus mit gestanzten Ohrlöchern markiert wurden, musste zudem die Auswahl der Mäuse so vorgenommen werden, dass die durchschnittliche Anzahl an Ohrlöchern in beiden Genotypen einheitlich war (MyD88-profizient: 1,44 Löcher pro Maus; MyD88-defizient: 1,49 Löcher pro Maus). Nach Extraktion des Melanins aus den Ohren wurde der Melaningehalt photometrisch im Rahmen einer Doppelbestimmung bei 335 nm gemessen. Da in der Literatur häufig die Absorption von Melanin bei 405 nm

bestimmt wurde (112, 168, 169), erfolgte aus Gründen der Vergleichbarkeit zusätzlich eine Messung bei dieser Wellenlänge.

Die in Abbildung 4–21 dargestellten Ergebnisse der Melaninmessung zeigten sowohl bei 335 nm als auch bei 405 nm signifikant reduzierte Mengen Melanin in MyD88-defizienten Tieren. Lediglich die absoluten ermittelten Absorptionswerte bei 405 nm sowie die Streuung ebendieser unterschieden sich geringfügig von den bei 335 nm detektierten Werten. Diese kleine Diskrepanz beruht auf dem Umstand, dass bei 335 nm ein Absorptionsmaximum von Melanin vorliegt. Zudem absorbieren Eumelanin und Phäomelanin je nach Wellenlänge der einfallenden Strahlung diese unterschiedlich stark, so dass hierdurch geringfügige Schwankungen auftreten können. Die Resultate stärken aber trotz dessen die Vermutung, dass eine verminderte Melaninproduktion in MyD88-defizienten Tieren ursächlich für die erhöhte Empfänglichkeit gegenüber DNS-Schäden ist.



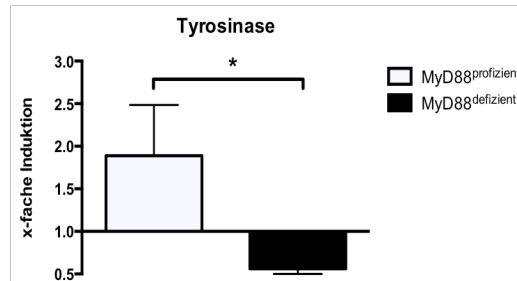
**Abbildung 4–21: Kolorimetrische Bestimmung des Melaningehalts in Mausohren**

Die Melaninbestimmung erfolgte in Mausohren von unbestrahlten MyD88-profizienten sowie MyD88-defizienten Mäusen. Die beiden Diagramme zeigen die mittels Spektrophotometer detektierte Absorption des melaninhaltigen Extrakts bei 335 nm und 405 nm. Die Experimentalgruppen bestehen aus 7 und 9 Tieren (\*\*p < 0,01).

Fraglich ist jedoch, welcher MyD88-abhängige Signaltransduktionsweg direkt oder indirekt verantwortlich für die Stimulierung der basalen Melaninproduktion ist. Ein wichtiges Enzym, welches sowohl die Eumelanin und Phäomelanin-synthese innerhalb der Melanogenese kontrolliert, ist die Tyrosinase. Der obligatorische Schritt dieser Dioxygenase ist die Hydroxylierung von Tyrosin zu Dopaquinon, eine Vorstufe des Melanins (170).

Um mögliche Unterschiede in der Expression der Tyrosinase zu identifizieren, wurde deren Expression mittels q-PCR analysiert. Es zeigte sich jedoch, dass keinerlei genotypische Unterschiede in der Tyrosinaseexpression in den unbe-

strahlten Kontrollen zu finden waren (Daten nicht gezeigt). Es konnte eine leichte, jedoch signifikant verstärkte Induktion der Genexpression nach zweimaliger UVB-Bestrahlung in MyD88-profizienten Mäusen detektiert werden (Abbildung 4–22).



**Abbildung 4–22: Genexpression der Tyrosinase nach UVB-Bestrahlung**

Die Abbildung zeigt die Expression der Tyrosinase nach zweimaliger Bestrahlung mit je 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> in der Rückenhaut MyD88-profizienter und -defizienter Tiere. Da zwischen den unbestrahlten Kontrollen keine genotypspezifischen Unterschiede zu erkennen waren, wurde die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten Genotypkontrollen berechnet. Die ermittelten Daten stammen aus 3 unabhängigen Experimenten mit je 3 Mäusen pro Experimentalgruppe (\*p < 0,05).

Schlußendlich konnte gezeigt werden, dass MyD88-abhängige Signalwege einen erhöhten Schutz gegenüber UVB-induzierten DNS-Schäden bieten. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass in MyD88-profizienten Tieren ein höherer basaler Melaningehalt in der Haut vorzufinden ist. Ob die Tyrosinase MyD88-abhängig zu diesem stärkeren Basallevel beiträgt, konnte nicht abschließend geklärt werden. Obwohl bezüglich der Expressionslevel der Tyrosinase im unbestrahlten Zustand keine Unterschiede zu erkennen waren, kann dennoch eine Beteiligung der Tyrosinase an dem erhöhten Melaninlevel nicht ausgeschlossen werden. So ist die Aktivität der Tyrosinase nicht zwangsläufig abhängig von einer erhöhten absoluten Menge Protein, sondern wird vielmehr konstitutiv exprimiert und durch posttranslationale Phosphorylierung aktiviert (171, 172).

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Rolle des Signalgebers MyD88 bei der UVB-induzierten lokalen Entzündungsreaktion

UVB-Bestrahlung führt in den betroffenen Hautarealen zu zahlreichen molekularen und zellulären Veränderungen. Neben der Bildung verschiedenster pro- und antiinflammatorischer Mediatoren sind Veränderungen der Zusammensetzung und Aktivierung hautresidenter Zellpopulationen charakteristisch für die UVB-induzierte Entzündungsreaktion (115, 132). Als zentrales Adaptorprotein des angeborenen Immunsystems wurde die Rolle von MyD88 bei den beschriebenen entzündlichen Hautveränderungen induziert durch UVB-Strahlung erörtert.

#### 5.1.1 Zytokinproduktion in bestrahlter Maushaut

Die durchgeführten Untersuchungen zur UVB-induzierten Entzündungsreaktion ließen eine Abhängigkeit von MyD88 erkennen. Sowohl die Zytokine IL-1beta und IL-6 als auch die Chemokine KC und CCL2 zeigten eine supprimierte Expression in MyD88-defizienten Mäusen. Während durch Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen und Keratinozyten die Sekretion von KC und CCL2 nach UVB-Bestrahlung partiell wiederhergestellt werden konnte, trug die MyD88-abhängige Signaltransduktion in beiden Zelltypen nicht zur Produktion von IL-1beta und IL-6 bei.

Da murine Keratinozyten im Gegensatz zu humanen kein IL-1beta produzieren (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe) war auch durch Reexpression von MyD88 in diesem Zelltyp in der Gesamthaut keine erhöhte IL-1beta-Sekretion zu erwarten. Makrophagen und Neutrophile hingegen sind in der Lage IL-1beta zu produzieren (173, 174). Dennoch konnte keine erhöhte Proteinexpression von IL-1beta in  $LysM^{ind}$ MyD88-Mäusen in diesem Modell der akuten UVB-Bestrahlung detektiert werden. Für die erhöhte UV-induzierte IL-1beta-Produktion müssen somit MyD88-abhängige Signalwege in weiteren Zelltypen wie Fibroblasten oder Mastzellen verantwortlich sein. Durch TLR4-induzierte Stimulation von kultivierten Mastzellen konnte beispielsweise eine erhöhte Expression von IL-1beta erzielt werden (175). Auch konnte in dieser Arbeit *in vitro* eine teilweise MyD88-abhängige Expression von IL-1beta in knochenmarksabgeleiteten DZ beobachtet werden, so dass auch DZ, wie

etwa dermale DZ, zur IL-1beta-Sekretion *in vivo* beitragen könnten. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass zur Expression von IL-1beta in Makrophagen und Neutrophilen weitere MyD88-abhängige Signale von anderen Zelltypen, die in den verwendeten Mauslinien kein MyD88 exprimieren, notwendig sind.

In Analysen von GAIS et al. (108) konnte in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis die supprimierte systemische Produktion von IL-6 in MyD88-defizienten Mäusen durch Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen ebenfalls nicht wiederhergestellt werden. Dies steht im Einklang mit den erhaltenen Ergebnissen der IL-6-Expression in der Haut von LysM<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen. In humanen Mastzellen wurde durch IL-1beta gezielt die IL-6-Produktion stimuliert (176, 177). Auch konnte nach Induktion einer lokalen bzw. systemischen Entzündungsreaktion in IL-1beta-defizienten Mäusen eine stark verminderte IL-6 Produktion gemessen werden (178, 179). Möglicherweise ist die Abwesenheit von IL-1beta ausschlaggebend für die stark verminderte Sekretion von IL-6 in Keratinozyten und myeloiden Zellen nach UVB-Bestrahlung.

### 5.1.2 Infiltration von Entzündungszellen

#### Infiltration von Neutrophilen

MyD88-profiziente Mäuse zeigten nach UVB-Bestrahlung eine starke Infiltration von CD11b<sup>+</sup> Entzündungszellen. Bei fehlender MyD88-Signaltransduktion konnte hingegen keine Migration von myeloiden Zellen in die bestrahlten Hautareale beobachtet werden. Auch durch Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen oder Keratinozyten waren nur geringfügige Steigerungen der Infiltration von CD11b<sup>+</sup> Zellen erkennbar.

Die lokale Infiltration von Neutrophilen ist stark kontrolliert durch die Zytokine *macrophage inflammatory protein 2* (MIP-2) und KC (180, 181), deren Expression nach Infektionen stark MyD88-abhängig ist (108, 182). In dieser Arbeit konnte nach UVB-Bestrahlung ebenfalls eine MyD88-abhängige Expression von KC gezeigt werden. Die verminderte Synthese von KC bei MyD88-Defizienz könnte die fehlende Einwanderung der Neutrophilen erklären. In Analysen von KHAJAH et al. (183) wurde mit GM-CSF eine weiteres Zytokin mit chemotaktischen Eigenschaften auf die extravaskuläre Rekrutierung von Neutrophilen ermittelt. In den eigenen Analysen zur Zytokinexpression *in ex*

*in vivo* generierten Keratinozyten war bei MyD88-Defizienz keine GM-CSF-Produktion nachweisbar. Somit könnte auch dieses Zytokin in die supprimierte Neutrophileninfiltration in MyD88-defizienten Mäusen *in vivo* involviert sein. Auch das von Keratinozyten und Fibroblasten produzierte Alarmin IL-33, welches als Mitglied der IL-1-Familie ebenfalls MyD88 für die Signaltransduktion benötigt, kann eine Immigration von Neutrophilen nach UVB-Bestrahlung fördern (78). In Mastzellen kann diese IL-33-abhängige Aktivierung von NF-kappaB unter anderem zur verstärkten Produktion von IL-1beta, TNF-alpha und MIP-2 führen (184).

Neben der extravaskulären Migration der Neutrophilen entlang des Konzentrationsgradienten der lokal produzierten Chemokine zum Entzündungsherd sind für die Rekrutierung aus dem Blut verschiedene Adhäsionsmoleküle der Integrin- und Selektinfamilie notwendig (124). Verantwortung für eine Aufregulation und Aktivierung der Adhäsionsmoleküle tragen vorwiegend inflammatorische Mediatoren, wie die durch UVB-Strahlung induzierbaren Zytokine TNF-alpha und IL-1beta (185). So ist TNF-alpha beispielsweise in der Lage die Expression von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 zu induzieren (82, 186), während IL-1beta vorwiegend die für die endotheliale Transmigration notwendige Expression von *junctional adhesion molecule 1* und *platelet endothelial cell adhesion molecule* stimuliert (187). Sowohl die verminderte Proteinexpression von IL-1beta in der Haut von MyD88-defizienten Mäusen als auch von LysM<sup>ind</sup>MyD88- und K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen könnte somit einen negativen Einfluss auf die Expression von Adhäsionsmolekülen haben und die verminderte Infiltration von CD11b<sup>+</sup> Zellen nach UVB-Bestrahlung erklären.

### **Infiltration von Mastzellen**

Die UVB-induzierte Erhöhung der Mastzellzahl in der Dermis ist ebenfalls bedingt durch MyD88-abhängige Signale in Keratinozyten sowie Makrophagen und Neutrophilen. COLLINGTON et al. (188) konnten zeigen, dass CCL2 die Rekrutierung von Mastzellen in die Lunge fördert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die CCL2-Sekretion hauptsächlich durch MyD88-abhängige Signaltransduktion in Keratinozyten und myeloiden Zellen induziert wird. Somit könnte die fehlende Einwanderung von Mastzellen nach UVB-Bestrahlung in MyD88-defizienten Tieren auf die supprimierte CCL2-Sekretion in Keratinozyten und myeloiden Zellen zurückgeführt werden. Zudem besteht die Vermutung, dass das stark MyD88-abhängig gebildete KC ebenfalls an der

Rekrutierung von Mastzellen beteiligt ist (189). Weiterhin kann von Keratinozyten als Antwort auf UVB-Bestrahlung sekretiertes IL-15 die Migration von Mastzellen steuern (190). Da die Expression von IL-15 zudem MyD88-abhängig induziert werden kann (191), ist ein Einfluss dieses Zytokins auf die UVB-induzierte Mastzellrekrutierung ebenfalls denkbar.

### 5.1.3 Aktivierung von Keratinozyten

Sowohl die verstärkte Zytokinexpression in Keratinozyten als auch ihr hyperproliferativer Status nach UVB-Bestrahlung sind maßgeblich auf eine MyD88-abhängige Signaltransduktion zurückzuführen. Während die durch UVB-induzierte Akanthose in MyD88-defizienten Mäusen marginal war, konnte sie durch Reexpression von MyD88 in Keratinozyten, aber auch in myeloiden Zellen, partiell wiederhergestellt werden. Es ist beschrieben, dass insbesondere IL-1beta für die Initiation der Keratinozytenaktivierung und -proliferation verantwortlich ist (33). Obwohl eine Expression von IL-1beta in K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen kaum messbar war, konnte dennoch eine signifikant verstärkte Akanthose nach UVB-Bestrahlung beobachtet werden. Somit scheinen andere Mediatoren kompensatorisch die fehlende IL-1beta induzierte Aktivierung der Keratinozyten zu übernehmen. Beispielsweise kann GM-CSF, welches unter anderem MyD88-abhängig von Keratinozyten gebildet wird, nach einem Trauma direkt die Proliferation von Keratinozyten stimulieren (192, 193). Auch zeigten Mäuse, die defizient für den KC-Rezeptor CXCR2 waren, eine verspätete Reepithelisierung nach Induktion einer Wunde (194). Zudem berichteten LOW et al. (195) über eine reduzierte Wundheilung in CCL2-defizienten Mäusen. Diese Daten lassen vermuten, dass die ebenfalls in Keratinozyten MyD88-abhängig gebildeten und durch UVB-Bestrahlung induzierbaren Chemokine CCL2 und KC einen autokrinen Einfluss auf die Proliferation und Aktivierung der Keratinozyten haben können.

Die initiale Aktivierung der Keratinozyten kann ebenso durch sterile Gefahrensignale erfolgen. Diese durch UVB-Strahlung induzierten DAMP können direkt an TLR binden und MyD88-abhängig ebenfalls die Zytokinsynthese regulieren (9). HMGB1 ist beispielsweise in der Lage über TLR4/MyD88-induzierte Signaltransduktion in myeloiden Zellen die Aktivierung und Proliferation von Keratinozyten zu induzieren (132). Auch die in Folge von UV-Strahlung ver-

mehrt in Keratinozyten, aber auch in anderen Zellen wie Granulozyten und Makrophagen, exprimierten TLR4-Liganden *myeloid-related protein* (Mrp) 8 und Mrp14 haben Einfluss auf die Induktion und Regulation der Entzündungsreaktion via autokriner und parakriner Mechanismen (196–198). In humanen Keratinozyten konnte nach Stimulierung mit rekombinantem Mrp8 und Mrp14, neben einer verstärkten Proliferation der kultivierten Zellen, eine Hochregulation verschiedenster Chemokine und Zytokine beobachtet werden, die ihrerseits in Form einer positiven Rückkopplung die Mrp-Expression fördern (199). Somit scheinen neben der klassischen Keratinozytenaktivierung über IL-1beta ebenfalls alternative Aktivierungen durch verschiedene UVB-induzierte Zytokine und Gefahrensignale zu der beobachteten Akanthose und Entzündungsreaktion zu führen.

## 5.2 Systemischer Einfluss der Signaltransduktion von MyD88 nach UVB-Bestrahlung

### Rekrutierung Neutrophiler ins Blut

In den Untersuchungen zur Neutrophilenrekrutierung aus dem Knochenmark ins Blut war nach UVB-Bestrahlung in MyD88-profizienten Tieren ein deutlicher Anstieg neutrophiler Granulozyten zu erkennen, der in MyD88-defizienten Mäusen signifikant geringer ausfiel. Durch Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen respektive Keratinozyten konnte die Neutrophilenmigration ins Blut verstärkt werden. Die Infiltration von inflammatorischen Monozyten ins Blut zeigte hingegen lediglich leichte und vergleichbare Anstiege in allen Experimentalgruppen.

Die Granulopoese und Neutrophilenrekrutierung vom Knochenmark ins Blut ist vorwiegend abhängig von den hämatopoetischen Zytokinen *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) und *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1) sowie den Chemokinen MIP-2 und KC (200–203). Während das konstitutiv von Osteblasten gebildete SDF-1 durch Interaktion mit seinem Rezeptor CXCR4 Neutrophile im Knochenmark zurückhält, fördern die in Endothelzellen produzierten Liganden MIP-2 und KC hingegen die Mobilisierung der Neutrophilen (204). Ausschlaggebender Stimulus für die rasche Rekrutierung von reifen Neutrophilen aus dem Knochenmark ins Blut bei lokalen oder systemischen pathologischen Zuständen ist die verstärkte Expression von G-CSF. Es gilt als wahrscheinlich, dass dies zu einer Reduzierung der absoluten Zahl an Osteblasten



und somit zu einer Suppression der CXCR4/SDF-1-Achse bei gleichzeitiger verstärkter Expression von KC und MIP-2 in den Endothelzellen führt (200, 203). Zusätzlich zu den beschriebenen Vorgängen innerhalb des Knochenmarks können auch proinflammatorische Mediatoren aus dem peripheren Gewebe für die Modulation der Neutrophilenauswanderung aus dem Knochenmark verantwortlich sein. In einem Modell der akuten Peritonitis war 2 h nach Thioglycolatinjektion eine deutliche Erhöhung der Neutrophilenanzahl im Peritonium um das 4,5 fache nachweisbar. Durch intraperitoneale Injektion blockierender Antikörper gegen KC, MIP-2 oder G-CSF konnten signifikant reduzierte Mengen von Neutrophilen im Blut beobachtet werden. Auch war durch intravenöse Verabreichung von rekombinantem KC, MIP-2 und G-CSF zur Simulation eines pathologischen Zustandes eine verstärkte Mobilisierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark ins Blut nachweisbar. Demnach sind die lokal am Ort der Entzündung gebildeten Chemokine KC, MIP-2 und G-CSF in der Lage eine verstärkte Mobilisierung von knochenmarkresidenten Neutrophilen ins Blut zu initiieren (203). Dennoch haben auch weitere am Ort der Entzündung sekretierte Mediatoren Einfluss auf die Mobilisierung der Neutrophilen aus dem Knochenmark. So wurde eine verstärkte Expression des in der Peripherie hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen sekretierten G-CSF (205) durch Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS sowie mit IL-1 und TNF-alpha in alveolaren Makrophagen beobachtet (206). Auch war in murinen peritonealen Neutrophilen durch eine erhöhte Synthese von Prostaglandin E<sub>2</sub> - ein Mediator, der unter anderem durch MyD88-Signaltransduktion verstärkt induzierbar ist (207) - eine Stimulation der G-CSF-Produktion nachweisbar (208). In Untersuchungen von BALD et al. (132) konnten wir in einem akuten Bestrahlungsmodell mit erythermalen Bestrahlungsdosen zeigen, dass auch eine verstärkte Abgabe von HMGB1 UVB-geschädigter Keratinozyten durch TLR4/MyD88-abhängige Signaltransduktion in myeloiden Zellen die Anzahl an Neutrophilen im Blut erhöhen kann.

Dass eine intakte MyD88-vermittelte Signaltransduktion, insbesondere in Keratinozyten, aber auch in myeloiden Zellen für die Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf notwendig ist, konnte in der vorliegenden Arbeit herausgestellt werden. Verantwortung hierfür trägt wahrscheinlich hauptsächlich das in der bestrahlten Rückenhaut von Keratino-

zyten MyD88-abhängig gebildete KC. Da durch Reexpression von MyD88 in Keratinozyten zwar eine verstärkte, jedoch nicht das Niveau der MyD88-profizienten Tiere erreichende Neutrophilie nach UVB-Bestrahlung hervorgerufen werden konnte, müssen zudem andere MyD88-abhängige Signaltransduktionswege in weiteren Zelltypen Einfluss auf die Migration von Neutrophilen ins Blut haben. So könnte beispielsweise die verminderte IL-1beta-Sekretion in K5<sup>ind</sup>MyD88-Mäusen eine verminderte G-CSF-Produktion zur Folge haben. Zudem scheint eine MyD88-abhängige Signaltransduktion in myeloiden Zellen als Antwort auf UVB-induzierte Gefahrensignale in die verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen in den Blutkreislauf involviert zu sein.

### **Rekrutierung von Monozyten ins Blut**

Anders als bei der Neutrophileninfiltration wird die Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten bei entzündlichen Prozessen durch die Interaktion von *chemokine (C-C motif) receptor* (CCR) 2 mit den Liganden CCL2 und CCL7 induziert (209–211). Trotz starker genotypspezifischer Unterschiede hinsichtlich der CCL2-Konzentration in der Haut bestrahlter Mäuse waren keine Unterschiede an zirkulierenden Monozyten im Blut erkennbar. Scheinbar hat die lokale CCL2-Sekretion nach UVB-Bestrahlung keinen Einfluss auf die Rekrutierung der inflammatorischen Monozyten vom Knochenmark ins Blut. Zudem fanden SHI et al. (212) heraus, dass die CCL2-Produktion nach Infektionen auch in Stromazellen des Knochenmarks induziert wird. Diese als mesenchymale Stammzellen (213) und *chemokine (C-X-C motif) ligand* (CXCL) 12-*abundant reticular* (CAR) *cells* (214) identifizierten Zellpopulationen exprimieren TLR und sind in der Lage auf kleinste Konzentrationen von zirkulierenden TLR-Liganden mit einer erhöhten Produktion an CCL2 zu reagieren (212). Dennoch scheint dieser Mechanismus in dem vorliegenden Modell der akuten UVB-Bestrahlung keine Relevanz zu haben. Auch konnte in Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes* eine verstärkte Monozytose als Antwort auf eine erhöhte Expression von Typ I IFN beobachtet werden (215). Somit könnten nach UVB-Bestrahlung MyD88-unabhängige Kontrollmechanismen, wie etwa eine TRIF-abhängige Produktion proinflammatorischer Zytokine, für die in dieser Arbeit herausgestellte Monozytose verantwortlich zu sein.

### **Pulmonale Migration von Neutrophilen**

Pathologische Zustände mit systemischen Auswirkungen führen unabhängig vom betroffenen Organ zu einer verstärkten pulmonalen Akkumulation von Neutrophilen (216, 217). In den Analysen dieser Arbeit konnte nach UVB-

Bestrahlung ebenfalls eine verstärkte Infiltration von Neutrophilen in die Lunge beobachtet werden, die bei fehlender MyD88-Signaltransduktion stark abgeschwächt war. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde durch intravenöse LPS-Gabe eine starke Neutrophilie sowie ein rapider Anstieg von Neutrophilen in der Lunge beobachtet, während in TLR4-defizienten Mäusen diese pathologischen Veränderungen gänzlich fehlten (218). In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe um ANDONEGUI et al. (219) konnte an durch Knochenmarktransfer zwischen WT- und TLR4-defizienten Mäusen generierten Chimären gezeigt werden, dass die LPS-induzierte Signaltransduktion via TLR4 auf Endothelzellen verantwortlich für die erhöhte Neutrophileninfiltration ist. Auch ging in einem Modell der *colon ascendens stent peritonitis* (CASP) zur Induktion einer abdominalen Sepsis mit einer erhöhten vaskulären Permeabilität eine starke Infiltration von Neutrophilen einher. Zudem wurde eine verstärkte Expression der Chemokine MIP-2, KC und CCL2 sowie der Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin in der Lunge nachgewiesen (220). Während die CCL2-Expression in der Lunge bei abdominaler Sepsis unabhängig von MyD88 gebildet wird, ist die pulmonale Expression von KC und MIP-2 MyD88-abhängig (182). Zudem weisen aktivierte Neutrophile Veränderungen ihres Zytoskeletts einhergehend mit einer reduzierten Verformbarkeit auf (221). Dies kann in den feinen Mikrokapillaren der Lunge zu einer erhöhten Transitzeit der Neutrophilen und demzufolge zu verstärkten adhäsiven Interaktionen mit den Endothelzellen führen (222).

Sowohl in  $LysM^{ind}MyD88$ - als auch in  $K5^{ind}MyD88$ -Mäusen war eine wesentlich stärkere Akkumulation von Neutrophilen in der Lunge erkennbar als in MyD88-profizienten Tieren. Obgleich in  $LysM^{ind}MyD88$ - und  $K5^{ind}MyD88$ -Mäusen auch weniger Neutrophile aus dem Knochenmark in den Blutkreislauf rekrutiert wurden, fiel die Emigration der Neutrophilen in die Haut deutlich geringer aus. Durch die stark supprimierte Einwanderung von Neutrophilen in die Haut zirkulieren mehr Neutrophile im Blut. Eine verstärkte IL-1 $\beta$ -Produktion bei inflammatorischen Prozessen stimuliert die Expression von G-CSF, welches systemisch zu einer verstärkten Infiltration von Neutrophilen in den Blutkreislauf führen kann (206). In einer durch G-CSF-Injektion induzierten Neutrophilie war in Kaninchen eine verminderte relative Akkumulation von Neutrophilen in der Lunge im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar

(223). Möglicherweise resultiert aus der in der vorliegenden Arbeit detektierten nahezu fehlenden Bildung von IL-1beta in der Haut einhergehend mit einer reduzierten Expression von G-CSF eine verstärkte Retention von Neutrophilen in der Lunge. Zudem besteht die Vermutung, dass zirkulierende aktivierte Neutrophile zum Schutz vor potenziellen Schädigungen in der Lunge deaktiviert werden. So wurde in Ratten nach Induktion einer Streptokokken-Infektion verglichen mit der Anzahl an Neutrophilen im venösen Blut eine verminderte Anzahl aktivierter Neutrophiler in den efferenten Blutgefäßen der Lunge gefunden (224). Da möglicherweise mehr aktivierte Neutrophile aufgrund der fehlenden Einwanderung in die Haut im Blut zirkulieren, könnte eine protektive Deaktivierung die verstärkte pulmonale Akkumulation erklären.

### 5.3 MyD88-Signaltransduktion als Schutz vor DNS-Schäden

UVB-Bestrahlung führt direkt zur Entstehung von DNS-Schäden wie CPD und (6-4)-Photoprodukten (86). Werden diese Schäden nicht repariert, drohen verschiedenste Mutationen, die langfristig sowohl nicht maligne als auch maligne Veränderungen in den betroffenen Hautarealen hervorrufen können (104). Aufgrund von Literaturdaten scheint ein Einfluss der MyD88-Signaltransduktion auf die Induktion und Reparatur von DNS-Schäden gegeben (164, 225–227). Somit wurde die Entstehung von CPD als quantitativ am häufigsten auftretender DNS-Schaden ebenfalls in die Charakterisierung der akuten UVB-induzierten Entzündungsreaktion einbezogen.

#### 5.3.1 Induktion von DNS-Schäden durch UVB-Bestrahlung

**Initiale DNS-Schäden** In den Analysen zur Formation und Reparatur von DNS-Schäden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *in vivo* die initialen und unmittelbar nach einmaliger UVB-Bestrahlung induzierten DNS-Schäden bei MyD88-Defizienz im Vergleich zu MyD88-profizienten Kontrolltieren erhöht waren.

Während sich viele Untersuchungen mit der Behebung von UVB-induzierten DNS-Schäden befassen, ist wenig über Unterschiede in der initialen Entstehung von DNS-Schäden und einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung in Mäusen bekannt. In Analysen von SCHWARZ et al. (164, 228) wurde nach intrakutaner Injektion von proinflammatorischem IL-18 als auch IL-12 eine Induktion der DNS-Reparaturkaskaden beobachtet. In beiden Un-

tersuchungen wiesen die Autoren darauf hin, dass 10 min nach Injektion der Zytokine keine Unterschiede hinsichtlich der entstandenen DNS-Läsionen zu beobachten waren und somit ein etwaiger UVB-Filtereffekt beider Zytokine mit Auswirkungen auf die initiale Entstehung der CPD ausgeschlossen werden kann. Dennoch ist bekannt, dass vielerlei Substanzen vergleichbar mit Melanin UV-Strahlung absorbieren können. Die absorbierende Wirkung beruht vorwiegend auf der Anregung von Pi-Elektronen in organischen aromatischen Strukturen. Nach Absorption der elektromagnetischen Strahlung wird bei der Rückführung der delokalisierten Elektronen in den molekularen Grundzustand die Energie in Form von Wärme abgegeben. Neben Melanin, auf das im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird, konnten insbesondere bei topischer Anwendung von Vitamin A und seiner Analoga (229–231), Vitamin D (232, 233) und Flavonoiden wie Genistein (234) photoprotektive Effekte nachgewiesen werden. So haben viele Studien den protektiven Einfluss von Vitamin D auf die Entstehung von DNS-Schäden *in vitro* in humanen Keratinozyten gezeigt (235–237). In Untersuchungen von DE HAES et al. (232, 233) war nach Vorbehandlung von Keratinozyten mit Vitamin D sowohl die DNS-Fragmentierung als auch das bei Apoptose verstärkt detektierbare mitochondriale Protein Cytochrom C nach UVB-Bestrahlung reduziert. Ebenfalls wurde Vitamin D-abhängig die Genexpression des Radikalfängers Metallothionein induziert (235). Vitamin D ist zudem in der Lage sowohl die Expression von TLR2 in Keratinozyten zu verstärken als auch durch eine Induktion von *suppressor of cytokine signaling 1* die TLR-Signaltransduktion zu inhibieren (238, 239). Ob die zuvor genannten Verbindungen auch UVB-Strahlung zu nennenswerten Teilen absorbieren und vergleichbar mit Melanin vor DNS-Schäden schützen ist nicht hinreichend geklärt. Beispielsweise liegt ein Teil des Absorptionsspektrums von beta-Carotin im Bereich der UVB- und UVA-Strahlung (231). Demnach kann auch eine etwaige Absorption von UVB-Strahlung durch MyD88 selbst oder andere Mediatoren, die in MyD88-defizienten Tieren reduziert vorhanden sind, abschließend nicht ausgeschlossen werden.

### Reparatur induzierter DNS-Schäden

Hinsichtlich der Reparatur UVB-induzierter CPD konnte im vorliegenden Bestrahlungsmodell nach einmaliger Bestrahlung mit 178,5 mJ/cm<sup>2</sup> keine Abhängigkeit von MyD88 festgestellt werden. Die Behebung der CPD erfolgte sowohl in MyD88-profizienten als auch -defizienten Tieren mit gleicher Kinetik,

so dass 72 h nach der Bestrahlung eine fast vollständige Entfernung der CPD in beiden Genotypen ersichtlich war. Auch war keine eindeutige und verstärkte Genexpression verschiedener an der NER beteiligter Enzyme nach UVB-Bestrahlung erkennbar. Diese Ergebnisse standen im Einklang mit den Daten der CPD-Detektion.

Dennoch konnte in verschiedenen Untersuchungen durch Stimulierung mit synthetischen TLR-Liganden eine verstärkte Expression von DNS-Reparaturenzymen und einhergehend eine effektivere Behebung von geschädigter DNS beobachtet werden. In Analysen von FISHELEVICH et al. (225) wurde *in vitro* an knochenmarksabgeleiteten DZ und Makrophagen gezeigt, dass eine Vorbehandlung mit dem TLR7-stimulierenden Liganden Imiquimod zu einer erhöhten Expression von XPA führt. Zudem wurde sowohl *in vitro* als auch nach topischer Imiquimodapplikation *in vivo* eine schnellere Behebung UVB-induzierter CPD im Vergleich zu lediglich UVB-behandelten Proben festgestellt. In einem Modell der Kontakthypersensitivität konnten THATCHER et al. (226) nach Imiquimodbehandlung und anschließender Bestrahlung im Vergleich zu lediglich bestrahlten Mäusen eine reduzierte Anzahl an DNS-Schäden in den hautdrainierenden Lymphknoten, einhergehend mit einer verminderten UV-induzierten Immunsuppression, vorfinden. Geschädigte Langerhanszellen sind zwar fähig in drainierende Lymphknoten einzuwandern, haben jedoch einen verstärkt tolerogenen und somit immunsuppressiven Phänotyp (64, 240). Da die TLR7-Stimulation mit Imiquimod möglicherweise zu einer verbesserten Reparatur der entstandenen DNS-Schäden in DZ der Haut führte, war folglich eine verstärkte Antigenpräsentation an T<sub>H1</sub>-Zellen bei gleichzeitig supprimierter T<sub>H2</sub>-Immunantwort in den drainierenden Lymphknoten, einhergehend mit einer verminderten Immunsuppression, möglich.

Auch nach Stimulation von TLR9 durch intraperitoneal verabreichtes CpG konnte in Mikroarray-Analysen eine verstärkte Expression von Genen in der Milz, die für verschiedene Reparaturenzyme codieren, beobachtet werden (241). Diese Ergebnisse wurden in einer weiteren Genomanalyse in Immunzellen bestätigt (227). Anzumerken ist jedoch, dass sich durch Stimulierung mit dem TLR9-Agonist CpG in Tumorzellen gegenteilige Effekte zeigten und eine verminderte Genexpression von Reparaturenzymen zu beobachten war.

Neben einer direkten Stimulierung von TLR konnten ebenfalls durch intrakutane Injektion von IL-18 sowie IL-12 – zwei Zytokine die über TLR/MyD88-vermittelte Signaltransduktion induziert werden können und zudem im Falle von IL-18 MyD88 an der Signalweiterleitung beteiligt ist – signifikant geringere Mengen an CPD im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen nach UVB-Bestrahlung detektiert werden (164, 228). Ähnliche Resultate hinsichtlich einer verbesserten DNS-Reparatur konnten nach Verabreichung von IL-23, einem weiteren Mitglied der IL-12 Familie, im Anschluss an UVB-Bestrahlung festgestellt werden (242).

Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl direkte als auch indirekte Mechanismen über die TLR/MyD88-Signaltransduktion zu einer verstärkten DNS-Reparatur führen. Direkte Ligandenbindung an TLR kann möglicherweise über das Adaptorprotein MyD88 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 führen. Einige Reparaturenzyme der NER weisen innerhalb ihrer Promotorregion eine Bindungsstelle für AP-1 auf, so dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 eine mögliche Verbindung zwischen der TLR-Signaltransduktion und der Reparatur von DNS-Schäden darstellt (243). Zudem scheinen mit einer verstärkten Zytokinexpression von IL-12, IL-18 und IL-23 verbesserte Reparatureigenschaften einherzugehen.

Dennoch existieren auch Untersuchungen, in denen TLR-Signaltransduktion keine verbesserten Reparatureigenschaften offenbarte sondern gegenteilige Resultate hervorbrachte. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass nach UVB-Bestrahlung die Expression des Reparaturenzyms XPA und die Reparatur von CPD in TLR4-defizienten Tieren wesentlich effizienter war als in bestrahlten WT-Kontrollen (244). Somit liegt nahe, dass die DNS-Reparatureigenschaften sich je nach Zelltyp, Stimulus, beteiligtem TLR und Adaptorprotein sowie zusätzlicher externer Stimulierung invers verhalten können.

### **5.3.2 Einfluss von Melanin auf die Induktion von DNS-Schäden**

In den Analysen zur basalen Melaninproduktion konnten bei MyD88-Defizienz signifikant geringere Konzentrationen nachgewiesen werden. Zudem war in q-PCR-Analysen eine verstärkte Genexpression der Tyrosinase in

MyD88-profizienten Tieren nach UVB-Bestrahlung detektierbar, die bei fehlender MyD88-Signaltransduktion ausblieb.

Für die Induktion der Melanogenese tragen insbesondere Mediatoren von Keratinozyten und Melanozyten selbst als Antwort auf verschiedenste extrinsische und intrinsische Stimuli Verantwortung (245–251). Über Interaktionen mit ihren jeweiligen Rezeptoren auf Melanozyten haben sie Einfluss auf die Expression der Tyrosinase sowie des *tyrosinase related protein* (TRP) 1 und 2, zweier weiterer Enzyme der Melaninsynthese (252). Während TRP 1 und 2 eine eher untergeordnete Rolle bei der Melanogenese zugeschrieben wird, steht die Tyrosinase im Mittelpunkt der konstitutiven sowie UV-induzierten Melaninsynthese. In Untersuchungen von PARK et al. (171, 172) konnte gezeigt werden, dass die Melaninsynthese nur geringfügig von der Proteinexpression der Tyrosinase bestimmt wird und vielmehr von ihrer Aktivität abhängig ist. So erfolgt die Aktivierung der Tyrosinase über eine posttranslationale Phosphorylierung katalysiert durch Proteinkinase C-beta, welche nach UV-Bestrahlung ebenfalls verstärkt exprimiert wird. Dies könnte die lediglich schwache Induktion der Tyrosinase nach UVB-Bestrahlung in den durchgeführten q-PCR Analysen in dieser Arbeit erklären.

Neben den vielfach beschriebenen und gut analysierten Rezeptoren Melanocortin-1-Rezeptor und c-Kit sowie ihrer Liganden alpha-Melanozytenstimulierendes Hormon respektive *stem cell factor* (247, 253) scheinen TLR jedoch auch Einfluss auf die Melanogenese zu haben. Durch *in vitro*-Stimulierung humaner Melanozyten mit den TLR-Liganden Pam3CSK4 bzw. LPS konnte eine verstärkte Pigmentierung beobachtet werden, während gegenteilige Effekte mit dem TLR5-Liganden Flagellin und dem TLR7-Liganden Imiquimod erzielt wurden (254). Die beobachtete stimulierende Wirkung von LPS sowie die supprimierenden Effekte einer Imiquimodbehandlung auf die Melaninsynthese konnten in weiteren Studien ebenfalls an humanen Melanozyten *in vitro* bestätigt werden (255, 256). Zudem ist der Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, der durch LPS reguliert werden kann, ebenfalls in die Melanogenese involviert. So zeigten in Analysen von JUX et al. (112) AhR-defiziente Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen eine signifikant schwächere Melaninsynthese. Möglicherweise führte eine verminderte Aktivierung des AhR durch den aus Tryptophan generierten



UVB-induzierten Liganden FICZ (257) zu einer reduzierten Tyrosinaseaktivität.

Neben anderen Mediatoren hat auch das von Keratinozyten sekretierte GM-CSF eine exponierte Stellung bei der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von Melanozyten (258). GM-CSF induziert über *signal transducers and activators of transcription* (STAT)-1 bzw. -3 (259, 260) oder einen MAP-Kinase-Weg (261) die Proliferation und Differenzierung von Melanoblasten und Melanozyten sowie die Aktivierung der Tyrosinase und von TRP 1 (258, 262, 263). Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Zytokinexpression primärer isolierter Keratinozyten ließen zwar keine Veränderungen der GM-CSF-Sekretion nach UVB-Bestrahlung erkennen, zeigten aber dennoch starke Unterschiede hinsichtlich der konstitutiven Expression. Während in MyD88-defizienten Keratinozyten keine GM-CSF-Sekretion nachweisbar war, zeigten MyD88-profiziente Zellen eine deutliche Sekretion dieses melanozytenstimulierenden Zytokins. Da, wie zuvor beschrieben, GM-CSF ein intrinsischer Wachstumsfaktor für Melanozyten ist und sowohl ihre Entwicklung als auch die Proliferation und Melanogenese steuert, könnte der in dieser Arbeit herausgestellte Phänotyp einer verminderten Melaninproduktion bei MyD88-Defizienz mit einer nicht vorhandenen Sekretion von GM-CSF begründet werden.

#### **5.4 Medizinische Relevanz und Ausblick**

Hautkrebs ist in vielen westlichen Ländern eine der häufigsten Krebserkrankungen mit steigender Inzidenz. Solare sowie künstliche UV-Strahlung gilt als entscheidender Risikofaktor für die Entstehung von nicht-malignen und malignen Veränderungen der Haut. Der auslösende Faktor für die Tumorentstehung ist neben einer genetischen Disposition die Schädigung der DNS. Solche DNS-Schäden können schon nach einmaliger Bestrahlung auftreten. Werden die entstandenen DNS-Schäden nicht repariert, persistiert die Mutation und die mutierte Zelle dient als Ursprung für einen Tumor. Alleine die jährlichen Kosten für die Behandlung von Hauttumoren in Krankenhäusern belaufen sich auf etwa 200 Millionen Euro mit steigender Tendenz (264).

Präventive Sonnenschutzmaßnahmen sollten insbesondere bei Risikogruppen betrieben werden. Hierzu zählen hellhäutige Personen, im Freien arbeitende

Bevölkerungsgruppen sowie Kinder und Jugendliche. Schon ein schwerer Sonnenbrand im Kindesalter erhöht das Risiko an Hautkrebs zu erkranken um das Zweifache (265, 266). Die in dieser Arbeit herausgestellte Beteiligung MyD88-abhängiger Signalwege bei der Entstehung der UVB-induzierten Entzündungsreaktion kann einen vielversprechenden Ansatzpunkt in der Prävention von Sonnenbränden darstellen. So könnte beispielsweise durch eine topische Applikation von MyD88-Inhibitoren die UVB-induzierte Entzündungsreaktion abgeschwächt werden. In weiterführenden Analysen sollte mit entsprechenden *knock-out* Mäusen genauer erörtert werden, welche TLR bzw. Rezeptoren der IL-1-Familie in die Erythembildung involviert sind, um durch Inhibierung der für das Entzündungsgeschehen verantwortlichen Rezeptoren eine spezifischere Modulation der Immunantwort zu erwirken. Dennoch müssen in diesem Zusammenhang auch die langfristigen Folgen solch einer Immunmodulation näher ergründet werden. Um mögliche Komplikationen in Form einer verstärkten Tumorgenese im Vorfeld ausschließen zu können, gilt es insbesondere den ursächlichen Zusammenhang zwischen MyD88-Defizienz und der erhöhten Anzahl an initialen DNS-Läsionen zu untersuchen. Zudem sollten etwaige langfristige lokale und systemische Nebenwirkungen einer Suppression des Immunsystems eingehend analysiert werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

UVB-Strahlung führt neben der Induktion von DNS- und Zellschäden zu akuten Entzündungsreaktionen. Ferner ist UV-Strahlung in der Lage bei chronischer Exposition immunsuppressive Wirkung auszulösen. Dennoch ist bis heute nicht eindeutig geklärt, welche genauen molekularen Prozesse diese Immunreaktionen hervorrufen. Das angeborene Immunsystem der Haut kann sowohl durch konservierte Bestandteile von Pathogenen als auch durch endogene Gefahrensignale aktiviert werden. Eine maßgebliche Schlüsselrolle bei der Erkennung dieser exo- und endogenen Strukturen und der daraus resultierenden Induktion einer Immunantwort nimmt das TLR-System mit seinem zentralen Adaptorprotein MyD88 ein.

In dieser Arbeit fanden neben MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen auch Mauslinien Verwendung, die MyD88 zelltypspezifisch in Keratinozyten oder myeloiden Zellen exprimieren. Es konnte gezeigt werden, dass MyD88-defiziente Mäuse eine abgeschwächte lokale Entzündungsreaktion nach akuter UVB-Bestrahlung aufwiesen. Für die Aktivierung und Proliferation der Keratinozyten, die Infiltration von myeloiden Entzündungszellen sowie die verstärkte Expression von Entzündungsmediatoren waren MyD88-abhängige Signalwege insbesondere in Keratinozyten und myeloiden Zellen verantwortlich.

Neben der lokalen Entzündungsreaktion führte UVB-Bestrahlung auch zu systemischen Veränderungen. Bestrahlte MyD88-profiziente Mäuse zeigten eine verstärkte Rekrutierung von Neutrophilen aus dem Knochenmark ins Blut, die bei fehlender MyD88-Signaltransduktion ausblieb. Durch Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen oder Keratinozyten konnte die beobachtete Neutrophilie partiell wiederhergestellt werden.

Überdies wurden bei fehlender MyD88-Signaltransduktion vermehrt DNS-Schäden in Form von CPD in der Rückenhaut bestrahlter Mäuse detektiert. Die Behebung der CPD sowohl in MyD88-profizienten als auch -defizienten Tieren erfolgte jedoch mit gleicher Kinetik. Auch waren keine eindeutigen Veränderungen in der Expression von Reparaturenzymen zu verzeichnen. MyD88 scheint somit lediglich einen Einfluss auf den initialen DNS-Schaden zu haben, der möglicherweise mit der detektierten verminderten Melaninsynthese bei MyD88-Defizienz begründet werden kann.

## 7 SUMMARY

UVB-irradiation leads beside the induction of DNA and cell damage to acute inflammatory reactions. After chronic exposition UV-irradiation is also able to provoke immunosuppressive properties. However, the molecular processes which induce these immunoreactions are not completely clarified. The innate immune system of the skin can be activated through conserved molecular patterns of pathogens as well as endogenous danger signals. The toll-like receptor system with its central adaptor protein MyD88 plays a significant key role for the recognition of these exo- and endogenous structures and the resulting induction of an immune response.

In the present work MyD88-proficient and -deficient mice as well as mouse strains with cell-type-specific expression of MyD88 in either keratinocytes or myeloid cells were used. The data revealed a reduced local inflammatory response after UVB-irradiation in MyD88-deficient mice. MyD88-dependent signaling pathways, especially in keratinocytes and myeloid cells, were responsible for the activation and proliferation of keratinocytes, the infiltration of myeloid cells and the elevated expression of inflammatory mediators.

In addition to the local skin inflammation UVB-irradiation leads to systemic alterations. Irradiated MyD88-proficient mice showed an increased recruitment of neutrophils from the bone marrow to the circulation which could not be observed without MyD88-signaling. Reexpression of MyD88 in myeloid cells and keratinocytes could partially restore neutrophilia.

In MyD88-deficient mice an increased number of DNA damage defined as cyclobutan pyrimidin dimers could be detected. Removal of cyclobutan pyrimidin dimers in MyD88-proficient as well as -deficient mice occurred with comparable kinetics. Moreover, there were no distinct changes in the gene expression of repair enzymes apparent. Consequently, MyD88 seems to have an effect only on the initial DNA damage which could be caused by diminished melanin production observed under MyD88-deficiency.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Beutler, B. 2004. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 40: 845–859.
2. Iwasaki, A., and R. Medzhitov. 2010. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 327: 291–295.
3. Murray, P. J., and T. A. Wynn. 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 723–737.
4. Xue, J., S. V Schmidt, J. Sander, A. Draffehn, W. Krebs, I. Quester, D. De Nardo, T. D. Gohel, M. Emde, L. Schmidleithner, H. Ganesan, A. Nino-Castro, M. R. Mallmann, L. Labzin, H. Theis, M. Kraut, M. Beyer, E. Latz, T. C. Freeman, T. Ulas, and J. L. Schultze. 2014. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity* 40: 274–88.
5. Lawrence, T., and G. Natoli. 2011. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat. Rev. Immunol.* 11: 750–761.
6. Martinez, F. O., and S. Gordon. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6: 13.
7. Shortman, K., and S. H. Naik. 2006. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 19–30.
8. Palm, N. W., and R. Medzhitov. 2009. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol. Rev.* 227: 221–233.
9. Takeuchi, O., and S. Akira. 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140: 805–820.
10. Pedra, J. H. F., S. L. Cassel, and F. S. Sutterwala. 2009. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr. Opin. Immunol.* 21: 10–16.
11. Medzhitov, R., and C. Janeway. 2000. Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343: 338–44.
12. Brown, G. D., and S. Gordon. 2001. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 413: 36–7.
13. Ablasser, A., F. Bauernfeind, G. Hartmann, E. Latz, K. A. Fitzgerald, and V. Hornung. 2009. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat. Immunol.* 10: 1065–72.
14. Kumagai, Y., and S. Akira. 2010. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: 985–992.
15. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30: 16–34.
16. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124: 783–801.
17. Latz, E. 2010. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Curr. Opin. Immunol.* 22: 28–33.

18. Kawai, T., and S. Akira. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Publ. Gr.* 11: 373–384.
19. Miyake, K. 2007. Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* 19: 3–10.
20. Kugelberg, E. 2014. Innate immunity: Making mice more human the TLR8 way. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 6.
21. Trinchieri, G., and A. Sher. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 179–190.
22. Kawai, T., and S. Akira. 2011. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* 34: 637–650.
23. Avbelj, M., S. Horvat, and R. Jerala. 2011. The Role of Intermediary Domain of MyD88 in Cell Activation and Therapeutic Inhibition of TLRs. *J. Immunol.* 187: 2394–2404.
24. Warner, N., and G. Núñez. 2013. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J. Immunol.* 190: 3–4.
25. Thompson, J. M., and A. Iwasaki. 2008. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 786–794.
26. Bangert, C., P. M. Brunner, and G. Stingl. 2011. Immune functions of the skin. *Clin. Dermatol.* 29: 360–76.
27. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2013. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nat. Immunol.* 14: 978–85.
28. Grice, E. a, and J. a Segre. 2011. The skin microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9: 244–53.
29. Pasparakis, M., I. Haase, and F. O. Nestle. 2014. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 14: 289–301.
30. McGrath, J. a, and J. Uitto. 2008. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and disease. *Trends Mol. Med.* 14: 20–7.
31. Houben, E., K. De Paepe, and V. Rogiers. 2007. A keratinocyte's course of life. *Skin Pharmacol. Physiol.* 20: 122–32.
32. Proksch, E., J. M. Brandner, and J.-M. Jensen. 2008. The skin: an indispensable barrier. *Exp. Dermatol.* 17: 1063–1072.
33. Freedberg, I. M., M. Tomic-Canic, M. Komine, and M. Blumenberg. 2001. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *J. Invest. Dermatol.* 116: 633–40.
34. Ariotti, S., J. B. Beltman, G. Chodaczek, M. E. Hoekstra, A. E. van Beek, R. Gomez-Eerland, L. Ritsma, J. van Rheenen, A. F. M. Marée, T. Zal, R. J. de Boer, J. B. a G. Haanen, and T. N. Schumacher. 2012. Tissue-resident memory CD8+ T cells continuously patrol skin epithelia to quickly recognize local antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 19739–44.

35. Gebhardt, T., P. G. Whitney, A. Zaid, L. K. Mackay, A. G. Brooks, W. R. Heath, F. R. Carbone, and S. N. Mueller. 2011. Different patterns of peripheral migration by memory CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature* 477: 216–9.
36. Macleod, A. S., and W. L. Havran. 2011. Functions of skin-resident  $\gamma\delta$  T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 2399–408.
37. Havran, W. L., and J. M. Jameson. 2010. Epidermal T cells and wound healing. *J. Immunol.* 184: 5423–8.
38. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 935–47.
39. Nagao, K., F. Ginhoux, W. W. Leitner, S. Motegi, C. L. Bennett, M. Merad, and M. C. Udey. 2009. Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells. .
40. Chu, C.-C., P. Di Meglio, and F. O. Nestle. 2011. Harnessing dendritic cells in inflammatory skin diseases. *Semin. Immunol.* 23: 28–41.
41. Romani, N., B. E. Clausen, and P. Stoitzner. 2010. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol. Rev.* 234: 120–41.
42. Romani, N., P. M. Brunner, and G. Stingl. 2012. Changing views of the role of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 132: 872–81.
43. Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 685–711.
44. Lin, J. Y., and D. E. Fisher. 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445: 843–50.
45. Sugita, K., K. Kabashima, K. Atarashi, T. Shimauchi, M. Kobayashi, and Y. Tokura. 2007. Innate immunity mediated by epidermal keratinocytes promotes acquired immunity involving Langerhans cells and T cells in the skin. *Clin. Exp. Immunol.* 147: 176–83.
46. Gniadecka, M., O. F. Nielsen, S. Wessel, M. Heidenheim, D. H. Christensen, and H. C. Wulf. 1998. Water and protein structure in photoaged and chronically aged skin. *J. Invest. Dermatol.* 111: 1129–33.
47. Smith, R. S., T. J. Smith, T. M. Blieden, and R. P. Phipps. 1997. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol.* 151: 317–22.
48. Zhang, Y., H. J. Cao, B. Graf, H. Meekins, T. J. Smith, and R. P. Phipps. 1998. CD40 engagement up-regulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human lung fibroblasts. *J. Immunol.* 160: 1053–7.
49. Elgueta, R., M. J. Benson, V. C. de Vries, A. Wasiuk, Y. Guo, and R. J. Noelle. 2009. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol. Rev.* 229: 152–72.
50. Tamoutounour, S., M. Guilliams, F. Montanana Sanchis, H. Liu, D. Terhorst, C. Malosse, E. Pollet, L. Ardouin, H. Luche, C. Sanchez, M. Dalod, B. Malissen, and S. Henri. 2013. Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* 39: 925–38.

51. Fukunaga, A., N. M. Khaskhely, C. S. Sreevidya, S. N. Byrne, and S. E. Ullrich. 2008. Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response. *J. Immunol.* 180: 3057–64.
52. Ryan, J. J., M. Kashyap, D. Bailey, S. Kennedy, K. Speiran, J. Brenzovich, B. Barnstein, C. Oskeritzian, and G. Gomez. 2007. Mast cell homeostasis: a fundamental aspect of allergic disease. *Crit. Rev. Immunol.* 27: 15–32.
53. Blank, U., and J. Rivera. 2004. The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis. *Trends Immunol.* 25: 266–73.
54. Galli, S. J., N. Borregaard, and T. a Wynn. 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 12: 1035–44.
55. Theoharides, T. C., K.-D. Alysandratos, A. Angelidou, D.-A. Delivanis, N. Sismanopoulos, B. Zhang, S. Asadi, M. Vasiadi, Z. Weng, A. Miniati, and D. Kalogeromitros. 2012. Mast cells and inflammation. *Biochim. Biophys. Acta* 1822: 21–33.
56. Hart, P. H., S. Gorman, and J. J. Finlay-Jones. 2011. Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D? *Nat. Rev. Immunol.* 11: 584–96.
57. Van der Aar, A. M. G., D. S. Sibiryak, G. Bakdash, T. M. M. van Capel, H. P. M. van der Kleij, D.-J. E. Opstelten, M. B. M. Teunissen, M. L. Kapsenberg, and E. C. de Jong. 2011. Vitamin D3 targets epidermal and dermal dendritic cells for induction of distinct regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127: 1532–40.e7.
58. Baeke, F., T. Takiishi, H. Korf, C. Gysemans, and C. Mathieu. 2010. Vitamin D: modulator of the immune system. *Curr. Opin. Pharmacol.* 10: 482–96.
59. Maverakis, E., Y. Miyamura, M. P. Bowen, G. Correa, Y. Ono, and H. Goodarzi. 2010. Light, including ultraviolet. *J. Autoimmun.* 34: J247–57.
60. Matsumura, Y., and H. N. Ananthaswamy. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195: 298–308.
61. Dai, G., T. Freudenberger, P. Zipper, A. Melchior, S. Grether-Beck, B. Rabausch, J. de Groot, S. Twarock, H. Hanenberg, B. Homey, J. Krutmann, J. Reifemberger, and J. W. Fischer. 2007. Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am. J. Pathol.* 171: 1451–61.
62. Fisher, G. J., S. Kang, J. Varani, Z. Bata-Csorgo, Y. Wan, S. Datta, and J. J. Voorhees. 2002. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch. Dermatol.* 138: 1462–70.
63. Diffey, B. L. 2002. Sources and measurement of ultraviolet radiation. *Methods* 28: 4–13.
64. Timares, L., S. K. Katiyar, and C. A. Elmetts. 2008. DNA damage, apoptosis and langerhans cells--Activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem. Photobiol.* 84: 422–36.
65. Lehmann, B., W. Sauter, P. Knuschke, S. Dressler, and M. Meurer. 2003. Demonstration of UVB-induced synthesis of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 (calcitriol) in human skin by microdialysis. *Arch. Dermatol. Res.* 295: 24–8.



66. Takeuchi, S., W. Zhang, K. Wakamatsu, S. Ito, V. J. Hearing, K. H. Kraemer, and D. E. Brash. 2004. Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 15076–81.
67. Lo, H.-L., S. Nakajima, L. Ma, B. Walter, A. Yasui, D. W. Ethell, and L. B. Owen. 2005. Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *BMC Cancer* 5: 135.
68. Sreevidya, C. S., A. Fukunaga, N. M. Khaskhely, T. Masaki, R. Ono, C. Nishigori, and S. E. Ullrich. 2010. Agents that reverse UV-Induced immune suppression and photocarcinogenesis affect DNA repair. *J. Invest. Dermatol.* 130: 1428–37.
69. Walterscheid, J. P., D. X. Nghiem, N. Kazimi, L. K. Nutt, D. J. McConkey, M. Norval, and S. E. Ullrich. 2006. Cis-urocanic acid, a sunlight-induced immunosuppressive factor, activates immune suppression via the 5-HT<sub>2A</sub> receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 17420–5.
70. Kulms, D., B. Pöppelmann, D. Yarosh, T. A. Luger, J. Krutmann, and T. Schwarz. 1999. Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 7974–9.
71. Clydesdale, G. J., G. W. Dandie, and H. K. Muller. 2001. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.* 79: 547–68.
72. Köck, A., T. Schwarz, R. Kirnbauer, A. Urbanski, P. Perry, J. C. Ansel, and T. A. Luger. 1990. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* 172: 1609–14.
73. Chung, J. H., S. H. Youn, W. S. Koh, H. C. Eun, K. H. Cho, K. C. Park, and J. I. Youn. 1996. Ultraviolet B irradiation-enhanced interleukin (IL)-6 production and mRNA expression are mediated by IL-1 alpha in cultured human keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 106: 715–20.
74. Rhodes, L. E., G. Belgi, R. Parslew, L. McLoughlin, G. F. Clough, and P. S. Friedmann. 2001. Ultraviolet-B-induced erythema is mediated by nitric oxide and prostaglandin E<sub>2</sub> in combination. *J. Invest. Dermatol.* 117: 880–5.
75. Takashima, A., and P. R. Bergstresser. 1996. Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network. *Photochem. Photobiol.* 63: 397–400.
76. Yoshiki, R., K. Kabashima, J. Sakabe, K. Sugita, T. Bito, M. Nakamura, B. Malissen, and Y. Tokura. 2010. The mandatory role of IL-10-producing and OX40 ligand-expressing mature Langerhans cells in local UVB-induced immunosuppression. *J. Immunol.* 184: 5670–7.
77. Walsh, L. J. 1995. Ultraviolet B irradiation of skin induces mast cell degranulation and release of tumour necrosis factor-alpha. *Immunol. Cell Biol.* 73: 226–33.
78. Byrne, S. N., C. Beaugie, C. O’Sullivan, S. Leighton, and G. M. Halliday. 2011. The immune-modulating cytokine and endogenous Alarmin interleukin-33 is upregulated in skin exposed to inflammatory UVB radiation. *Am. J. Pathol.* 179: 211–22.
79. Walsh, L. J., M. F. Davis, L. J. Xu, and N. W. Savage. 1995. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. *J. Oral Pathol. Med.* 24: 266–72.

80. Collins, T., L. A. Lapierre, W. Fiers, J. L. Strominger, and J. S. Pober. 1986. Recombinant human tumor necrosis factor increases mRNA levels and surface expression of HLA-A,B antigens in vascular endothelial cells and dermal fibroblasts in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 446–50.
81. Schwarz, A., R. Bhardwaj, Y. Aragane, K. Mahnke, H. Riemann, D. Metzger, T. A. Luger, and T. Schwarz. 1995. Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J. Invest. Dermatol.* 104: 922–7.
82. Groves, R. W., M. H. Allen, E. L. Ross, J. N. Barker, and D. M. MacDonald. 1995. Tumour necrosis factor alpha is pro-inflammatory in normal human skin and modulates cutaneous adhesion molecule expression. *Br. J. Dermatol.* 132: 345–52.
83. Strickland, I., L. E. Rhodes, B. F. Flanagan, and P. S. Friedmann. 1997. TNF-alpha and IL-8 are upregulated in the epidermis of normal human skin after UVB exposure: correlation with neutrophil accumulation and E-selectin expression. *J. Invest. Dermatol.* 108: 763–8.
84. Abeyama, K., W. Eng, J. V Jester, A. A. Vink, D. Edelbaum, C. J. Cockerell, P. R. Bergstresser, and A. Takashima. 2000. A role for NF-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. *J. Clin. Invest.* 105: 1751–9.
85. Akira, S., and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499–511.
86. Cadet, J., E. Sage, and T. Douki. 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat. Res.* 571: 3–17.
87. Ravanat, J.-L., T. Douki, and J. Cadet. 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 63: 88–102.
88. Jiang, Y., M. Rabbi, M. Kim, C. Ke, W. Lee, R. L. Clark, P. A. Mieczkowski, and P. E. Marszalek. 2009. UVA generates pyrimidine dimers in DNA directly. *Biophys. J.* 96: 1151–8.
89. Besaratinia, A., T. W. Synold, H.-H. Chen, C. Chang, B. Xi, A. D. Riggs, and G. P. Pfeifer. 2005. DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 10058–63.
90. Kunisada, M., K. Sakumi, Y. Tominaga, A. Budiyo, M. Ueda, M. Ichihashi, Y. Nakabeppu, and C. Nishigori. 2005. 8-Oxoguanine formation induced by chronic UVB exposure makes Ogg1 knockout mice susceptible to skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 65: 6006–10.
91. Pfeifer, G. P. 1997. Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem. Photobiol.* 65: 270–83.
92. Mitchell, D. L., and R. S. Nairn. 1989. The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem. Photobiol.* 49: 805–19.
93. Yoon, J. H., C. S. Lee, T. R. O'Connor, A. Yasui, and G. P. Pfeifer. 2000. The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. *J. Mol. Biol.* 299: 681–93.

94. Rastogi, R. P., Richa, A. Kumar, M. B. Tyagi, and R. P. Sinha. 2010. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J. Nucleic Acids* 2010: 592980.
95. Costa, R. M. A., V. Chiganças, R. da S. Galhardo, H. Carvalho, and C. F. M. Menck. 2003. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85: 1083–99.
96. Naegeli, H., and K. Sugawara. 2011. The xeroderma pigmentosum pathway: decision tree analysis of DNA quality. *DNA Repair (Amst)*. 10: 673–83.
97. Oksenyich, V., and F. Coin. 2010. The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle* 9: 90–6.
98. Lagerwerf, S., M. G. Vrouwe, R. M. Overmeer, M. I. Fousteri, and L. H. F. Mullenders. 2011. DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst)*. 10: 743–50.
99. Ananthaswamy, H. N., and W. E. Pierceall. 1990. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.* 52: 1119–1136.
100. Ikehata, H., and T. Ono. 2011. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *J. Radiat. Res.* 52: 115–125.
101. Mitchell, D. L., and A. A. Fernandez. 2011. Different types of DNA damage play different roles in the etiology of sunlight-induced melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24: 119–24.
102. Besaratinia, A., S.-I. Kim, and G. P. Pfeifer. 2008. Rapid repair of UVA-induced oxidized purines and persistence of UVB-induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells. *FASEB J.* 22: 2379–92.
103. Batista, L. F. Z., B. Kaina, R. Meneghini, and C. F. M. Menck. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. *Mutat. Res.* 681: 197–208.
104. You, Y. H., D. H. Lee, J. H. Yoon, S. Nakajima, A. Yasui, and G. P. Pfeifer. 2001. Cyclobutane pyrimidine dimers are responsible for the vast majority of mutations induced by UVB irradiation in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 276: 44688–94.
105. You, Y. H., P. E. Szabó, and G. P. Pfeifer. 2000. Cyclobutane pyrimidine dimers form preferentially at the major p53 mutational hotspot in UVB-induced mouse skin tumors. *Carcinogenesis* 21: 2113–7.
106. Rodust, P. M., E. Stockfleth, C. Ulrich, M. Leverkus, and J. Eberle. 2009. UV-induced squamous cell carcinoma--a role for antiapoptotic signalling pathways. *Br. J. Dermatol.* 161 Suppl : 107–15.
107. Viros, A., B. Sanchez-Laorden, M. Pedersen, S. J. Furney, J. Rae, K. Hogan, S. Ejima, M. R. Girotti, M. Cook, N. Dhomen, and R. Marais. 2014. Ultraviolet radiation accelerates BRAF-driven melanomagenesis by targeting TP53. *Nature* 511: 478–82.
108. Gais, P., D. Reim, G. Jusek, T. Rossmann-Bloeck, H. Weighardt, K. Pfeffer, F. Altmayr, K.-P. Janssen, and B. Holzmann. 2012. Cutting edge: Divergent cell-specific functions of MyD88 for inflammatory responses and organ injury in septic peritonitis. *J. Immunol.* 188: 5833–7.

109. Ramirez, A., A. Page, A. Gandarillas, J. Zanet, S. Pibre, M. Vidal, L. Tusell, A. Genesca, D. A. Whitaker, D. W. Melton, and J. L. Jorcano. 2004. A keratin K5Cre transgenic line appropriate for tissue-specific or generalized Cre-mediated recombination. *Genesis* 39: 52–7.
110. Clausen, B. E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, and I. Förster. 1999. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res.* 8: 265–77.
111. Hruza, L. L., and A. P. Pentland. 1993. Mechanisms of UV-induced inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 100: 35S–41S.
112. Jux, B., S. Kadow, S. Luecke, A. Rannug, J. Krutmann, and C. Esser. 2011. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J. Invest. Dermatol.* 131: 203–10.
113. Mee, J. B., C. Antonopoulos, S. Poole, T. S. Kupper, and R. W. Groves. 2005. Counter-regulation of interleukin-1alpha (IL-1alpha) and IL-1 receptor antagonist in murine keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 124: 1267–74.
114. Kang, K., C. Hammerberg, L. Meunier, and K. D. Cooper. 1994. CD11b+ macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potently produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 protein. *J. Immunol.* 153: 5256–64.
115. Enk, C. D., D. Sredni, A. Blauvelt, and S. I. Katz. 1995. Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. *J. Immunol.* 154: 4851–6.
116. Grimbaldston, M. A., S. Nakae, J. Kalesnikoff, M. Tsai, and S. J. Galli. 2007. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat. Immunol.* 8: 1095–104.
117. De Waal Malefyt, R., J. Abrams, B. Bennett, C. G. Figdor, and J. E. de Vries. 1991. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* 174: 1209–20.
118. Blumberg, H., D. Conklin, W. F. Xu, A. Grossmann, T. Brender, S. Carollo, M. Eagan, D. Foster, B. A. Haldeman, A. Hammond, H. Haugen, L. Jelinek, J. D. Kelly, K. Madden, M. F. Maurer, J. Parrish-Novak, D. Prunkard, S. Sexson, C. Sprecher, K. Waggie, J. West, T. E. Whitmore, L. Yao, M. K. Kuechle, B. A. Dale, and Y. A. Chandrasekher. 2001. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* 104: 9–19.
119. Stutte, S., T. Quast, N. Gerbitzki, T. Savinko, N. Novak, J. Reifenberger, B. Homey, W. Kolanus, H. Alenius, and I. Förster. 2010. Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 8736–41.
120. Ziegler, S. F., and D. Artis. 2010. Sensing the outside world: TSLP regulates barrier immunity. *Nat. Immunol.* 11: 289–93.
121. Kitajima, M., and S. F. Ziegler. 2013. Cutting edge: identification of the thymic stromal lymphopoietin-responsive dendritic cell subset critical for initiation of type 2 contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 191: 4903–7.

122. Vink, A. A., F. M. Strickland, C. Bucana, P. A. Cox, L. Roza, D. B. Yarosh, and M. L. Kripke. 1996. Localization of DNA damage and its role in altered antigen-presenting cell function in ultraviolet-irradiated mice. *J. Exp. Med.* 183: 1491–500.
123. Kansas, G. S. 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88: 3259–87.
124. Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 678–89.
125. Galli, S. J., J. Kalesnikoff, M. A. Grimaldeston, A. M. Piliponsky, C. M. M. Williams, and M. Tsai. 2005. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 749–86.
126. Galli, S. J., M. Grimaldeston, and M. Tsai. 2008. Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 478–86.
127. Galli, S. J., and M. Tsai. 2010. Mast cells in allergy and infection: versatile effector and regulatory cells in innate and adaptive immunity. *Eur. J. Immunol.* 40: 1843–51.
128. Boyce, J. A. 2007. Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunol. Rev.* 217: 168–85.
129. Metz, M., V. Lammell, B. F. Gibbs, and M. Maurer. 2006. Inflammatory murine skin responses to UV-B light are partially dependent on endothelin-1 and mast cells. *Am. J. Pathol.* 169: 815–22.
130. Kligman, L. H., and G. F. Murphy. 1996. Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor. *Photochem. Photobiol.* 63: 123–7.
131. Seike, M., M. Ikeda, A. Morimoto, M. Matsumoto, and H. Kodama. 2002. Increased synthesis of calcitonin gene-related peptide stimulates keratinocyte proliferation in murine UVB-irradiated skin. *J. Dermatol. Sci.* 28: 135–143.
132. Bald, T., T. Quast, J. Landsberg, M. Rogava, N. Glodde, D. Lopez-Ramos, J. Kohlmeyer, S. Riesenberger, D. van den Boorn-Konijnenberg, C. Hömig-Hölzel, R. Reuten, B. Schadow, H. Weighardt, D. Wenzel, I. Helfrich, D. Schadendorf, W. Bloch, M. E. Bianchi, C. Lugassy, R. L. Barnhill, M. Koch, B. K. Fleischmann, I. Förster, W. Kastenmüller, W. Kolanus, M. Hölzel, E. Gaffal, and T. Tüting. 2014. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* 507: 109–13.
133. Hubbard, C., J. T. McNamara, C. Azumaya, M. S. Patel, and J. Zimmer. 2012. The hyaluronan synthase catalyzes the synthesis and membrane translocation of hyaluronan. *J. Mol. Biol.* 418: 21–31.
134. Campo, G. M., A. Avenoso, A. D’Ascola, V. Prestipino, M. Scuruchi, G. Nastasi, A. Calatroni, and S. Campo. 2012. Hyaluronan differently modulates TLR-4 and the inflammatory response in mouse chondrocytes. *Biofactors* 38: 69–76.
135. Scheibner, K. A., M. A. Lutz, S. Boodoo, M. J. Fenton, J. D. Powell, and M. R. Horton. 2006. Hyaluronan fragments act as an endogenous danger signal by engaging TLR2. *J. Immunol.* 177: 1272–81.

136. Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhé, P. Perrin, N. Romani, C. H. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, D. Kaiserlian, S. Saeland, J. Davoust, and B. Malissen. 2005. Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22: 643–54.
137. Pradhan, S., H. K. Kim, C. J. Thrash, M. A. Cox, S. K. Mantena, J.-H. Wu, M. Athar, S. K. Katiyar, C. A. Elmets, and L. Timares. 2008. A Critical Role for the Proapoptotic Protein Bid in Ultraviolet-Induced Immune Suppression and Cutaneous Apoptosis. *J. Immunol.* 181: 3077–3088.
138. Schwarz, A., M. Noordegraaf, A. Maeda, K. Torii, B. E. Clausen, and T. Schwarz. 2010. Langerhans cells are required for UVR-induced immunosuppression. *J. Invest. Dermatol.* 130: 1419–27.
139. Dandie, G. W., G. J. Clydesdale, I. Jacobs, and H. K. Muller. 1998. Effects of UV on the migration and function of epidermal antigen presenting cells. *Mutat. Res.* 422: 147–54.
140. Kripke, M. L., P. A. Cox, L. G. Alas, and D. B. Yarosh. 1992. Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 7516–20.
141. Vink, A. A., Y. Sontag, F. R. de Gruijl, L. Roza, and R. A. Baan. 1994. Immunochemical detection of cyclobutane thymine dimers in epidermal Langerhans cells of ultraviolet B-irradiated hairless mice. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10: 8–12.
142. Aberer, W., G. Schuler, G. Stingl, H. Hönigsmann, and K. Wolff. 1981. Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 76: 202–10.
143. Krutmann, J., I. U. Khan, R. S. Wallis, F. Zhang, E. A. Rich, J. J. Ellner, and C. A. Elmets. 1990. Cell membrane is a major locus for ultraviolet B-induced alterations in accessory cells. *J. Clin. Invest.* 85: 1529–36.
144. Tang, A., and M. C. Udey. 1991. Inhibition of epidermal Langerhans cell function by low dose ultraviolet B radiation. Ultraviolet B radiation selectively modulates ICAM-1 (CD54) expression by murine Langerhans cells. *J. Immunol.* 146: 3347–55.
145. Simon, J. C., T. Mosmann, D. Edelbaum, E. Schopf, P. R. Bergstresser, and P. D. Cruz. 1994. In vivo evidence that ultraviolet B-induced suppression of allergic contact sensitivity is associated with functional inactivation of Th1 cells. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 10: 206–11.
146. Boonstra, A., A. van Oudenaren, B. Barendregt, L. An, P. J. Leenen, and H. F. Savelkoul. 2000. UVB irradiation modulates systemic immune responses by affecting cytokine production of antigen-presenting cells. *Int. Immunol.* 12: 1531–8.
147. Steinbrink, K., M. Wölfl, H. Jonuleit, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J. Immunol.* 159: 4772–80.
148. Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller, and A. Mortha. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 563–604.
149. Stutte, S., B. Jux, C. Esser, and I. Förster. 2008. CD24a expression levels discriminate Langerhans cells from dermal dendritic cells in murine skin and lymph nodes. *J. Invest. Dermatol.* 128: 1470–5.

150. Ullrich, S. E. 1995. The role of epidermal cytokines in the generation of cutaneous immune reactions and ultraviolet radiation-induced immune suppression. *Photochem. Photobiol.* 62: 389–401.
151. Schade, N., C. Esser, and J. Krutmann. 2005. Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations. *Photochem. Photobiol. Sci.* 4: 699–708.
152. Cai, S., S. Batra, L. Shen, N. Wakamatsu, and S. Jeyaseelan. 2009. Both TRIF- and MyD88-dependent signaling contribute to host defense against pulmonary *Klebsiella* infection. *J. Immunol.* 183: 6629–38.
153. Soontrapa, K., T. Honda, D. Sakata, C. Yao, T. Hirata, S. Hori, T. Matsuoka, Y. Kita, T. Shimizu, K. Kabashima, and S. Narumiya. 2011. Prostaglandin E2-prostaglandin E receptor subtype 4 (EP4) signaling mediates UV irradiation-induced systemic immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 6668–73.
154. Fisher, M. S., and M. L. Kripke. 1977. Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 1688–1692.
155. Rivas, J. M., and S. E. Ullrich. 1992. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J. Immunol.* 149: 3865–71.
156. Rana, S., L. J. Rogers, and G. M. Halliday. 2011. Systemic low-dose UVB inhibits CD8 T cells and skin inflammation by alternative and novel mechanisms. *Am. J. Pathol.* 178: 2783–91.
157. McGlade, J. P., D. H. Strickland, M. J. M. Lambert, S. Gorman, J. A. Thomas, M. A. Judge, J. T. Burchell, G. R. Zosky, and P. H. Hart. 2010. UV inhibits allergic airways disease in mice by reducing effector CD4 T cells. *Clin. Exp. Allergy* 40: 772–85.
158. Geng, S., H. Matsushima, T. Okamoto, Y. Yao, R. Lu, K. Page, R. M. Blumenthal, N. L. Ward, T. Miyazaki, and A. Takashima. 2013. Emergence, origin, and function of neutrophil-dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice. *Blood* 121: 1690–700.
159. Fleming, T. J., M. L. Fleming, and T. R. Malek. 1993. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol.* 151: 2399–408.
160. Summers, C., S. M. Rankin, A. M. Condliffe, N. Singh, A. M. Peters, and E. R. Chilvers. 2010. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 31: 318–24.
161. Peters, A. M. 1998. Just how big is the pulmonary granulocyte pool? *Clin. Sci. (Lond)*. 94: 7–19.
162. Meador, J. A., R. B. Walter, and D. L. Mitchell. 2000. Induction, distribution and repair of UV photodamage in the platyfish, *Xiphophorus signum*. *Photochem. Photobiol.* 72: 260–6.
163. Bissonauth, V., R. Drouin, D. L. Mitchell, M. Rhainds, J. Claveau, and M. Rouabhia. 2000. The efficacy of a broad-spectrum sunscreen to protect engineered human skin from

- tissue and DNA damage induced by solar ultraviolet exposure. *Clin. Cancer Res.* 6: 4128–35.
164. Schwarz, A., A. Maeda, S. Ständer, H. van Steeg, and T. Schwarz. 2006. IL-18 reduces ultraviolet radiation-induced DNA damage and thereby affects photoimmunosuppression. *J. Immunol.* 176: 2896–901.
165. Kang, T.-H., J. T. Reardon, and A. Sancar. 2011. Regulation of nucleotide excision repair activity by transcriptional and post-transcriptional control of the XPA protein. *Nucleic Acids Res.* 39: 3176–87.
166. Müller-Röver, S., B. Handjiski, C. van der Veen, S. Eichmüller, K. Foitzik, I. A. McKay, K. S. Stenn, and R. Paus. 2001. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J. Invest. Dermatol.* 117: 3–15.
167. Plikus, M. V., and C.-M. Chuong. 2008. Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents. *J. Invest. Dermatol.* 128: 1071–80.
168. Lee, E.-J., Y. S. Lee, S. Hwang, S. Kim, J. S. Hwang, and T.-Y. Kim. 2011. N-(3,5-dimethylphenyl)-3-methoxybenzamide (A(3)B(5)) targets TRP-2 and inhibits melanogenesis and melanoma growth. *J. Invest. Dermatol.* 131: 1701–9.
169. Oancea, E., J. Vriens, S. Brauchi, J. Jun, I. Splawski, and D. E. Clapham. 2009. TRPM1 forms ion channels associated with melanin content in melanocytes. *Sci. Signal.* 2: ra21.
170. Ando, H., H. Kondoh, M. Ichihashi, and V. J. Hearing. 2007. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. *J. Invest. Dermatol.* 127: 751–61.
171. Park, H. Y., J. M. Perez, R. Laursen, M. Hara, and B. A. Gilchrist. 1999. Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 274: 16470–8.
172. Park, H.-Y., C. Wu, L. Yonemoto, M. Murphy-Smith, H. Wu, C. M. Stachur, and B. A. Gilchrist. 2006. MITF mediates cAMP-induced protein kinase C-beta expression in human melanocytes. *Biochem. J.* 395: 571–8.
173. Beuscher, H. U., C. Günther, and M. Röllinghoff. 1990. IL-1 beta is secreted by activated murine macrophages as biologically inactive precursor. *J. Immunol.* 144: 2179–83.
174. Cho, J. S., Y. Guo, R. I. Ramos, F. Hebroni, S. B. Plaisier, C. Xuan, J. L. Granick, H. Matsushima, A. Takashima, Y. Iwakura, A. L. Cheung, G. Cheng, D. J. Lee, S. I. Simon, and L. S. Miller. 2012. Neutrophil-derived IL-1 $\beta$  is sufficient for abscess formation in immunity against *Staphylococcus aureus* in mice. *PLoS Pathog.* 8: e1003047.
175. Supajatura, V., H. Ushio, A. Nakao, S. Akira, K. Okumura, C. Ra, and H. Ogawa. 2002. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J. Clin. Invest.* 109: 1351–9.
176. Kandere-Grzybowska, K., R. Letourneau, D. Kempuraj, J. Donelan, S. Poplawski, W. Boucher, A. Athanassiou, and T. C. Theoharides. 2003. IL-1 induces vesicular secretion of IL-6 without degranulation from human mast cells. *J. Immunol.* 171: 4830–6.



177. Kandere-Grzybowska, K., D. Kempuraj, J. Cao, C. L. Cetrulo, and T. C. Theoharides. 2006. Regulation of IL-1-induced selective IL-6 release from human mast cells and inhibition by quercetin. *Br. J. Pharmacol.* 148: 208–15.
178. Zheng, H., D. Fletcher, W. Kozak, M. Jiang, K. J. Hofmann, C. A. Conn, D. Soszynski, C. Grabcic, M. E. Trumbauer, and A. Shaw. 1995. Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity* 3: 9–19.
179. Fantuzzi, G., S. Sacco, P. Ghezzi, and C. A. Dinarello. 1997. Physiological and cytokine responses in IL-1 beta-deficient mice after zymosan-induced inflammation. *Am. J. Physiol.* 273: R400–6.
180. Zhang, X. W., Q. Liu, Y. Wang, and H. Thorlacius. 2001. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 133: 413–21.
181. Jarchum, I., M. Liu, C. Shi, M. Equinda, and E. G. Pamer. 2012. Critical role for MyD88-mediated neutrophil recruitment during *Clostridium difficile* colitis. *Infect. Immun.* 80: 2989–96.
182. Weighardt, H., S. Kaiser-Moore, R. M. Vabulas, C. J. Kirschning, H. Wagner, and B. Holzmann. 2002. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J. Immunol.* 169: 2823–7.
183. Khajah, M., B. Millen, D. C. Cara, C. Waterhouse, and D.-M. McCafferty. 2011. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): a chemoattractive agent for murine leukocytes in vivo. *J. Leukoc. Biol.* 89: 945–53.
184. Moulin, D., O. Donzé, D. Talabot-Ayer, F. Mézin, G. Palmer, and C. Gabay. 2007. Interleukin (IL)-33 induces the release of pro-inflammatory mediators by mast cells. *Cytokine* 40: 216–25.
185. Oxholm, A., P. Oxholm, B. Staberg, and K. Bendtzen. 1988. Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo. *Br. J. Dermatol.* 118: 369–76.
186. Vieira, S. M., H. P. Lemos, R. Grespan, M. H. Napimoga, D. Dal-Secco, A. Freitas, T. M. Cunha, W. A. Verri, D. A. Souza-Junior, M. C. Jamur, K. S. Fernandes, C. Oliver, J. S. Silva, M. M. Teixeira, and F. Q. Cunha. 2009. A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *Br. J. Pharmacol.* 158: 779–89.
187. Woodfin, A., C. A. Reichel, A. Khandoga, M. Corada, M.-B. Voisin, C. Scheiermann, D. O. Haskard, E. Dejana, F. Krombach, and S. Nourshargh. 2007. JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood* 110: 1848–56.
188. Collington, S. J., J. Hallgren, J. E. Pease, T. G. Jones, B. J. Rollins, J. Westwick, K. F. Austen, T. J. Williams, M. F. Gurish, and C. L. Weller. 2010. The role of the CCL2/CCR2 axis in mouse mast cell migration in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 184: 6114–23.
189. Abonia, J. P., K. F. Austen, B. J. Rollins, S. K. Joshi, R. A. Flavell, W. A. Kuziel, P. A. Koni, and M. F. Gurish. 2005. Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2. *Blood* 105: 4308–13.

190. Van Nguyen, H., N. Di Girolamo, N. Jackson, T. Hampartzoumian, P. Bullpitt, N. Tedla, and D. Wakefield. 2011. Ultraviolet radiation-induced cytokines promote mast cell accumulation and matrix metalloproteinase production: potential role in cutaneous lupus erythematosus. *Scand. J. Rheumatol.* 40: 197–204.
191. Yu, Q., C. Tang, S. Xun, T. Yajima, K. Takeda, and Y. Yoshikai. 2006. MyD88-dependent signaling for IL-15 production plays an important role in maintenance of CD8 alpha alpha TCR alpha beta and TCR gamma delta intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol.* 176: 6180–5.
192. Braunstein, S., G. Kaplan, A. B. Gottlieb, M. Schwartz, G. Walsh, R. M. Abalos, T. T. Fajardo, L. S. Guido, and J. G. Krueger. 1994. GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 103: 601–4.
193. Mann, A., K. Breuhahn, P. Schirmacher, and M. Blessing. 2001. Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J. Invest. Dermatol.* 117: 1382–90.
194. Devalaraja, R. M., L. B. Nanney, J. Du, Q. Qian, Y. Yu, M. N. Devalaraja, and A. Richmond. 2000. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J. Invest. Dermatol.* 115: 234–44.
195. Low, Q. E., I. A. Drugea, L. A. Duffner, D. G. Quinn, D. N. Cook, B. J. Rollins, E. J. Kovacs, and L. A. DiPietro. 2001. Wound healing in MIP-1alpha(-/-) and MCP-1(-/-) mice. *Am. J. Pathol.* 159: 457–63.
196. Marionnet, C., F. Bernerd, A. Dumas, F. Verrecchia, K. Mollier, D. Compan, B. Bernard, M. Lahfa, J. Leclaire, C. Medaisko, B. Mehul, S. Seit , A. Mauviel, and L. Dubertret. 2003. Modulation of gene expression induced in human epidermis by environmental stress in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 121: 1447–58.
197. Grimbaldston, M. A., C. L. Geczy, N. Tedla, J. J. Finlay-Jones, and P. H. Hart. 2003. S100A8 induction in keratinocytes by ultraviolet A irradiation is dependent on reactive oxygen intermediates. *J. Invest. Dermatol.* 121: 1168–74.
198. Vogl, T., K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M. A. D. van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, T. van der Poll, C. Sorg, and J. Roth. 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat. Med.* 13: 1042–9.
199. Nukui, T., R. Ehama, M. Sakaguchi, H. Sonogawa, C. Katagiri, T. Hibino, and N.-H. Huh. 2008. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *J. Cell. Biochem.* 104: 453–64.
200. Semerad, C. L., F. Liu, A. D. Gregory, K. Stumpf, and D. C. Link. 2002. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* 17: 413–23.
201. Suratt, B. T., J. M. Petty, S. K. Young, K. C. Malcolm, J. G. Lieber, J. A. Nick, J.-A. Gonzalo, P. M. Henson, and G. S. Worthen. 2004. Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood* 104: 565–71.
202. Petty, J. M., C. C. Lenox, D. J. Weiss, M. E. Poynter, and B. T. Suratt. 2009. Crosstalk between CXCR4/stromal derived factor-1 and VLA-4/VCAM-1 pathways regulates neutrophil retention in the bone marrow. *J. Immunol.* 182: 604–12.

203. Wengner, A. M., S. C. Pitchford, R. C. Furze, and S. M. Rankin. 2008. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood* 111: 42–9.
204. Eash, K. J., A. M. Greenbaum, P. K. Gopalan, and D. C. Link. 2010. CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *J. Clin. Invest.* 120: 2423–31.
205. Quinton, L. J., S. Nelson, D. M. Boé, P. Zhang, Q. Zhong, J. K. Kolls, and G. J. Bagby. 2002. The granulocyte colony-stimulating factor response after intrapulmonary and systemic bacterial challenges. *J. Infect. Dis.* 185: 1476–82.
206. Tazi, A., S. Nioche, J. Chastre, J. M. Smiéjan, and A. J. Hance. 1991. Spontaneous release of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) by alveolar macrophages in the course of bacterial pneumonia and sarcoidosis: endotoxin-dependent and endotoxin-independent G-CSF release by cells recovered by bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4: 140–7.
207. Weinlich, R., K. R. Bortoluci, C. F. Chehab, C. H. Serezani, A. G. Ulbrich, M. Peters-Golden, M. Russo, and G. P. Amarante-Mendes. 2008. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death Differ.* 15: 1901–9.
208. Sugimoto, Y., Y. Fukada, D. Mori, S. Tanaka, H. Yamane, Y. Okuno, K. Deai, S. Tsuchiya, G. Tsujimoto, and A. Ichikawa. 2005. Prostaglandin E2 Stimulates Granulocyte Colony-Stimulating Factor Production via the Prostanoid EP2 Receptor in Mouse Peritoneal Neutrophils. *J. Immunol.* 175: 2606–2612.
209. Serbina, N. V., and E. G. Pamer. 2006. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat. Immunol.* 7: 311–7.
210. Huang, D., J. Wang, P. Kivisakk, B. J. Rollins, and R. M. Ransohoff. 2001. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein 1 in Mice Leads to Decreased Local Macrophage Recruitment and Antigen-Specific T Helper Cell Type 1 Immune Response in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 193: 713–726.
211. Tsou, C.-L., W. Peters, Y. Si, S. Slaymaker, A. M. Aslanian, S. P. Weisberg, M. Mack, and I. F. Charo. 2007. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J. Clin. Invest.* 117: 902–9.
212. Shi, C., T. Jia, S. Mendez-Ferrer, T. M. Hohl, N. V. Serbina, L. Lipuma, I. Leiner, M. O. Li, P. S. Frenette, and E. G. Pamer. 2011. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity* 34: 590–601.
213. Méndez-Ferrer, S., T. V. Michurina, F. Ferraro, A. R. Mazloom, B. D. Macarthur, S. A. Lira, D. T. Scadden, A. Ma'ayan, G. N. Enikolopov, and P. S. Frenette. 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466: 829–34.
214. Omatsu, Y., T. Sugiyama, H. Kohara, G. Kondoh, N. Fujii, K. Kohno, and T. Nagasawa. 2010. The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33: 387–99.

215. Jia, T., I. Leiner, G. Dorothee, K. Brandl, and E. G. Pamer. 2009. MyD88 and Type I interferon receptor-mediated chemokine induction and monocyte recruitment during *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 183: 1271–8.
216. Van Eeden, S. F., Y. Kitagawa, M. E. Klut, E. Lawrence, and J. C. Hogg. 1997. Polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow preferentially sequester in lung microvessels. *Microcirculation* 4: 369–80.
217. Welbourn, C. R., and Y. Young. 1992. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br. J. Surg.* 79: 998–1003.
218. Andonegui, G., S. M. Goyert, and P. Kubes. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte-endothelial cell interactions: a role for CD14 versus toll-like receptor 4 within microvessels. *J. Immunol.* 169: 2111–9.
219. Andonegui, G., C. S. Bonder, F. Green, S. C. Mullaly, L. Zbytnuik, E. Raharjo, and P. Kubes. 2003. Endothelium-derived Toll-like receptor-4 is the key molecule in LPS-induced neutrophil sequestration into lungs. *J. Clin. Invest.* 111: 1011–20.
220. Neumann, B., N. Zantl, A. Veihelmann, K. Emmanuilidis, K. Pfeffer, C. D. Heidecke, and B. Holzmann. 1999. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int. Immunol.* 11: 217–27.
221. Worthen, G. S., C. Haslett, A. J. Rees, R. S. Gumbay, J. E. Henson, and P. M. Henson. 1987. Neutrophil-mediated pulmonary vascular injury. Synergistic effect of trace amounts of lipopolysaccharide and neutrophil stimuli on vascular permeability and neutrophil sequestration in the lung. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136: 19–28.
222. Brown, D. M., E. Drost, K. Donaldson, and W. MacNee. 1995. Deformability and CD11/CD18 expression of sequestered neutrophils in normal and inflamed lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13: 531–9.
223. Mukae, H., D. Zamfir, D. English, J. C. Hogg, and S. F. van Eeden. 2000. Polymorphonuclear leukocytes released from the bone marrow by granulocyte colony-stimulating factor: intravascular behavior. *Hematol. J.* 1: 159–71.
224. Yoshida, K., R. Kondo, Q. Wang, and C. M. Doerschuk. 2006. Neutrophil cytoskeletal rearrangements during capillary sequestration in bacterial pneumonia in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174: 689–98.
225. Fischelevich, R., Y. Zhao, P. Tuchinda, H. Liu, A. Nakazono, A. Tammaro, T.-C. Meng, J. Lee, and A. A. Gaspari. 2011. Imiquimod-induced TLR7 signaling enhances repair of DNA damage induced by ultraviolet light in bone marrow-derived cells. *J. Immunol.* 187: 1664–73.
226. Thatcher, T. H., I. Luzina, R. Fischelevich, M. A. Tomai, R. L. Miller, and A. A. Gaspari. 2006. Topical imiquimod treatment prevents UV-light induced loss of contact hypersensitivity and immune tolerance. *J. Invest. Dermatol.* 126: 821–31.
227. Sommariva, M., L. De Cecco, M. De Cesare, L. Sfondrini, S. Ménard, C. Melani, D. Delia, N. Zaffaroni, G. Pratesi, V. Uva, E. Tagliabue, and A. Balsari. 2011. TLR9 agonists oppositely modulate DNA repair genes in tumor versus immune cells and enhance chemotherapy effects. *Cancer Res.* 71: 6382–90.

228. Schwarz, A., S. Ständer, M. Berneburg, M. Böhm, D. Kulms, H. van Steeg, K. Grosse-Heitmeyer, J. Krutmann, and T. Schwarz. 2002. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat. Cell Biol.* 4: 26–31.
229. Antille, C., C. Tran, O. Sorg, P. Carraux, L. Didierjean, and J.-H. Saurat. 2003. Vitamin A exerts a photoprotective action in skin by absorbing ultraviolet B radiation. *J. Invest. Dermatol.* 121: 1163–7.
230. Sorg, O., C. Tran, P. Carraux, D. Grand, A. Hügin, L. Didierjean, and J.-H. Saurat. Spectral properties of topical retinoids prevent DNA damage and apoptosis after acute UV-B exposure in hairless mice. *Photochem. Photobiol.* 81: 830–6.
231. Stahl, W., and H. Sies. 2012.  $\beta$ -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am. J. Clin. Nutr.* 96: 1179S–84S.
232. De Haes, P., M. Garmyn, A. Verstuyf, P. De Clercq, M. Vandewalle, H. Degreef, K. Vantieghem, R. Bouillon, and S. Segaert. 2005. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and analogues protect primary human keratinocytes against UVB-induced DNA damage. *J. Photochem. Photobiol. B.* 78: 141–8.
233. De Haes, P., M. Garmyn, H. Degreef, K. Vantieghem, R. Bouillon, and S. Segaert. 2003. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits ultraviolet B-induced apoptosis, Jun kinase activation, and interleukin-6 production in primary human keratinocytes. *J. Cell. Biochem.* 89: 663–73.
234. Wei, H., R. Saladi, Y. Lu, Y. Wang, S. R. Palep, J. Moore, R. Phelps, E. Shyong, and M. G. Lebwohl. 2003. Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *J. Nutr.* 133: 3811S–3819S.
235. Lee, J., and J. I. Youn. 1998. The photoprotective effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on ultraviolet light B-induced damage in keratinocyte and its mechanism of action. *J. Dermatol. Sci.* 18: 11–8.
236. Gordon-Thomson, C., R. Gupta, W. Tongkao-on, A. Ryan, G. M. Halliday, and R. S. Mason. 2012. 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D3 enhances cellular defences against UV-induced oxidative and other forms of DNA damage in skin. *Photochem. Photobiol. Sci.* 11: 1837–47.
237. Trémezaygues, L., M. Seifert, W. Tilgen, and J. Reichrath. 2009. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) protects human keratinocytes against UV-B-induced damage: In vitro analysis of cell viability/proliferation, DNA-damage and -repair. *Dermatoendocrinol.* 1: 239–45.
238. Schaubert, J., R. A. Dorschner, A. B. Coda, A. S. Büchau, P. T. Liu, D. Kiken, Y. R. Helfrich, S. Kang, H. Z. Elalieh, A. Steinmeyer, U. Zügel, D. D. Bikle, R. L. Modlin, and R. L. Gallo. 2007. Injury enhances TLR2 function and antimicrobial peptide expression through a vitamin D-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 117: 803–11.
239. Chen, Y., W. Liu, T. Sun, Y. Huang, Y. Wang, D. K. Deb, D. Yoon, J. Kong, R. Thadhani, and Y. C. Li. 2013. 1,25-Dihydroxyvitamin D promotes negative feedback regulation of TLR signaling via targeting microRNA-155-SOCS1 in macrophages. *J. Immunol.* 190: 3687–95.
240. Kölgen, W., H. Both, H. van Weelden, K. L. H. Guikers, C. A. F. M. Bruijnzeel-Koomen, E. F. Knol, W. A. van Vloten, and F. R. De Grujil. 2002. Epidermal langerhans cell depletion after artificial ultraviolet B irradiation of human skin in vivo: apoptosis versus migration. *J. Invest. Dermatol.* 118: 812–7.

241. Klaschik, S., D. Tross, H. Shirota, and D. M. Klinman. 2010. Short- and long-term changes in gene expression mediated by the activation of TLR9. *Mol. Immunol.* 47: 1317–24.
242. Majewski, S., C. Jantschitsch, A. Maeda, T. Schwarz, and A. Schwarz. 2010. IL-23 antagonizes UVR-induced immunosuppression through two mechanisms: reduction of UVR-induced DNA damage and inhibition of UVR-induced regulatory T cells. *J. Invest. Dermatol.* 130: 554–62.
243. Zhong, X., K. Thornton, and E. Reed. 2000. Computer based analyses of the 5'-flanking regions of selected genes involved in the nucleotide excision repair complex. *Int. J. Oncol.* 17: 375–80.
244. Ahmad, I., E. Simanyi, P. Guroji, I. A. Tamimi, H. J. delaRosa, A. Nagar, P. Nagar, S. K. Katiyar, C. A. Elmets, and N. Yusuf. 2014. Toll-like receptor-4 deficiency enhances repair of UVR-induced cutaneous DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *J. Invest. Dermatol.* 134: 1710–7.
245. Schauer, E., F. Trautinger, A. Köck, A. Schwarz, R. Bhardwaj, M. Simon, J. C. Ansel, T. Schwarz, and T. A. Luger. 1994. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J. Clin. Invest.* 93: 2258–62.
246. Manaka, L., S. Kadono, M. Kawashima, T. Kobayashi, and G. Imokawa. 2001. The mechanism of hyperpigmentation in seborrheic keratosis involves the high expression of endothelin-converting enzyme-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ , which stimulate secretion of endothelin 1. *Br. J. Dermatol.* 145: 895–903.
247. Hachiya, A., A. Kobayashi, A. Ohuchi, Y. Takema, and G. Imokawa. 2001. The paracrine role of stem cell factor/c-kit signaling in the activation of human melanocytes in ultraviolet-B-induced pigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 116: 578–86.
248. Imokawa, G., T. Kobayashi, M. Miyagishi, K. Higashi, and Y. Yada. 1997. The role of endothelin-1 in epidermal hyperpigmentation and signaling mechanisms of mitogenesis and melanogenesis. *Pigment Cell Res.* 10: 218–28.
249. Halaban, R., R. Langdon, N. Birchall, C. Cuono, A. Baird, G. Scott, G. Moellmann, and J. McGuire. 1988. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J. Cell Biol.* 107: 1611–9.
250. Yaar, M., K. Grossman, M. Eller, and B. A. Gilchrist. 1991. Evidence for nerve growth factor-mediated paracrine effects in human epidermis. *J. Cell Biol.* 115: 821–8.
251. Matsumoto, K., H. Tajima, and T. Nakamura. 1991. Hepatocyte growth factor is a potent stimulator of human melanocyte DNA synthesis and growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176: 45–51.
252. Chakraborty, A. K., Y. Funasaka, A. Slominski, G. Ermak, J. Hwang, J. M. Pawelek, and M. Ichihashi. 1996. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim. Biophys. Acta* 1313: 130–8.
253. Abdel-Malek, Z., M. C. Scott, I. Suzuki, A. Tada, S. Im, L. Lamoreux, S. Ito, G. Barsh, and V. J. Hearing. 2000. The melanocortin-1 receptor is a key regulator of human cutaneous pigmentation. *Pigment Cell Res.* 13 Suppl 8: 156–62.

254. Jin, S. H., and H. Y. Kang. 2010. Activation of Toll-like Receptors 1, 2, 4, 5, and 7 on Human Melanocytes Modulate Pigmentation. *Ann. Dermatol.* 22: 486–9.
255. Ahn, J. H., T. J. Park, S. H. Jin, and H. Y. Kang. 2008. Human melanocytes express functional Toll-like receptor 4. *Exp. Dermatol.* 17: 412–7.
256. Kang, H. Y., T. J. Park, and S. H. Jin. 2009. Imiquimod, a Toll-like receptor 7 agonist, inhibits melanogenesis and proliferation of human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 129: 243–6.
257. Fritsche, E., C. Schäfer, C. Calles, T. Bernsmann, T. Bernshausen, M. Wurm, U. Hübenthal, J. E. Cline, H. Hajimiragha, P. Schroeder, L.-O. Klotz, A. Rannug, P. Fürst, H. Hanenberg, J. Abel, and J. Krutmann. 2007. Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104: 8851–6.
258. Imokawa, G., Y. Yada, M. Kimura, and N. Morisaki. 1996. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is an intrinsic keratinocyte-derived growth factor for human melanocytes in UVA-induced melanosis. *Biochem. J.* 313 (Pt 2): 625–31.
259. Mui, A. L., H. Wakao, A. M. O'Farrell, N. Harada, and A. Miyajima. 1995. Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *EMBO J.* 14: 1166–75.
260. Wang, Y., K. K. Morella, J. Ripperger, C. F. Lai, D. P. Gearing, G. H. Fey, S. P. Campos, and H. Baumann. 1995. Receptors for interleukin-3 (IL-3) and growth hormone mediate an IL-6-type transcriptional induction in the presence of JAK2 or STAT3. *Blood* 86: 1671–9.
261. Okuda, K., J. S. Sanghera, S. L. Pelech, Y. Kanakura, M. Hallek, J. D. Griffin, and B. J. Druker. 1992. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3, and steel factor induce rapid tyrosine phosphorylation of p42 and p44 MAP kinase. *Blood* 79: 2880–7.
262. Hirobe, T., R. Furuya, E. Hara, I. Horii, M. Tsunenaga, and O. Ifuku. 2004. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) controls the proliferation and differentiation of mouse epidermal melanocytes from pigmented spots induced by ultraviolet radiation B. *Pigment Cell Res.* 17: 230–40.
263. Hirobe, T., R. Furuya, O. Ifuku, M. Osawa, and S.-I. Nishikawa. 2004. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a keratinocyte-derived factor involved in regulating the proliferation and differentiation of neonatal mouse epidermal melanocytes in culture. *Exp. Cell Res.* 297: 593–606.
264. Stang, A., J. Stausberg, W. Boedeker, H. Kerek-Bodden, and K.-H. Jöckel. 2008. Nationwide hospitalization costs of skin melanoma and non-melanoma skin cancer in Germany. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venerol.* 22: 65–72.
265. Narayanan, D. L., R. N. Saladi, and J. L. Fox. 2010. Ultraviolet radiation and skin cancer. *Int. J. Dermatol.* 49: 978–86.
266. Glanz, K., M. Saraiya, and H. Wechsler. 2002. Guidelines for school programs to prevent skin cancer. *MMWR. Recomm. Rep.* 51: 1–18.

## DANKSAGUNG

Zuallererst gilt ein herzlicher Dank Frau PD Dr. Heike Weighardt und Frau Prof. Irmgard Förster, die mir die Möglichkeit eröffnet haben, meine Dissertation am Leibniz-Institut für Umweltmedizinische Forschung in Düsseldorf und am Life and Medical Sciences Institut in Bonn zu verfassen sowie der Man-  
chot-Stiftung für die Finanzierung meines Forschungsprojektes.

Für das Interesse an meiner Arbeit und ihrer Begutachtung danke ich Herrn Prof. Sven Burgdorf.

Ein großer Dank gebührt Martina, Philip, Björn und Ingo, die mir immer wieder helfend zur Seite standen.

Neben meinen Kollegen möchte ich mich erneut bei Frau Dr. Heike Weighardt für die in jeglicher Hinsicht exzellente Betreuung meiner Arbeit bedanken.

Marc danke ich ganz herzlich für den grandiosen finalen Computersupport.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre Unterstützung sowie meinen Freunden für die zahlreichen lustigen und motivierenden Stunden abseits der Promotion.

Die letzten Zeilen dieser Arbeit sollen meiner Freundin Danica gewidmet sein, die durch ihren unendlichen Rückhalt entscheidenden Anteil an dieser Arbeit hat.



