

# **Rolle des Adaptermoleküls MyD88 im Mausmodell der Lichtalterung und Photokarzinogenese**

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

vorgelegt von  
**Friederike Viola Opitz**  
aus  
Düsseldorf

Bonn, im August 2016

**aus dem Life and Medical Science-Institut (LIMES),  
Arbeitsgruppe Immunologie und Umwelt  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn**

**und dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF),  
Liaisongruppe Angeborene Immunität und extrinsische Hautalterung  
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

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. Waldemar Kolanus

Tag der Promotion: 27.01.2017  
Erscheinungsjahr: 2017

# Eidesstattliche Erklärung

An Eides statt versichere ich, dass

die vorgelegte Arbeit – abgesehen von den ausdrücklich bezeichneten Hilfsmitteln – persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde,

die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht wurde,

die vorgelegte Arbeit oder ähnliche Arbeiten nicht bereits anderweitig als Dissertation eingereicht worden ist bzw. sind,

ich keinen früheren Promotionsversuch unternommen habe,

ich für die inhaltlich-materielle Erstellung der vorgelegten Arbeit keine fremde Hilfe, insbesondere keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe,

die vorgelegte Dissertation weder vollständig noch auszugsweise veröffentlicht worden ist.

Bonn, den 8.8.2016

Friederike Viola Opitz

# Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bedanken bei:

**PD Dr. Heike Weighardt** für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und die vielen Anregungen und Gespräche. Ganz besonders möchte ich mich bei Ihr dafür bedanken, dass ich Sie jederzeit um Rat fragen durfte und Sie es immer wieder geschafft hat in jedem Ergebnis etwas Positives zu sehen und mich damit oft zum Weitermachen motiviert hat.

**Prof. Dr. Waldemar Kolanus** für die Übernahme des Referats und das Interesse an meiner Arbeit.

**Prof. Dr. Irmgard Förster** für die Möglichkeit in Ihrer Gruppe arbeiten zu dürfen, das Interesse an meiner Arbeit, die Unterstützung und die vielen Anregungen.

der **Leibniz Gemeinschaft** und dem **IUF Leibniz-Institut** (Düsseldorf) für die finanzielle Unterstützung.

allen aus der **AG Förster/Weighardt: Björn, Fabi, Jessi, Julia, Lorenz, Martina, Nancy, Nina, Oli, Pauli, Philip, Philippa, Sonja, Tamara**. Gerade in der letzten Hälfte meiner Doktorarbeit sind wir zu einem super Team zusammengewachsen. Es ist super mit Euch zusammenzuarbeiten und ich konnte immer auf Euch zählen, wenn ich Hilfe brauchte. Ich werde Euch vermissen. Auch die Zeit, die wir außerhalb der Labors miteinander verbracht haben. Besonders möchte ich hier **Philippa** danken, die mich während ihrer Bachelorarbeit super unterstützt hat und **Sonja** für das schnelle Korrekturlesen meiner Arbeit.

meinen **Freunden**. Danke, dass Ihr es akzeptiert habt, dass ich oft keine Zeit für Euch hatte. Ich hoffe das wird sich in Zukunft ändern. Hier gilt mein ganz besonderer Dank meinen besten Freundinnen **Vali** und **Nancy**. Ihr habt Euch immer meine Probleme angehört, egal ob beruflich oder privat, konntet mich in stressigen Phasen ablenken und habt Euch mit mir zusammen gefreut. Ohne Eure aufbauenden Worte wäre ich manches Mal verzweifelt und hätte mich nur halb so viel über die schönen Dinge freuen können.

meiner **Familie**. Vor allem danke ich **meinen Eltern**. Ihr habt mich in all meinen Entscheidungen unterstützt und immer an mich geglaubt. Ihr habt mir gezeigt, was im Leben wichtig ist: Sachen die man sich vorgenommen hat, durchzuziehen und vor allem nicht aufzugeben, auch wenn man an seine Grenzen stößt, sondern diese als Herausforderung anzunehmen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>		<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>		<b>X</b>
<b>1 Einleitung</b>		<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem . . . . .		1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem . . . . .		3
1.1.2 Das erworbene Immunsystem . . . . .		6
1.2 Die Haut . . . . .		7
1.2.1 Epidermis . . . . .		8
1.2.2 Dermis . . . . .		12
1.3 UV-Strahlung . . . . .		14
1.3.1 Physikalische Grundlagen . . . . .		14
1.3.2 Der Einfluss von UV-Strahlung auf das angeborene Immunsystem . . .		15
1.3.3 UVB-induzierte Lichtalterung der Haut . . . . .		16
1.3.4 UVB-induzierte Photokarzinogenese . . . . .		18
1.4 Fragestellung . . . . .		21
<b>2 Material und Methoden</b>		<b>23</b>
2.1 Material . . . . .		23
2.1.1 Verwendete Geräte . . . . .		23
2.1.2 Verbrauchsmaterialien . . . . .		25
2.1.3 Zellkulturmedien . . . . .		26
2.1.4 Puffer und Lösungen . . . . .		27
2.1.5 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien . . . . .		28
2.1.6 Primer . . . . .		31
2.1.7 Antikörper . . . . .		33
2.1.8 Verwendete Kits . . . . .		35
2.1.9 Programmsoftware . . . . .		36
2.2 Methoden . . . . .		37

2.2.1	Tierhaltung . . . . .	37
2.2.2	Genetik der Versuchstiere . . . . .	37
2.2.3	Genotypisierung der Versuchstiere . . . . .	39
2.2.4	Isolierung und Kultivierung primärer Keratinozyten . . . . .	39
2.2.5	Isolierung und Kultivierung primärer embryonaler Fibroblasten . . . . .	40
2.2.6	Trypanblau-Vital-Färbung . . . . .	41
2.2.7	<i>in vitro</i> Bestrahlung primärer Keratinozyten . . . . .	41
2.2.8	<i>in vitro</i> Bestrahlung primärer embryonaler Fibroblasten . . . . .	42
2.2.9	Chronische UVB-Bestrahlung (Lichtalterung) . . . . .	42
2.2.10	Modell für UVB-induzierte Photokarzinogenese . . . . .	43
2.2.11	Präparation der Rückenhaut . . . . .	44
2.2.12	Isolierung genomischer DNS aus der Rückenhaut . . . . .	44
2.2.13	South-Western-Blot . . . . .	44
2.2.14	RNS-Isolierung aus der Rückenhaut . . . . .	45
2.2.15	Real-Time PCR . . . . .	46
2.2.16	Herstellung von Proteinlysaten aus der Haut . . . . .	48
2.2.17	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) . . . . .	48
2.2.18	Anfertigung von Gefrierschnitten am Kryostaten . . . . .	50
2.2.19	Hämatoxylin/Eosin (H&E)-Färbung . . . . .	50
2.2.20	Toluidinfärbung . . . . .	50
2.2.21	Immunfluoreszenzfärbung . . . . .	51
2.2.22	TUNEL-Färbung . . . . .	52
2.2.23	Gewebeeinbettung mit dem Kunststoff JB-4 . . . . .	52
2.2.24	Elastika van Gieson-Färbung . . . . .	53
2.2.25	Masson-Goldner Trichrom-Färbung . . . . .	53
2.2.26	Präparation der brachialen Lymphknoten . . . . .	54
2.2.27	Durchflusszytometrie (FACS) . . . . .	54
2.2.28	Serumgewinnung . . . . .	55
2.2.29	Melaninmessung . . . . .	56
2.2.30	Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) . . . . .	56
2.2.31	Auswertung und Statistik . . . . .	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>58</b>
3.1	Die Rolle von MyD88 nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	58
3.1.1	UVB-induzierte Entzündungsreaktion der Haut . . . . .	58
3.1.2	Pigmentierung und DNS-Schaden . . . . .	63
3.1.3	UVB-induzierte Veränderungen der Strukturkomponenten der Epidermis	68

3.1.4	UVB-induzierte Veränderungen der Strukturkomponenten der Dermis . . . . .	78
3.1.5	UVB-induzierte Veränderungen der Immunzellen in der Haut . . . . .	84
3.1.6	UVB-induzierte Immunantwort im Haut-drainierenden Lymphknoten . . . . .	89
3.1.7	Humorale Immunantwort . . . . .	94
3.2	Zelltyp-abhängige Funktion von MyD88 im Modell der Lichtalterung . . . . .	98
3.2.1	Makrophagen-spezifische Rolle von MyD88 im Modell der Lichtalterung . . . . .	98
3.2.2	Keratinocyten-spezifische Rolle von MyD88 im Modell der Lichtalterung . . . . .	102
3.2.3	Spezifische Rolle von MyD88 in dendritischen Zellen im Modell der Lichtalterung . . . . .	105
3.2.4	Mastzell-spezifische Rolle von MyD88 im Modell der Lichtalterung . . . . .	108
3.3	Die Rolle von MyD88 im Modell der Photokarzinogenese . . . . .	113
3.3.1	Etablierung des Photokarzinogenese-Modells . . . . .	113
3.3.2	Der Einfluss von MyD88 auf die Tumorbildung . . . . .	118
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>121</b>
4.1	Die Wechselwirkung zwischen dem angeborenen Immunsystem und der Lichtal- terung . . . . .	122
4.1.1	Die Rolle des Adapterproteins MyD88 bei Entzündungsreaktionen und DNS-Schäden im Mausmodell der Lichtalterung . . . . .	122
4.1.2	Der Einfluss von MyD88 auf epidermale Veränderungen im Mausmodell der Lichtalterung . . . . .	127
4.1.3	Der Effekt des Adapterproteins MyD88 auf dermale Veränderungen im Mausmodell der Lichtalterung . . . . .	130
4.1.4	UVB-induzierte Aktivierung des erworbenen Immunsystems . . . . .	134
4.1.5	Die systemische Funktion von MyD88 im Mausmodell der Lichtalterung . . . . .	134
4.2	Die Wechselwirkungen zwischen dem angeborenen Immunsystem und der Ent- stehung der Photokarzinogenese . . . . .	136
4.3	Klinische Relevanz und Ausblick . . . . .	138
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>139</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> . . . . .	<b>141</b>
	Literatur . . . . .	143

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des TLR/MyD88-Signalweges . . . . .	5
Abb. 2	Schematischer Aufbau der Epidermis und Keratinozytendifferenzierung . . . . .	9
Abb. 3	Schematischer Aufbau der Haut . . . . .	12
Abb. 4	Einteilung der UV-Strahlung und deren Eindringtiefe in die Haut . . . . .	14
Abb. 5	Lichtalterung der Haut . . . . .	17
Abb. 6	Genetisches Mausmodell . . . . .	38
Abb. 7	Modell zur sechswöchigen chronischen UVB-Bestrahlung . . . . .	43
Abb. 8	Modell zur Photokarzinogenese . . . . .	43
Abb. 9	Keine Induktion proinflammatorischer Zytokine im Modell der Lichtalterung . . . . .	59
Abb. 10	UVB- und MyD88-unabhängige Expression von CD11b in der Dermis . . . . .	60
Abb. 11	AMPs können MyD88-abhängig durch chronische UVB-Bestrahlung hochreguliert werden . . . . .	61
Abb. 12	Die Melaninkonzentration in der Epidermis ist unabhängig von MyD88 . . . . .	63
Abb. 13	UVB-induzierte Formation von CPDs ist abhängig von MyD88 . . . . .	65
Abb. 14	Das Fehlen von MyD88 erhöht die Apoptoserate in der Epidermis nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	66
Abb. 15	Die Induktion der mRNS-Expression des DNS-Reparaturenzyms XPA durch UVB ist abhängig von MyD88 . . . . .	67
Abb. 16	UVB-induzierte Verdickung der Epidermis ist abhängig von MyD88 . . . . .	70
Abb. 17	MyD88-abhängige Aktivierung basaler Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung . . . . .	71
Abb. 18	MyD88-unabhängige Aktivierung der K6-Expression nach UVB-Bestrahlung . . . . .	72
Abb. 19	MyD88-unabhängige Aktivierung der K10- und K1-Expression nach UVB-Bestrahlung . . . . .	74
Abb. 20	MyD88-abhängige Produktion von IL-1 $\alpha$ ist unabhängig von der UVB-Bestrahlung . . . . .	75
Abb. 21	MyD88-unabhängige Expression der <i>Cornified Envelope</i> -Proteine . . . . .	77
Abb. 22	MyD88-abhängige Expression der Hyaluronsäure-Synthasen (HAS) 1-3 nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	79
Abb. 23	Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Kollagenfragmente der Dermis . . . . .	81

Abb. 24	chronische UVB-Bestrahlung führt zur Zerstörung des elastischen Fasernetzwerks . . . . .	83
Abb. 25	MyD88-unabhängige Reduktion der Langerhanszellen in der Epidermis nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	84
Abb. 26	Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Frequenz der Langerhanszellen im drainierenden brachialen Lymphknoten . . . . .	85
Abb. 27	MyD88-unabhängige Reduktion der $\gamma\delta$ T-Zellen in der Epidermis nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	86
Abb. 28	Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Frequenz der $\gamma\delta$ T-Zellen im drainierenden brachialen Lymphknoten . . . . .	87
Abb. 29	MyD88-abhängiger Anstieg der Mastzell-Anzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	88
Abb. 30	MyD88-abhängiger Anstieg der Zellzahlen im brachialen Lymphknoten nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	89
Abb. 31	Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Frequenz der dendritischen Zellen im drainierenden brachialen Lymphknoten . . . . .	91
Abb. 32	Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Frequenz der verschiedenen T-Zellpopulationen im drainierenden brachialen Lymphknoten . . . . .	92
Abb. 33	chronische UVB-Bestrahlung hat einen leichten Einfluss auf die Frequenz der B-Zellen im drainierenden brachialen Lymphknoten . . . . .	93
Abb. 34	MyD88-defiziente Mäuse haben eine signifikant höhere IgE-Konzentration im Serum . . . . .	94
Abb. 35	MyD88-defiziente Mäuse zeigen eine signifikant höhere Produktion des T <sub>H</sub> 2-Zytokins IL-13 nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	95
Abb. 36	MyD88-defiziente Mäuse zeigen eine signifikant geringere Produktion des Chemokins CCL22 nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	96
Abb. 37	Die Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen führt nach chronischer UVB-Bestrahlung zu weniger DNS-Schäden in der Haut . . . . .	99
Abb. 38	Die Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen hat keinen Einfluss auf die Epidermisdicke nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	100
Abb. 39	Die Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen kann teilweise die Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung wiederherstellen . . . . .	101
Abb. 40	Die Reexpression von MyD88 in Keratinozyten hat keinen Einfluss auf die CPD-Formation nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	103
Abb. 41	Die Reexpression von MyD88 in Keratinozyten stellt die Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung wieder her . . . . .	104

Abb. 42	Die Reexpression von MyD88 in Keratinozyten hat einen geringen Einfluss auf die Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung . . .	105
Abb. 43	Die Reexpression von MyD88 in Dendritischen Zellen hat keinen Einfluss auf die CPD-Formation nach chronischer UVB-Bestrahlung . . . . .	106
Abb. 44	Die Reexpression von MyD88 in dendritischen Zellen stellt die Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung wieder her . . . . .	107
Abb. 45	Die Reexpression von MyD88 in dendritischen Zellen kann teilweise die Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung wiederherstellen	108
Abb. 46	Die Reexpression von MyD88 in Mastzellen führt nach chronischer UVB-Bestrahlung zu weniger DNS-Schäden in der Haut . . . . .	109
Abb. 47	Die Reexpression von MyD88 in Mastzellen stellt die Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung wieder her . . . . .	110
Abb. 48	Die Reexpression von MyD88 in Mastzellen führt zur vollständigen Wiederherstellung der Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung	111
Abb. 49	UVB-induzierte Tumorbildung im Vorversuch zur Photokarzinogenese . . . .	115
Abb. 50	Genotypen-unabhängige signifikante Epidermisverdickung im Vorversuch zur Photokarzinogenese . . . . .	116
Abb. 51	MyD88-abhängige Barrierestörung im Vorversuch zur Photokarzinogenese . .	117
Abb. 52	MyD88-unabhängige CPD-Formation im Vorversuch zur Photokarzinogenese	118
Abb. 53	Die Expression von MyD88 in Keratinozyten führt zu einer geringeren Tumorbildung im Modell der Photokarzinogenese . . . . .	119

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Verwendete Geräte . . . . .	23
Tab. 2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	25
Tab. 3	Zellkulturmedien . . . . .	26
Tab. 4	Puffer und Lösungen . . . . .	27
Tab. 5	Chemikalien, Enzyme und Reagenzien . . . . .	28
Tab. 6	Primer für die Genotypisierung . . . . .	31
Tab. 7	Primer für die RT-PCR . . . . .	32
Tab. 8	Antikörper für die Durchflusszytometrie . . . . .	33
Tab. 9	Antikörper für die Histologie . . . . .	34
Tab. 10	Antikörper für South-Western Blot . . . . .	34
Tab. 11	Zweitantikörper . . . . .	35
Tab. 12	Verwendete Kits . . . . .	35
Tab. 13	Programmsoftware . . . . .	36
Tab. 14	Reaktionsansatz für Genotypisierungs-PCR á 20µl . . . . .	40
Tab. 15	UVB-abhängiger Einfluss von MyD88-abhängigen Signalwegen in Makrophagen (MyD88 <sup>LysMIND</sup> ), Keratinozyten (MyD88 <sup>K5IND</sup> ), DZ (MyD88 <sup>CCL17IND</sup> ) und Mastzellen (MyD88 <sup>Mcpt5IND</sup> ) auf den Schutz vor CPD-Bildung, die Verdickung der Epidermis und die Induktion der Mastozytose . . . . .	112

## Abkürzungsverzeichnis

Für Mengen-, Größen-, Zeit- oder andere physikalischen Angaben wurden SI- (Internationales Einheitssystem) oder gesetzliche Einheiten gewählt. Auch wurden für gängige Chemikalien, sofern nicht anders angegeben, Summenformeln oder die darauf beruhenden Namen benutzt (bspw. HCl für Chlorwasserstoff).

<b>A.dest.</b>	<i>lat. aqua destillata</i> , destilliertes Wasser
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AMP</b>	Antimikrobielle Peptide
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>APZ</b>	Antigen-präsentierende Zellen
<b>B-Zelle</b>	B-Lymphozyt: <i>bone marrow lymphocyte</i> (im Knochenmark reifend)
<b>BD3</b>	beta-Defensin 3
<b>bio</b>	Biotin
<b>BMDZ</b>	Knochenmarks-generierte dendritische Zellen
<b>BMMZ</b>	Knochenmarks-generierte Mastzellen
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BPE</b>	Bovine Pituitary Extract
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CCL</b>	C-C <i>motif</i> Ligand
<b>CCR</b>	C-C <i>chemokine receptor</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CLR</b>	C-type Lektin Rezeptor
<b>COMP</b>	<i>Cartilage Oligomeric Matrix Protein</i>
<b>CPD</b>	Cyclobutan-Pyrimidindimere
<b>CRAMP</b>	<i>Cathelidin-related antimicrobial peptide</i>
<b>Cre</b>	<i>cyclization recombination</i>
<b>CXCL</b>	C-X-C <i>motif</i> Ligand
<b>Cy</b>	Cyanin

---

<b>DAMP</b>	<i>Danger-Associated Molecular Pattern</i> (Gefahr-assoziierte molekulare Muster)
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DeltaOD</b>	Differenz der optischen Dichte bei zwei Wellenlängen (bei Absorptionsmessungen)
<b>DD</b>	<i>Death Domain</i> (Todesdomäne)
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>DZ</b>	dendritische Zellen
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>et. al</b>	<i>Lat: et alii</i> (und andere)
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum
<b>FITC</b>	Fluorescein-Isothiocyanat
<b>FSC</b>	<i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte Macrophage-Colony Stimulation Factor</i>
<b>HA</b>	<i>hyaluronic acid</i> (Hyaluronsäure)
<b>HAS</b>	Hyaluronsäure-Synthase
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HRP</b>	<i>Horse Radish Peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
<b>ID</b>	intermediäre Domäne
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>K</b>	Keratin
<b>KC</b>	<i>Keratinocyte-derived Chemokine</i> (CXCL1)
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>LRR</b>	<i>Leucin-rich repeats</i>
<b>LSL</b>	lox-stop-lox
<b>LZ</b>	Langerhanszellen
<b>MAL</b>	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
<b>MCDB</b>	<i>Molecular, Cellular and Developmental Biology</i>
<b>MED</b>	minimale erythemale Dosis
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>mRNS</b>	<i>messengerRNS</i>
<b>MyD88</b>	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
<b>NER</b>	Nukleotidexzisionsreparatur
<b>NK-Zelle</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NLR</b>	Nod-like Rezeptor
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PerCP</b>	Peridinin-Chlorophyll-Protein
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PRR</b>	<i>Pattern Recognition receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
<b>R</b>	Rezeptor
<b>RLR</b>	RIG-I-like Rezeptor
<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	<i>Rounds Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SAV</b>	Streptavidin
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl Sulfat
<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i> (Standardfehler)
<b>SPF</b>	Spezifisch Pathogenfrei
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
<b>SWB</b>	South-Western Blot
<b>T-Zelle</b>	T-Lymphozyt (Thymus-abhängig)
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>Taq</b>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
<b>TBS</b>	<i>Tris-buffered Saline</i>
<b>TBS-T</b>	<i>Tris-buffered Saline Tween20</i>
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin

<b>TEWL</b>	<i>Transepidermal Water Loss</i> (Transepidermaler Wasserverlust)
<b>TGF</b>	<i>Transforming Growth Factor</i>
<b>TIR</b>	Toll/Interleukin-1-Rezeptor
<b>TIRAP</b>	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
<b>TLR</b>	Toll-like Rezeptor
<b>TNF</b>	Tumornekrosefaktor
<b>TRAM</b>	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
<b>TRIF</b>	<i>TIR-domain containing adaptor protein inducing interferon-<math>\beta</math></i>
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>XPA</b>	<i>Xeroderma Pigmentosum complementation group A</i>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Körper auf komplexe Weise vor Krankheitserregern und schädigenden Umwelteinflüssen. Hierfür muss das Immunsystem dazu in der Lage sein, eine vorhandene Gefährdung im Körper zu erkennen, um sie anschließend bekämpfen zu können. Zur gleichen Zeit muss eine Regulation des Immunsystems erfolgen, um sicherzustellen, dass keine unnötigen Schäden im Körper entstehen. Weiterhin gehört es zu den Aufgaben des Immunsystems, einen lang anhaltenden Schutz zu gewährleisten, welcher durch die Ausbildung des immunologischen Gedächtnis erfolgt. Das Immunsystem unterteilt man in das angeborene und adaptive Immunsystem, welche miteinander interagieren. Hierbei stellt das angeborene Immunsystem die erste Verteidigungslinie gegen Krankheitserreger dar. Es erkennt eindringende Pathogene über Keimbahn-kodierte Rezeptoren und leitet umgehend Reaktionen zur Eliminierung dieser ein [1]. Zusätzlich dazu gibt es bei Vertebraten das adaptive Immunsystem. Der Vorteil dieses Systems ist, dass es durch die spezialisierten variablen Antigenrezeptoren auf den T-/B-Zelloberflächen Pathogene spezifischer erkennen und wirksamer beseitigen kann. Es braucht jedoch drei bis vier Tage bis die Aktivierung beginnt und bis zu zwei Wochen bis spezifische Antikörper gebildet sind. Nach der Beseitigung einer Infektion behält das adaptive Immunsystem in der Regel Gedächtniszellen zurück, um bei einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen dieses schnell eliminieren zu können.

Alle Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems stammen von denselben Vorläuferzellen ab, den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Hieraus entstehen zwei verschiedene Typen an Stammzellen, die lymphatische und die myeloide Vorläuferzelle aus denen sich lymphoide, wie auch myeloide Zellen differenzieren. Die lymphatische Zelllinie besteht aus T-, B- und NK-Zellen, wobei die T- und B-Zellen dem adaptiven und die NK-Zellen dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu umfasst die myeloide Zelllinie die übrigen Immunzellen des angeborenen Immunsystems, wie dendritische Zellen (DZ), Makrophagen und Mastzellen. Zusätzlich gehören dieser Zelllinie die Blutplättchen und Erythrozyten an.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind im ganzen Körper lokalisiert. In den Grenzorganen wie der Haut, den Schleimhäuten der Atemwege oder des Darms, sind sie gewebeständig. Hier überwachen sie, ob Pathogene die physikalische Barriere durchdringen, um sofort eine Immunreaktion des angeborenen Immunsystems aktivieren zu können. So können zum Beispiel Gewebe-residente Makrophagen, die sich in Geweben aufhalten, mithilfe von Rezeptoren, die allgemeine Bestandteile von Bakterien erkennen, Pathogene aufnehmen und zerstören. Gleichzeitig sezernieren sie Zytokine und Chemokine, um andere Zellen zur Verstärkung anzulocken.

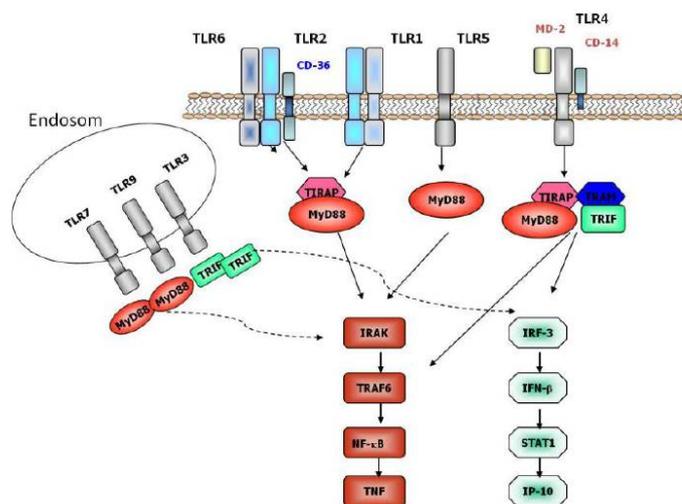
Die Besonderheit des angeborenen Immunsystems ist, dass die Zellen ein fest kodiertes Repertoire an Rezeptoren zur Erkennung von Pathogenen besitzen. Diese Rezeptoren sind auf den Oberflächen von Zellen des angeborenen Immunsystems, aber auch intrazellulär zu finden und nennt man *Pattern Recognition receptor* (Mustererkennungsrezeptor)s (PRRs). Sie sind Keimbahn-kodierte Proteine und erkennen konservierte einfache Moleküle oder regelmäßige molekulare Strukturmuster von Mikroorganismen. Diese spezifischen Strukturen werden *Pathogen-Associated Molecular Pattern* (Pathogen-assoziierte molekulare Muster) (PAMP) genannt. Durch diesen Erkennungsmechanismus ist sichergestellt, dass Immunzellen zwischen körpereigenen und -fremden Zellen unterscheiden können. So werden beispielsweise Gram-negative Bakterien an ihrem Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) erkannt. PRRs werden in mehrere Rezeptorfamilien unterteilt: Toll-like Rezeptor (TLR), RIG-I-like Rezeptor (RLR)), Nod-like Rezeptor (NLR), C-type Lektin Rezeptor (CLR) und Scavenger-Rezeptoren (zusammengefasst in [2]).

In den späten 1980er Jahren entdeckte C. Nüsslein-Volhard in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* das Gen "Toll", welches eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung spielt [3]. Erst später wurde bekannt, dass diese Toll-Rezeptoren auch in der adulten Fliege eine Rolle bei der antimykotischen Immunabwehr spielen [4] und es konnten Orthologe dieses Toll-Gens in Säugetieren identifiziert werden, die eine wichtige Rolle bei der Immunantwort des angeborenen Immunsystems spielen [5].

TLRs gehören zu den Typ1-Transmembranproteinen und ihr gemeinsames Erkennungsmerkmal ist der gleiche strukturelle Aufbau aus einer Ektodomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Hierbei beinhaltet die Ektodomäne *Leucin-rich repeats* (LRR) und die zytoplasmatische Domäne besteht aus einer Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR)-Domäne. Diese ist für die Signalweiterleitung essenziell (zusammengefasst in [6]). TLRs unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisierung und ihre Liganden und werden demzufolge in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe besteht aus TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11, welche auf Zelloberflächen exprimiert werden und mikrobielle Membranbestandteile, wie Proteine, Lipide, Lipoproteine

und komplexere Strukturen wie LPS erkennen. Die zweite Gruppe beinhaltet die TLRs 3,7,8 und 9. Diese sind in intrazellulären Vesikeln, wie dem Endoplasmatischen Reticulum, Endosom, Lysosom oder Endolysosom lokalisiert und erkennen mikrobielle und virale Nukleinsäuren (zusammengefasst in [7]).

TLRs können durch die Rekrutierung der Adaptermoleküle *Myeloid differentiation factor 88* (MyD88) oder *TIR-domain containing adaptor protein inducing interferon- $\beta$*  (TRIF) zwei unterschiedliche Signalwege aktivieren. Hierbei ist MyD88 bei allen TLR-induzierten Signalwegen, außer bei TLR3, beteiligt (Abb. 1). Für die Aktivierung der Signalwege über TLR2 und TLR4



**Abbildung 1. Schematische Darstellung des TLR/MyD88-Signalweges** modifiziert nach [8]

Das Adapterprotein MyD88 kann von allen TLRs bis auf TLR3 aktiviert werden. Dies geschieht entweder direkt oder indirekt über TIRAP. Diese Signalaktivierung endet in der Aktivierung von NF- $\kappa$ B, welches in den Zellkern transloziert und dort die Transkription proinflammatorischer Zytokine wie TNF veranlasst.

bedarf es zur Rekrutierung von MyD88 einen weiteren Adapter namens *MyD88-adaptor-like protein* (MAL) (zusammengefasst in [9]). Die Rekrutierung von MyD88 führt zu der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B. Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B hat dessen Wanderung in den Zellkern und dort die Induktion proinflammatorischer Gene zur Folge. Das Adaptermolekül MyD88 ist ein im Zytosol lokalisiertes Protein. Es besteht aus drei Domänen, der N-terminalen Todesdomäne *Death Domain* (Todesdomäne) (DD), der intermediäre Domäne (ID) und der C-terminalen TIR-Domäne, wobei die TIR-Domäne von MyD88 an die TIR-Domäne der TLRs direkt oder indirekt über *TIR domain-containing adaptor protein* (TIRAP) bindet (zusammengefasst in [4]). Im Gegensatz dazu wird TRIF über das Molekül *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) an TLR4 gebunden (zusammengefasst in [7]).

Die Zellen des angeborenen Immunsystems zeichnen sich dadurch aus, dass sie Pathogene bspw. über TLRs erkennen können und so eine schnelle Bekämpfung dieser gewährleisten oder Zellen des erworbenen Immunsystems aktivieren. Einer dieser Zelltypen stellen die Mastzellen

dar. Nach ihrer Aktivierung sezernieren sie Substanzen wie Serinproteasen, Histamin, Chemokine und Zytokine. Diese wirken entweder direkt gegen die Pathogene oder aktivieren und locken andere Immunzellen zur Unterstützung an (zusammengefasst in [10]). Unter dem Begriff Antigen-präsentierende Zellen (APZ) sind DZ und Makrophagen zusammengefasst. Sie sind mononukleare Phagozyten, die in die Gewebe einwandern. Dort phagozytieren sie Pathogene und reifen heran. Makrophagen zerstören die aufgenommenen Pathogene in intrazellulären Vesikeln und können diese wie DZ auf ihrer Oberfläche über *Major Histocompatibility Complex* (MHC)II-Moleküle präsentieren. Daher werden beide Zelltypen auch professionelle APZ genannt. Die Antigenpräsentation führt zu der Aktivierung von T- und B-Zellen, die daraufhin eine gezielte Aktivierung des erworbenen Immunsystems einleiten. So wandern aktivierte DZ in den drainierenden Lymphknoten ein, wo sie den zirkulierenden T-Zellen das Antigen präsentieren und gleichzeitig Zytokine sezernieren, um die Differenzierung der T-Helferzellen zu steuern (zusammengefasst in [11][12]).

### 1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Die Zellen des erworbenen Immunsystems entstammen lymphoiden Vorläuferzellen, die sich in B- und T-Zellen differenzieren. Im Gegensatz zu den Rezeptoren der Zellen des angeborenen Immunsystems, bestehen die Rezeptoren der B- und T-Zellen aus variablen Gensegmenten, die während der Zellentwicklung beliebig kombiniert werden können. Dies führt zu einem großen Repertoire an Bindungsmöglichkeiten, da jede naive B- und T-Zelle eine einzigartige Rezeptorstruktur aufweist. Diese Prozesse nennt man somatische Rekombination [13].

Um eine adaptive Immunantwort auszulösen, müssen in den peripheren lymphatischen Organen naive T-Zellen mit aktivierten antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt kommen. Die T-Zell-Reifung findet im Thymus statt, aus der die T-Zellen als naive reife T-Zellen hervorgehen, die für CD4- oder CD8-positiv sind. Da naive T-Zellen ihrem spezifischen Antigen zur Aktivierung begegnen müssen, zirkulieren sie durch die lymphatischen Organe und überprüfen dort die Antigene, die sich als Peptid:MHC-Komplex an der Oberfläche der APZ befinden [14]. Hat eine naive T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkannt wird sie zu einer T-Effektorzelle aktiviert. Hier gibt es die CD4-T-Zellen (T-Helferzellen), die Peptide erkennen, die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Sie werden unter anderem in die Subpopulationen Th1, Th2 und Th17 unterteilt und können verschiedene immunologische Funktionen ausführen, die aktivierende oder inhibierende Aktivitäten beinhalten [15]. CD8-T-Zellen erkennen Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Es folgt eine Differenzierung zu zytotoxischen T-Effektorzellen, die dafür zuständig sind, infizierte Zellen zu erkennen und diese abzutöten [16]. Viele der CD4- und CD8-T-Zellen exprimieren den  $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors. Im Gegensatz dazu gibt es jedoch auch T-Zellen, die einen  $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor aufweisen. Diese T-Zellen weisen auch Funktionen des angeborenen Immunsystems auf [17][18].

Durch die Sekretion von Antikörpern bekämpfen B-Zellen Pathogene in den Extrazellulärräumen des Körpers. Diese Sekretion wird durch die Aktivierung der B-Zellen von T-Helferzellen vermittelt. Hierbei wird durch die zusätzliche Bindung von T-Helferzellen, die spezifisch für dasselbe Antigen sind, die B-Zelle zur Antikörpersekretion aktiviert. Diese Aktivierung des Immunsystems nennt man auch die humorale Immunantwort. B-Zellen können abhängig von ihrer Aktivierung verschiedene Klassen von Antikörpern freisetzen. So sezerniert jede B-Zelle anfangs Immunglobulin (Ig)M. Durch einen Klassenwechsel, an dem T-Helferzellen beteiligt sind, können auch andere Immunglobuline freigesetzt werden. So vermitteln  $T_H1$ -Zellen beispielsweise den Klassenwechsel zu IgG2a/c, wohingegen  $T_H2$ -Zellen zur Sezernierung von IgE und IgG1 führen [19]. Die Antikörper sind dafür zuständig, dass das Pathogen durch Neutralisierung, Opsonisierung oder Aktivierung des Komplementsystems beseitigt wird [20].

Das Besondere des erworbenen Immunsystems ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Während der Beseitigung der Pathogene durch T- und B-Zellen bilden sich gleichzeitig Gedächtniszellen. Diese ermöglichen es, den Körper vor einer erneuten Infektion mit demselben Pathogen zu schützen, da sie bei einer erneuten Infektion sehr schnell auf dieses Pathogen reagieren und es beseitigen können.

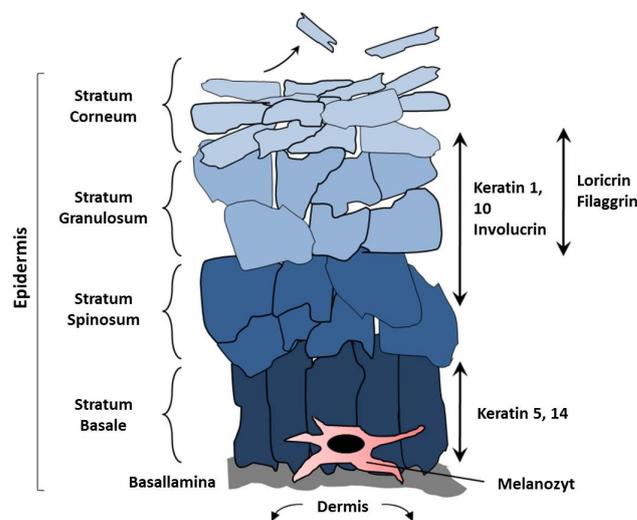
## 1.2 Die Haut

Mit einer Fläche von  $1,8 \text{ m}^2$  ist die Haut das größte Organ des Körpers und stellt ein komplexes Netzwerk aus strukturgebenden und immunologischen Zellen dar. Sie grenzt den Körper zur Umwelt ab und fungiert als schützende Barriere, sodass der Körper vor potenziellen Erregern, toxischen Substanzen und Umwelteinflüssen wie beispielsweise UV-Strahlung abgeschirmt ist. Anatomisch lässt sich die Haut in die äußere, der Umwelt zugewandte Epidermis und die darunter liegende Dermis unterteilen. Grundsätzlich ist die Haut von Mensch und Maus gleich aufgebaut. Jedoch gibt es Unterschiede in der Dicke. So besteht die Mausepidermis aus drei Zellschichten und ist maximal  $25 \text{ }\mu\text{m}$  dick. Im Gegensatz dazu besteht die Epidermis des Menschen aus sechs bis zehn Zellschichten und ist mindestens  $100 \text{ }\mu\text{m}$  dick. Des Weiteren fehlt beim Menschen eine Muskelschicht in der Dermis, die in der Maushaut zu finden ist [21].

### 1.2.1 Epidermis

Die Epidermis ist die äußere der Umwelt zugewandte Schicht der Haut und dient als physikalische Barriere zur Aussenwelt. Obwohl sie im Vergleich zur Dermis sehr dünn ist, sorgt sie dafür, dass der Körper nicht unkontrolliert Wasser verliert, da durch *Tight Junctions* verbunden die Keratinozyten ein dichtes Netzwerk ausbilden. Die Basallamina separiert die Epidermis von der Dermis. Über der Basallamina liegt das *Stratum Basale*. Hier befinden sich hauptsächlich sich

schnell teilende Stammzellen [22][23], die eine nicht unendliche Anzahl an Teilungen durchlaufen. Sie treten in den Differenzierungsprozess ein und werden durch die darunter proliferierenden Zellen in Richtung der Hautoberfläche geschoben [24]. Die Hautoberfläche bilden abgestorbene Zellen, die keinen Zellkern mehr besitzen und abgeflacht sind. Dieser Prozess dient der konstanten Selbsterneuerung der Haut. Während dieses epidermalen Differenzierungsprozesses unterscheidet man anhand ihres Phänotyps und ihrer biochemischen Eigenschaften folgende vier Keratinozytenarten: Keratinozyten der Basal- (*Stratum Basale*), Stachelzell- (*Stratum Spinosum*), Körnerzell- (*Stratum Granulosum*) und Hornschicht (*Stratum Corneum*) [25]. Die basalen Keratinozyten sitzen direkt oberhalb der Basallamina und sind mitotisch aktiv. Sie exprimieren Keratin (K)5 und K14 (Abb. 2) [26].



**Abbildung 2. Schematischer Aufbau der Epidermis und Keratinozytendifferenzierung** modifiziert nach [27]

Die Epidermis gliedert sich von außen nach innen in die Schichten Stratum Corneum, Stratum Granulosum, Stratum Spinosum und Stratum Basale mit der darunter liegenden Basallamina, die an die Dermis grenzt und Melanozyten enthält. Auf der rechten Seite sind für die Schichten typische Keratine und Strukturkomponente der Epidermis bezeichnet.

Sie lösen sich von der Basallamina, stoppen ihre mitotische Aktivität und werden aus dem *Stratum Basale* in das *Stratum Spinosum* geschoben. Nur hier exprimieren die Keratinozyten K1 und K10 [28][29]. Werden jedoch die Keratinozyten durch beispielsweise Verletzungen der Haut aktiviert, exprimieren sie anstelle von K1 und K10 die Keratine K6 und K16 [30][31]. Des Weiteren werden im *Stratum Granulosum* Filaggrin und Vorläufer der *Cornified Envelope* Proteine Involucrin und Loricrin exprimiert. Die Zellen enden im *Stratum Corneum* mit dem Verlust des Zellkerns und der Verhornung [32]. Während des Verhornungsprozesses wird der *Cornified Envelope* gebildet. Dieser Prozess beginnt, wie oben beschrieben, indem die Keratinozyten K1 und K10 exprimieren und ihre mitotische Aktivität verlieren. Im fortgeschrittenen Stadium besitzen die Zellen Keratohyalin-Granula, welche den Vorläufer von Filaggrin, das Profilaggrin,

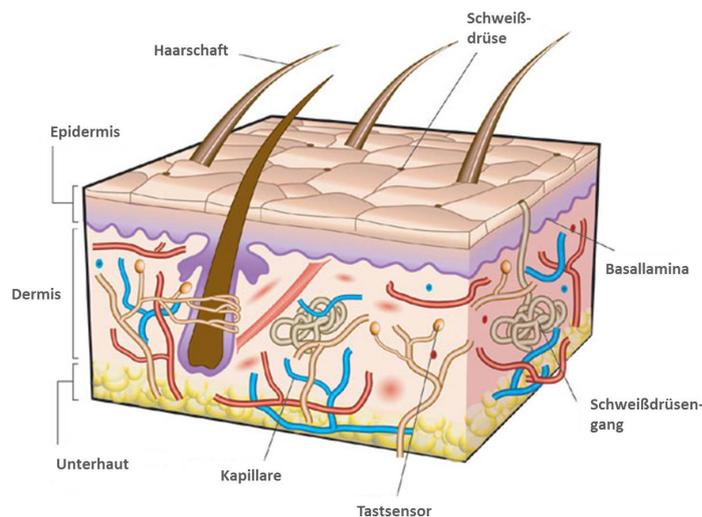
beinhalten. Anschließend verbindet Filaggrin die Keratinfilamente zu dichten Bündeln, was zum Zusammenfall der Zelle führt und für die flache Form der Korneozyten verantwortlich ist. Dieser Keratinozyten-Filaggrin-Komplex stellt das Grundgerüst des *Cornified Envelopes* dar. An diese werden durch Transglutaminasen andere synthetisierte Strukturproteine wie Involucrin und Loricrin vernetzt [33][34][35].

Keratinozyten tragen zum Schutz des Körpers vor UV-Strahlung bei. Durch UV-Strahlung werden Melanozyten dazu aktiviert, Melanin zu bilden. Dieses Melanin nehmen die Keratinozyten auf und lagern es zum Schutz um ihren Zellkern. Das Melanin absorbiert die UV-Strahlen und schützt so vor DNS-Schäden [36][37]. Hierbei transportieren die Melanozyten das Melanin in sogenannten Melanosomen über dendritische Zellausläufer und geben es an die Keratinozyten ab [38]. Keratinozyten bilden jedoch nicht nur eine Schutzbarriere und dienen der Hauterneuerung. Auch sind sie wichtige Bestandteile des immunologischen Netzwerks der Haut. So können sie beispielsweise Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren, sowie auch Rezeptoren exprimieren, um auf diese Botenstoffe reagieren zu können [39].

Zusätzlich zu den Keratinozyten befinden sich auch andere Immunzellen, die Langerhanszellen (LZ) und  $\gamma\delta$ T-Zellen, in der Epidermis.  $\gamma\delta$ T-Zellen findet man in der Epidermis im Gegensatz zum Menschen nur in der Maus, wo sie den invarianten konservierten T-Zell-Rezeptor  $V\gamma 3$  tragen [40]. LZ gehören zu den Zellen des angeborenen Immunsystems. Sie sind die DZ der Epidermis. LZ exprimieren den CLR Langerin (CD207), welcher in Abhängigkeit von Kalzium Pathogene binden kann [41]. Durch die Expression von E-Cadherin sind sie mit den Keratinozyten verbunden und bilden mit ihnen ein Netzwerk, indem ihre dendritischen Ausläufer *tight junctions* mit den Keratinozyten bilden. Dieses Netzwerk dient als immunologische Barriere, um Pathogenen abwehren zu können. Nach Erkennung und Aufnahme der Pathogene wandern sie in den drainierenden Lymphknoten ein. Dort präsentieren sie die prozessierten Antigene den T-Zellen und aktivieren so das erworbene Immunsystem [42]. In der Epidermis von Mäusen findet man zudem auch  $\gamma\delta$ T-Zellen. Sie spielen eine wichtige Rolle während der Wundheilung und der Keratinozyten-Homöostase [43]. Auch besitzen  $\gamma\delta$ T-Zellen Eigenschaften, die man von anderen Zellen des angeborenen Immunsystems kennt. So können sie Stresssignale, die andere Zellen aussenden, erfassen und schnell darauf reagieren. Aus diesem Grund erfüllen sie eine Vielzahl an Aufgaben, wie Schutz vor intra- und extrazellulären Pathogenen, Tumorüberwachung und Einleitung der Wundheilung [44][45][46].

### 1.2.2 Dermis

Die Dermis liegt unterhalb der Epidermis, getrennt durch die Basallamina. Sie besteht größtenteils aus Kollagen-produzierenden Fibroblasten, die der Haut ihre Struktur geben. Des Weiteren sind hier Blut- und Lymphgefäße, Tastsensoren, Haarwurzeln, sowie Schweißdrüsen, deren Poren in der Epidermis enden, zu finden (Abb. 3). Die extrazelluläre Matrix der Dermis besteht



**Abbildung 3. Schematischer Aufbau der Haut** modifiziert nach [47]

Die Haut gliedert sich in Epidermis, Dermis und Unterhaut. Der Umwelt zugewandt befindet sich die Epidermis, wo die Schweißdrüsenöffnungen enden. Sie bildet die physikalische Barriere zur Umwelt. Die Basallamina separiert die Epidermis von der darunter liegenden Dermis. Die Dermis ist im Vergleich zur Epidermis dicker. Hier befinden sich Blutgefäße, Tastsensoren und Schweißdrüsen. Abgegrenzt wird diese zum Körper durch die Unterhaut.

aus einem Netzwerk von Fibroblasten und Proteinen wie Kollagen und elastischen Fasern. Hierbei besitzen Fibroblasten Integrine der  $\beta 1$ -Familie, die vor allem Matrixrezeptoren darstellen. Sie binden an Typ-I-Kollagen und verbinden über spezifische Bindungen extrazelluläre Kollagenfasern mit dem intrazellulären Aktinzytoskelett. Dieses Netzwerk führt zu einer mechanischen Spannung der Fibroblasten und somit auch der Dermis. In der Dermis kommen am häufigsten die Kollagentypen I und III vor. Diese bilden zusammen Fibrillen und verleihen der Dermis ihre Zugfestigkeit [48][49]. Diese Kollagentypen können durch die Kollagenase MMP-1 abgebaut werden, die durch UV-Strahlung aktiviert werden kann. Eine weitere wichtige Eigenschaft der Haut ist die Elastizität und Dehnbarkeit. Diese Eigenschaften werden durch die elastischen Fasern ermöglicht, welche in junger Haut durch die gesamte Dermis in einem Netzwerk angeordnet sind [50][51]. Ein weiterer essentieller Bestandteil der Dermis ist die Hyaluronsäure (HA). Diese ist ein lineares Glukosaminoglykan und wird durch drei transmembrane Hyaluronsäure-Synthasen (HAS1-3) synthetisiert. HA ist für die biomechanische Integrität der Haut verantwortlich [52]. Hyaluronsäure kann jedoch auch auf zellulärer Ebene Rezeptoren aktivieren, die Einfluss auf die Proliferation und Migration von Fibroblasten [53],

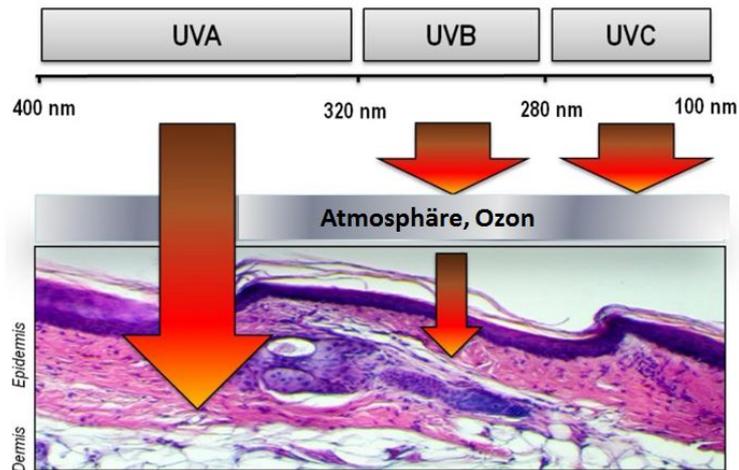
sowie auf die Regeneration von Keratinozyten [52] haben. Auch führt HA zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems über TLR4 [54].

Auch in der Dermis befinden sich Immunzellen. Wird die Epidermis verletzt, können Pathogene bis in die Dermis dringen und werden von dermalen DZ erkannt. Diese migrieren, wie die LZ aus der Epidermis, zum drainierenden Lymphknoten, um dort eine Immunantwort des erworbenen Immunsystems zu aktivieren. Ein anderer essenzieller Zelltyp in der Dermis sind die Neutrophilen, die bei einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems in die Dermis einwandern und eine Entzündungsreaktion auslösen. Sie sind Zellen des angeborenen Immunsystems und sind Bestandteile der "*first line of defence*". Sie zirkulieren im Blut, bis sie bei Infektionen durch die Gefäßwand in die betroffenen Gewebe migrieren, um dort die Pathogene durch das Einleiten einer Entzündungsreaktion zu bekämpfen [55][56]. Des Weiteren spielen Mastzellen eine Rolle in der Immunabwehr vor allem in den der Umwelt zugewandten Geweben. So findet man diese auch in der Dermis [57]. Sie besitzen Granula, in denen sie biologisch aktive Mediatorstoffe speichern, die sie durch Degranulation zur Bekämpfung von Pathogenen freisetzen können [58]. Auch sind in der Dermis Zellen des angeborenen Immunsystems, die B- und T-Zellen, zu finden. Sie erfüllen hier wie in 1.1.2 beschrieben wichtige Funktionen der erworbenen Immunität und werden durch Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert.

## 1.3 UV-Strahlung

### 1.3.1 Physikalische Grundlagen

UV-Strahlung gehört zu der elektromagnetischen Strahlung des Sonnenlichts, welches in drei verschiedenen Kategorien eingeteilt wird: Infrarotstrahlung, sichtbares Licht und UV-Strahlung. UV-Strahlen weisen ein Spektrum der Wellenlängen von 100-400nm auf (Abb. 4). Hierbei wird die UV-Strahlung anhand der Wellenlänge in drei Unterkategorien eingeteilt: UVA- (320-400nm), UVB- (280-320nm) und UVC-Licht (100-280nm). Hierbei gilt je kurzwelliger, desto energiereicher ist die UV-Strahlung. So wird sehr kurzwelliges UV-Licht vom molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) absorbiert. In Folge wird der Sauerstoff durch die sehr energiereiche Strahlung gespalten und kann zu Ozon ( $O_3$ ) weiter reagieren. Dies hat zur Folge, dass das kurzwellige UVC-Licht in der Atmosphäre nur bis zur Ozonschicht dringt. Je langwelliger das UV-Licht, desto mehr erreicht die Erdoberfläche. So trifft das langwellige UVA-Licht vollständig auf die Erde, wohingegen das UVB-Licht mit einer mittleren Wellenlänge die Erde nur teilweise erreicht [27][59][60][61].



**Abbildung 4. Einteilung der UV-Strahlung und deren Eindringtiefe in die Haut** modifiziert nach [27]

Die Eindringtiefe der UV-Strahlen in die Haut unterscheidet sich abhängig von ihrer Wellenlänge. So dringt die langwellige UVA-Strahlung bis tief in die Dermis ein, wohingegen die kurzwelligere UVB-Strahlung nur die obersten Schichten der Dermis erreicht. Im Gegensatz dazu wird die UVC-Strahlung in der Atmosphäre von der Ozonschicht absorbiert und gelangt nicht bis zur Erdoberfläche.

Gleiches gilt auch für die Eindringtiefe der UV-Strahlen in die Haut. Die langwelligen UVA-Strahlen dringen durch die Haut bis tief in die Dermis ein. Dahingegen dringen die kurzwelligeren UVB-Strahlen beim Menschen nur in die oberste Schicht der Dermis ein. Dennoch können die UVB-Strahlen größere Schäden anrichten, da sie energiereicher sind und somit mehr Potenzial besitzen, schädlich auf den Körper einzuwirken [27][62].

### 1.3.2 Der Einfluss von UV-Strahlung auf das angeborene Immunsystem

Übermäßige Exposition gegenüber UV-Strahlung kann zum Sonnenbrand führen. Unter Sonnenbrand versteht man eine UV-induzierte Entzündungsreaktion der Haut. Wie schnell und in welchem Ausmaß dieser entsteht, ist abhängig vom einzelnen Individuum und wird durch den Hauttyp und die Pigmentierung beeinflusst. So kann ein Sonnenbrand zu einer Rötung der Haut bis hin zur Blasenbildung führen [63]. Bei diesem Prozess aktiviert die UV-Strahlung das angeborene Immunsystem. Durch die Zerstörung der Hautbarriere und der Schädigung der DNS werden Zellen des angeborenen Immunsystems aktiviert. Diese Aktivierung des Immunsystems führt zu einer Entzündungsreaktion in der Haut. Diese äußert sich mit der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie beispielsweise TNF und Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , welche durch Keratinozyten in der Epidermis oder DZ, Mastzellen und Fibroblasten in der Dermis ausgeschüttet werden und zu einer Rekrutierung der Neutrophilen in die Dermis führt [64][65][66][67].

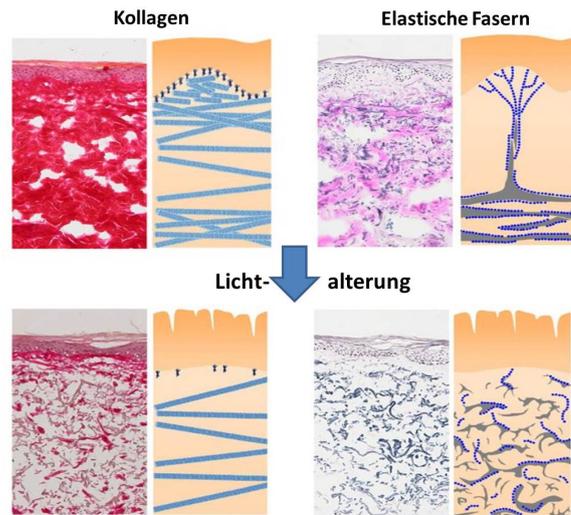
Vor allem UVB-Strahlen führen aber auch zu direkten Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Schäden in den Zellen der Epidermis und Dermis, da diese als Chromophor wirken und die UV-Strahlung

absorbieren. Bei diesem Prozess werden die Basen der DNS geschädigt und verändert [68][69]. Die am häufigsten vorkommenden DNS-Schäden, die spezifisch von UVB-Strahlen induziert werden, sind (6-4)-Photoprodukte und Cyclobutan-Pyrimidindimeres (CPDs). CPDs entstehen durch die kovalente Bindung benachbarter Thyminen und bilden so einen Cyclobutanring, was zu einer Strukturveränderung innerhalb des DNS-Strangs führt. Diese Strukturveränderung führt zu Mutationen bei der Replikation und begünstigt die Tumorentstehung [70][71]. Auch können durch UV-Strahlung Basenprodukte wie 8-Hydroxydesoxyguanosin entstehen, welche als DAMP das angeborene Immunsystem direkt aktivieren kann [72]. Auch können Alarmine gebildet werden, die wiederum Immunantworten über TLRs induzieren. Andererseits können die veränderten und entstehenden molekularen Strukturen die TLRs selbst aktivieren [73]. Dieser Mechanismus ist gleich dem der Pathogene, die als PAMPs von TLRs erkannt werden. Diese vom Organismus selbst stammenden veränderten molekularen Strukturen, die von TLRs erkannt werden nennt man *Danger-Associated Molecular Pattern* (Gefahr-assoziierte molekulare Muster)s (DAMPs). Diese DAMPs führen zu sterilen Entzündungen im Körper [74][75].

Jedoch besitzt der Körper eigene Schutzfunktionen gegen UV-induzierte DNS-Schäden. Diese sind einerseits die direkte Reparatur von DNS-Schäden mithilfe der Nukleotidexzisionsreparatur, die fortwährend UV-induzierte DNS-Schäden repariert (zusammengefasst in [76]) und die Bräunung der Haut. Hierbei aktivieren die UV-Strahlen Melanozyten zur Melaninbildung. Dieses Melanin geben die Melanozyten an die Keratinozyten der Epidermis weiter. Die Keratinozyten lagern das Melanin zum Schutz um ihre Zellkerne, da das Melanin die UVB-Strahlen absorbiert [77].

### 1.3.3 UVB-induzierte Lichtalterung der Haut

Zu den durch UV-Strahlen entstehenden Langzeitveränderungen der Haut gehören neben der Tumorbildung nicht maligne Prozesse, wie die Lichtalterung (*Photoaging*), die unter diesem Begriff das erste Mal 1986 in der Literatur beschrieben wurde [78]. Im Gegensatz zu der intrinsischen chronologischen Hautalterung ist die extrinsische vorzeitige Hautalterung (Lichtalterung) schon in jungen Individuen festzustellen. Gemeinsamkeiten der beiden Arten der Hautalterung ist die Faltenbildung und eine verminderte Zugfestigkeit der Haut, die durch die Reduktion von Kollagenbündeln und Elastischen Fasern in der Dermis herrühren. Die Unterschiede ergeben sich jedoch auf molekularer Ebene (Abb. 5).



**Abbildung 5. Lichtalterung der Haut** modifiziert nach [79]

Die Lichtalterung der Haut führt in der Dermis zu einem Verlust des Kollagengehalts, sowie zur Zerstörung des Netzwerks aus elastischen Fasern. Diese sind für die Faltenbildung und den Verlust der Hautelastizität verantwortlich.

Während in der chronologisch gealterten Haut Kollagen- und Elastische Fasern reduziert werden, zeigt sich bei lichtgealterter Haut, dass die Kollagenbündel intensiv abgebaut werden, wobei sie die Bindung zur Epidermis verlieren. Auch werden die Elastischen Fasern gespalten und liegen gespalten in der Dermis vor (zusammengefasst in [79]).

Histopathologisch ist eine Verdickung der Epidermis festzustellen, die jedoch auch zum Schutz vor weiterer Schädigung durch UV-Strahlen der Haut dient [80]. Auch zeigen sich Veränderungen in den Strukturkomponenten der Dermis, die histologisch im Verlust von Kollagen und einer Verwirrung und Verknäulung der elastischen Fasern zu erkennen ist (Abb. 5). Die Vorstufe des Kollagens, das Prokollagen, wird von den dermalen Fibroblasten gebildet und verleiht der Haut ihre Festigkeit und Stabilität [81]. Chronische UVB-Bestrahlung führt zu einer Hochregulation von Matrix-Metalloproteinasen, die das Kollagen abbauen. Bei diesem Prozess spielt vor allem  $MMP1\alpha$ , auch Kollagenase genannt, eine wichtige Rolle, welche Typ I-Kollagen in den Geweben abbaut. Durch UV-Strahlung kommt es zu einer Aktivierung von  $MMP1\alpha$ , was im Abbau der Kollagenfasern resultiert [82][83]. Das klinische Symptom der UV-induzierten Faltenbildung wird durch die Zerstörung der elastischen Fasern bedingt. In unbestrahlten Arealen der Haut bilden die elastischen Fasern ein Netzwerk in der Dermis und verleihen ihr dadurch Zugfestigkeit. Durch chronische UVB-Bestrahlung wird dieses Netzwerk zerstört, indem die elastischen Fasern gespalten werden und sich verdicken. Die im normalen Zustand langen dünnen Fasern sind dann als kurze dickere Fragmente zu erkennen und können der Dermis keine Spannung mehr verleihen [80]. Eine strukturgebende Komponente ist die Hyaluronsäure (HA). Die Synthese der HA erfolgt durch 3 transmembranäre HA-Synthasen (HAS1-3), die N-Acetyl-

D-glucosamin und Glucuronsäure über glykosidische Verbindungen miteinander verbinden [53]. HAS1 und HAS2 produzieren hochmolekulare HA, wohingegen HAS3 für die Synthese von HAs mittleren Molekulargewichts verantwortlich ist. Auch können HAs TLRs aktivieren [84] und somit als DAMPs wirken. Es ist bekannt, dass nach mehrwöchiger Bestrahlung mit UVB die HA-Synthasen erhöht sind [85] [86]. Ein weiteres Charakteristikum der Lichtalterung ist die Mastozytose. Hierunter versteht man die vermehrte Ansammlung von Mastzellen. Es ist bekannt, dass die Anzahl der Mastzellen nach Exposition mit UV-Strahlung in der Dermis erhöht ist. Der Mechanismus ist jedoch noch unklar. Somit ist nicht bekannt, ob UV-Strahlung die Mastzellen zur Proliferation anregen oder sie in die betroffenen Hautareale rekrutiert werden [87][88][89].

Die Lichtalterung ist somit ein komplexer Prozess, der Veränderungen sowohl in der Epidermis als auch in der Dermis nach sich zieht und zu einer vorzeitigen Alterung der Haut führt.

#### **1.3.4 UVB-induzierte Photokarzinogenese**

Unter dem Begriff Photokarzinogenese versteht man die Bildung von Tumoren, die durch UV-Strahlung induziert werden. Dabei unterscheidet man zwischen schwarzen und weißen Hautkrebsformen. Unter dem schwarzen Hautkrebs versteht man maligne Melanome, die seltener vorkommen, aber stark metastasieren. Der weiße Hautkrebs, auch nicht-melanomer Hautkrebs kommt häufiger vor, ist aber meist nicht metastasierend. Die zwei wichtigsten nicht-metastasierenden Formen sind das Plattenepithel- und Basalzellkarzinom [90][91]. Diese gehen aus veränderten Zellen der Epidermis hervor und sind an Körperstellen lokalisiert, die der Exposition der UV-Strahlung ausgesetzt wurden. Die Mechanismen, die zu einer Ausbildung der nicht-melanomen Photokarzinogenese führen sind vielfältig. So führt einerseits eine Akkumulation von nicht reparierten DNS-Schäden [92], sowie andererseits eine Immunsuppression [93] zu deren Induktion. Im Mausmodell kann durch UVB-Exposition allein die Entwicklung von weißem Hautkrebs induziert werden, sodass in dieser Arbeit nachfolgend mit dem Begriff der Photokarzinogenese alleinig der weiße Hautkrebs gemeint ist. Für die Induktion von Melanomen im Mausmodell bedarf es im Gegensatz komplexe genetisch veränderte Modelle [94][95].

Es ist schon lange bekannt, dass UVB-induzierte DNS-Schäden ein hohes mutagenes Potenzial aufweisen, welches die Entstehung von Tumoren fördert [96]. UVB-Strahlung induziert hauptsächlich die Bildung von CPDs und (6-4)-Photoprodukten. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass diese beiden Formen der DNS-Schäden einen mutagenen und kanzerogenen Einfluss auf den Organismus aufweist. Anhand dieser Ergebnisse wird vermutet, dass diese DNS-Schäden auch primär für die Tumorentwicklung im Menschen verantwortlich ist [97][98][99]. Auch zeigen Xeroderma Pigmentosum-Patienten, die einen Defekt im DNS-Reparatursystems besitzen, eine erhöhte Formation von Hauttumoren in UV-exponierten Hautregionen. Dies ist

ein weiterer Beleg, dass nicht reparierte DNS-Schäden zu der Formation von Hauttumoren beiträgt, da die Nukleotidexzisionsreparatur in diesen Patienten nicht funktioniert und es in der Folge zu einer Akkumulation von DNS-Schäden führt [100][101].

Auch führt die Exposition von UV-Strahlung zu einer Suppression des Immunsystems. Diese UV-induzierte Immunsuppression hat den Nutzen den Körper vor einer chronischen Entzündungsreaktion zu schützen (zusammengefasst in [102]). Doch dieser Schutzmechanismus führt auch zu einer Unterdrückung der Aktivierung von T-Zellen im Haut-drainierenden Lymphknoten [103]. In Folge kommt es unter anderem zu einer verminderten Sekretion von T-Zell-abhängigen Zytokinen, die eine protektive Rolle bei der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen spielt [104]. Des Weiteren werden regulatorische T-Zellen durch UV-Strahlung aktiviert, die durch die Freisetzung des Zytokins IL-10 zur Ausbildung der Immunsuppression in Plattenepithelkarzinomen und Basalzellkarzinomen beitragen [104][105]. Eine weitere wichtige Rolle in der Induktion der UV-induzierten Immunsuppression spielen Mastzellen. Sie migrieren in die UV-exponierte Dermis, wo sie Mediatoren wie TNF und Histamin freisetzen, die auch zur Entwicklung der Immunsuppression beitragen [106].

In einer Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe [107] konnte gezeigt werden, dass MyD88 die Entstehung von CPDs beeinflusst und auch die DNS-Reparatur von MyD88 abhängt [107][108]. Auch wird die Induktion der Immunsuppression durch Zellen des angeborenen Immunsystems vermittelt. Aufgrund dessen ist es interessant die Rolle von MyD88 in der Entstehung der Photokarzinogenese zu untersuchen.

## 1.4 Fragestellung

UV-Strahlung gehört zu den Einflüssen der Umwelt, denen jeder Mensch ausgesetzt ist. Hierbei sind besonders die mittleren Wellenlängen der UVB-Strahlung gefährlich, da sie energiereicher als die UVA-Strahlen sind und somit verstärkt schädlicheres Potenzial besitzen auf den Körper negativ einzuwirken. Des Weiteren verändert UVB-Strahlung molekulare Strukturen der Haut, wie die Schädigung der DNS der Zellen und strukturgebende Komponente der Dermis.

Eine chronische Exposition gegenüber UVB-Strahlung führt zur vorzeitigen Alterung der Haut, auch Lichtalterung genannt. Intrinsische chronologische Alterung beeinträchtigt die Aktivität des Immunsystems, was zu einer erhöhten Anfälligkeit von Infektionen führt. Da das angeborene Immunsystem nicht nur Pathogene über PAMPs, sondern auch sterile Gefahrensignale (DAMPs), die durch eigene veränderte Strukturen hervorgerufen werden, erkennt, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob chronische UVB-Strahlung als DAMP das angeborene Immunsystem aktivieren kann. Des Weiteren soll analysiert werden, ob die UVB-induzierte Aktivierung des angeborenen Immunsystems die Entstehung der Lichtalterung in der Haut begünstigt. Da die chronische Exposition mit UV-Strahlung auch zu einer Suppression des Immunsystems führt, begünstigt dieses die Entstehung von Tumorformationen in der Haut. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die Entstehung der Photokarzinogenese untersucht.

Das Adaptermolekül MyD88 ist ein zentrales Protein, welches zur TLR-abhängigen Aktivierung des angeborenen Immunsystems benötigt wird. Da PAMPs und auch DAMPs von TLRs erkannt werden und die Aktivierung von MyD88 zur Folge haben, wurden aufgrund dessen mithilfe MyD88-defizienter Mäuse und anhand von Mäusen, die MyD88 exklusiv in nur einem bestimmten Zelltyp exprimieren, folgende Fragestellungen behandelt:

1. Welche Rolle spielt das angeborene Immunsystem im Mausmodell der Lichtalterung?
2. Welche Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems sind für die einzelnen Effekte der Lichtalterung verantwortlich?
3. Welche Rolle spielt das angeborene Immunsystem im Mausmodell der Photokarzinogenese?

So sollen neue Erkenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen dem angeborenen Immunsystem und der UVB-induzierten Lichtalterung gewonnen werden.

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Geräte

Tabelle 1. Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Absorptions-Mikroplatten-Lesegerät EL800	Biotek, Bad Friedrichshall
Durchflusszytometer Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop eclipse TS100	Nikon Instruments, Düsseldorf
Elektrophoresekammer Perfect Blue Gelsystem für PCR	PeqLab, Erlangen
Elektrophoresenetzteil PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad, München
Feinwaage	Satorius AG, Göttingen
Grobwaage 440-35N	Kern, Balingen, Frommern
Geldokumentationssystem DarkHood DH-40/50	Biostep, Jahnsdorf
Homogenisator Precelly's	Peqlab, Erlangen
Infrarot Imager Odyssey für WB	Li-Cor, USA
Inkubator C150	Binder, Tuttlingen
Kühl- und Gefriergeräte	Bosch, Stuttgart
Kryostat CM3050 S	Leica, Wetzlar
Mehrfachdispenser-Pipette	VWR, Langenfeld
Mehrkanalpipette	Abimed, Langenfeld
Mikroskop BZ-9000	Keyence, Essen
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	PeqLab, Erlangen
PCR-Maschine T1 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Pipetten	Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfe Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Rasierapparat ChroMini Moser	Wahl, Unterkirnach
Real-Time-Maschine CFX96	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank BDk-SK Klasse II	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen

Slot Blot SHM 48 well	Scie-Plas, Cambridge, Großbritannien
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tecan Infinite 200 Mikroplatten-Photometer	Tecan Group, Crailsheim
UV-B-Handlampe	Jakob Maul GmbH, Bad König
UV-Kasten (4 UV-Lampen von Philips Ultraviolet-B TL 20W/12RS)	Eigenbau
UV-Meter	Variocontrol, Waldmann, Villingen-Schwenningen
Vakuum-Pumpe Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Versadoc	Bio-Rad, Hercules, US
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifuge 5810R für Mikrottestplatten und 15/50 ml-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5415R für Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Zytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden Plastikverbrauchsmaterialien von den Firmen Sarstedt, Nümbrecht und Greiner Bio-One, Frickenhausen verwendet.

**Tabelle 2.** Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blottingmembran Amersham Hybond-N+ Nylonmembran für SWB	GE Healthcare, Solingen
Einbettmedium Tissue Freezing Medium	Leica Microsystems, Nussloch
Einbettform für Gewebegefrierschnitte	Sakura Finetek, USA
Einmal-Spritzen, Injekt®	Braun, Melsungen
ELISA Platte half area	Costar, Bodenheim
ELISA Platte MW96F Medisorp	Nunc, Dänemark
FACS-Röhrchen für Durchflusszytometrie	BD Bioscience, Heidelberg
Gel-Blotting Papier Whatman GB005 200 x 200 mm	GE Healthcare, Solingen
Glasperlen aus Kalk-Soda-Glas, Ø1,25-1,55 mm	Carl Roth, Karlsruhe
ImmEdge Stift	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Kanülen Microlance	BD Bioscience, Heidelberg

## 2.1 Material

---

Objektträger Superfrost Plus

Thermo Scientific, Braunschweig

Zellsieb Nylon 70  $\mu\text{m}$

BD Bioscience, Heidelberg

---

### 2.1.3 Zellkulturmedien

**Tabelle 3.** Zellkulturmedien

<b>Medium</b>	<b>Bestandteile</b>
Complete RPMI-Medium 1640	10% FCS 1% L-Glutamin 1% Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin(10000 U/ml) $\beta$ -mercaptoethanol
Keratinocytenmedium MCDB 153	2% FCS 25 mg BPE/500 ml Medium 1% Penicillin (10000 U/ml)/ Streptomycin(10000 U/ml) 0,5% $\beta$ -mercaptoethanol 1% L-Glutamin 5 mg/ml Insulin 1,4 $\mu\text{M}$ Hydrocortison 0,1 mM Ethanolamin 0,1 mM Phosphoethanolamin 10 ng/ml EGF (frisch zusetzen)

---

## 2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 4. Puffer und Lösungen

Beschreibung	gelöst in	Bestandteile
Blockierungspuffer (SWB)	TBS-T	5% Milchpulver
Blockierungspuffer (ELISA)	PBS	1% BSA
Blockierungspuffer (Histologie)	PBS	2,5% FCS 2,5% BSA 1% Mausserum 1% Rattenserum
GM-CSF-Überstand	RPMI-Medium	Überstand von transfizierten X63Ag8-653-Zellen[109]
Lyse-Puffer (Genotypisierung)	Aqua dest.	10mM Tris-HCl, pH 8,5 5mM EDTA, pH 8,0 0,2% SDS 200mM NaCl 0,1mg/ml Proteinase K, Zugabe kurz vor Verwendung
Mowiol-Lösung		2,4g Mowiol 6g Glycerol 6 ml Aqua dest. beim Rühren 12 ml 0,2 Tris, pH 8,5 10 Min. rühren bei 50°C Zentrifugieren 15 Min. bei 5000g 2,5% DABCO (zum Überstand)
Paraformaldehyd	PBS	4% PFA
PBS	Aqua dest.	13,7mM NaCl 2,7mM KCl 80,9mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
TBS-T	Aqua dest.	7,7mM Tris-HCl, pH 7,5 150mM NaCl 0,05% Tween20
TE-Puffer (Genotypisierung)	Aqua dest.	10mM Tris-HCl, pH 8,0 1mM EDTA
Wasch-Puffer (ELISA)	PBS	0,5% Tween20

## 2.1.5 Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Tabelle 5. Chemikalien, Enzyme und Reagenzien

Substanz	Hersteller
Absolute qPCR Sybr Green ROX Mix	Thermo Scientific, Braunschweig
Aceton	VWR, Darmstadt
Acrylamide (30%)	Sigma-Aldrich, München
Agarose	PeqLab, Darmstadt
Albumin bovine fraction (BSA)	Serva, Heidelberg
Ammonium persulfate (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampuwa (Reinstwasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
$\beta$ -mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Bovine Pituitary Extract (BPE)	Life Technologies, Darmstadt
Chlorwasserstoff (HCl)	Roth, Karlsruhe
Collagen A (1mg/ml)	Biochrom, Berlin
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan]	Roth, Karlsruhe
DAPI (4'-6-Diamidino-2-phenylindole)	Sigma-Aldrich, München
Detektionsreagenz Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Solingen
DNS-Leiter, 100bp	New England Biolabs, Frankfurt
dNTP	Thermo Scientific, Braunschweig
DTT	Promega, Fichtburg, USA
Epidermal Growth Factor (EGF, murin rekombinant)	Biochrom, Berlin
Einbettmedium	Leica, Nussloch
Eosin Y Lösung	Sigma-Aldrich, München
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Biochrom, Berlin
Euparal	Roth, Karlsruhe
Fetal Bovine Serum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Forene (Isofluran)	Abbvie, Ludwigshafen
Glycerol	Roth, Karlsruhe
Hematoxylin-Lösung, Gill No.3	Sigma-Aldrich, München
Hydrocortison	Biochrom, Berlin
IL-3 (murin, rekombinant)	PeptoTech, Hamburg
Insulin, rekombinant	Biochrom, Berlin
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin 200mM (100x)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe

Methylenblau	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Mausserum	Sigma-Aldrich, München
MCDB 153 Basalmedium	Biochrom, Berlin
Melanin	Sigma-Aldrich, München
Mowiol	Roth, Karlsruhe
MyTaq™ HS Red DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
MyTaq™ HS Red DNA Puffer	Bioline, Luckenwalde
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Oligo(dt)18 Primer	Thermo Scientific, Braunschweig
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Phosphate buffered saline (PBS)	Merck, Darmstadt
Phosphoethanolamin	Biochrom, Berlin
Proteinase K, rekombinant	Roche, Mannheim
Proteinase-Inhibitor (10x)	Roche, Mannheim
Proteinstandard Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, München
Rattenserum	Sigma-Aldrich, München
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Braunschweig
RevertAid Reverse Transkriptase	Thermo Scientific, Braunschweig
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific, Braunschweig
RIPA-Puffer (10x)	Cell Signaling, Frankfurt am Main
RPMI 1640	PAN Biotech, Aidenbacg
RT-Puffer (5x)	Thermo Scientific, Braunschweig
Saponin	Sigma-Aldrich
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 25%)	Roth, Karlsruhe
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma-Aldrich, München
Sybr Safe DNA gel stain	Life Technologies, Carlsbad, USA
TAE-Puffer (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
TMB Plus2	KEMENTEC Diagnostics, Taas-trup, Dänemark
Toluidinblau	VWR, Langenfeld
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe

## 2.1 Material

Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA 0,05%	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tween®20	Roth, Karlsruhe
Vectashield Hard Set Mounting Medium with DAPI	Biozol, Eching
Xylol	Roth, Karlsruhe

### 2.1.6 Primer

**Tabelle 6.** Primer für die Genotypisierung

Gen bzw. Allel	Primersequenzen	Bandengröße
MyD88LSL: WT	ACACTGTAGCTGCCTGCAGACACAC	305 bp (WT)
	GGACTCCTGGTTCTGCTGCTTACCT	500 bp (Shift bei MyD88LSL)
MyD88LSL: Stop	CTGAAGAGGAGTTTACGTCCAG CTAGCCTTGGCATATTAATCTTG	825 bp
LysMCre: WT	CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC TTACAGTCGGCCAGGCTGAC	350 bp
LysMCre: Cre	CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC CCCAGAAATGCCAGATTACG	700 bp
K5Cre	ATGCCAATGCCCCCTCAGTTCCT TGCCCTTTTTTATCCCTTCCAGA	300 bp
CCL17Cre	ACTCTCAGGACACCTGCTTCC CCCAGAAATGCCAGATTACG	500 bp
Mcpt5Cre	ACAGTGGTATTCCCGGGGAGTGT	300 bp (WT)
	GTCAGTGC GTTCAAAGGCCA	600 bp (Cre)
	TGAGAAGGGCTATGAGTCCCA	

**Tabelle 7.** Primer für die RT-PCR

Gen	Primersequenzen	Effizienz (%)
18S	GCAATTATTCCCATGAACG GGGACTTAATCAACGCAAGC	
BD3	TCAGATTGGCAGTTGTGGAG GCTAGGGAGCACTTGTTTGC	113,3
COMP	TGGGTTACACAGCCTTCAAC TGGTAGCCGAAGATGAAACC	113,5
CRAMP	TTCTTAGGCCTCGCTAAGACTG TTGATCCCGGTGAAAAAGTC	101,6

Filaggrin	AGACTGGGAGGCAAGCTACA CTGGATCTCCTCTGGTCAGC	140,8
HAS1	GTGCGAGTGTGGATGAAGA ATGCAGGACACACAGTGGAA	98,1
HAS2	ACCACAGCGAAGAAGAAGGA TCCCCCTGTTTTGCTATTTG	181,8
HAS3	CACATTTGTCATCCCAGCAC ACATTCACTCCAAGGCATCC	103,7
Involucrin	AAGCAACCAACTCCACATC CTCCTCATGTTTGGGAAAGC	124,1
K5	CATTCTCAGCCGTGGTACG CAGAGCTGAGGAACATGCAG	98,9
K6	AGTGCCCTGTGTACGGGGTCG AGAAGCGAGAGGACACAGCCTC	113,4
K10	TGTGGTGAGTTCCTTGCTCTT GAACAACCTTGCAGAAAAGAATCG	133,0
K14	TCGATCTGCAGGAGGACATT ATCGAGGACCTGAAGAGCAA	112,6
Loricrin	GGTTGCAACGGAGACAACA CATGAGAAAGTTAAGCCCATCG	101,9
MMP1a	ACTGGTGATTTTGCCCAGAG TCTCCGTTGTGAAACACAGG	100,0
XPA	ACGAGATTGGAAACATTGTTCA CGC ATT CTT CAC AGA TGG TG	133,2

### 2.1.7 Antikörper

**Tabelle 8.** Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
I-A/I-E (MHCII)	PeCy7	M5/114.15.2	1:500	BioLegend, Fell
Langerin	APC	4C7	1:200	BioLegend, Fell
CD3 $\epsilon$	Pe	145-2C11	1:200	BioLegend, Fell
$\gamma\delta$ TCR	APC	GL3	1:200	BioLegend, Fell
CD11c	Pe	N418	1:200	ebioscience, Frankfurt am Main
CD4	APC-Cy7	RM4-5	1:200	BioLegend, Fell

## 2.1 Material

CD8		PeCy7	53-6.7	1:200	BioLegend, Fell
B220		APC-Cy7	RA3-6B2	1:200	BioLegend, Fell
TruStain (CD16/32)	fcX™	purified	93	1:100	BioLegend, Fell

**Tabelle 9.** Antikörper für die Histologie

Antikörper	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD11b	APC	M1/70	1:200	BioLegend, Fell
I-A/I-E (MHCII)	APC	M5/114.15.2	1:200	BioLegend, Fell
I-A/I-E (MHCII)	FITC	2G9	1:200	BD Biosciences, Heidelberg
K15 (mouse)	purified	LHK15	1:200	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
K6	purified	polyklonal	1:200	Covance, Dedham, USA
K1 (rabbit)	purified	polyklonal	1:500	Covance, Emeryville, USA
Loricrin (rabbit)	purified	polyklonal	1:500	BioLegend, Fell
CD3ε	APC	145-2C11	1:200	BioLegend, Fell

**Tabelle 10.** Antikörper für South-Western Blot

Antikörper	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
α-Thymine Dimer- HRP	purified	KTM53	1:2500	Kamiya Biomedical Company, Seattle, US
Amersham ECL Mouse IgG, HRP- linked	purified		1:5000	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK

**Tabelle 11.** Zweitantikörper

Antikörper	Konjugat	Klon	Verdünnung	Hersteller
α-mouse IgG (Ziege)	Alexa488	polyklonal	1:1000	Life Technologies, Carlsbad, USA
α-rabbit IgG (Ziege)	Alexa488	polyklonal	1:500	Life Technologies, Carlsbad, USA

### 2.1.8 Verwendete Kits

**Tabelle 12.** Verwendete Kits

<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Apoptosedetektionskit In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche, Mannheim
DNeasy Blood and Tissue Kit	QIAGEN, Hilden
DuoSet <sup>®</sup> ELISA Development Kit (CCL22, IL-1 $\alpha$ , IL-13, KC, TNF)	RandD Systems, Wiesbaden
Elastika van Gieson-Färbe-Kit	Merck, Darmstadt
JB-4 <sup>®</sup> Embedding Kit	Polysciences, Warrington, USA
Masson-Goldner Trichrom-Färbekit	Merck, Darmstadt
RNeasy Plus Universal Mini Kit	QIAGEN, Hilden
ELISA MAX <sup>™</sup> Standard Set Mouse IgE	BioLegend, Fell

### 2.1.9 Programmsoftware

**Tabelle 13.** Programmsoftware

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Argus X1	Biostep GmbH, Jahnsdorf
BD FACSDiva <sup>™</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
Bio-Rad CFX Manager	Bio-Rad, München
BZ-II Analyzer	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
BZ-II Viewer	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Citavi 5.2	Citavi Swiss Academic Software GmbH, Wädenswill, Schweiz
FlowJo Version 10	FlowJo LLC Data Analysis Software, Ashland, USA
Gen5	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Graphpad Prism Version 6.04	GraphPad Software, California, USA
ImageJ	ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
NanoDrop 1000 V3.8.1	Thermo Fischer Scientific, Wilmington, USA

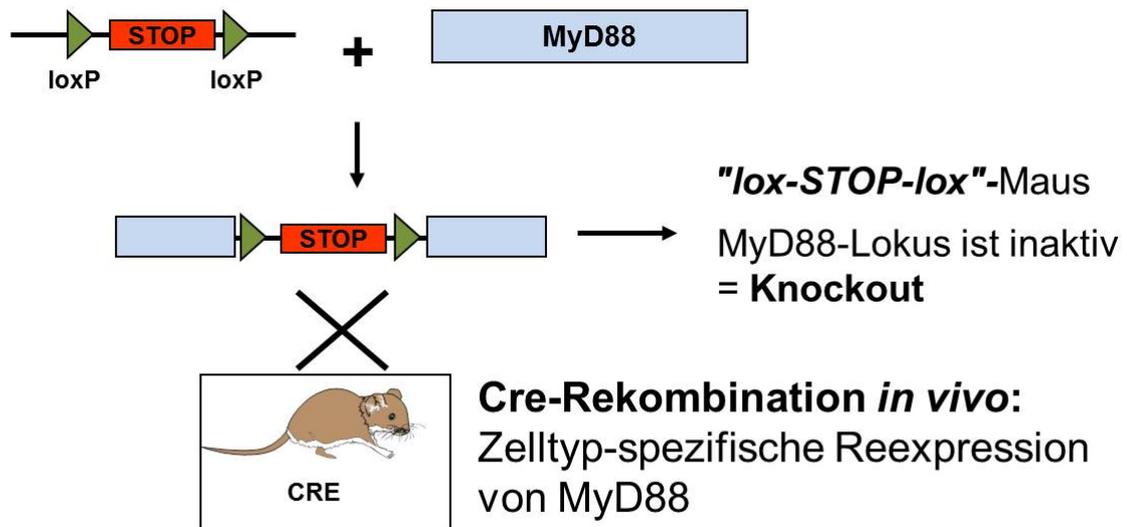
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierhaltung

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien wurden unter spezifisch-Pathogen-freien (SPF) Bedingungen in der institutseigenen Tierhaltung des Life and Medical Sciences (LIMES) Institut in Bonn gehalten. Um Wurfgeschwister nach Mendel'scher Vererbungslehre mit dem für den Versuch notwendigen Genotypen zu erhalten, wurden heterozygote Elterntiere verpaart. Es wurden Wurfgeschwister verwendet, da diese eine ähnliche mikrobielle Flora besitzen. Jedes einzelne Tier wurde beim Absetzen mit einer Ohrmarkierung registriert und eine Schwanzspitzenbiopsie genommen. Aus dieser wurde die genomische DNS isoliert und der Genotyp mittels PCR bestimmt. Für die *in vivo* Bestrahlungsversuche wurden ausschließlich sechs bis zehn Wochen alte Weibchen verwendet. Alle Experimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen genehmigt und unter Einhaltung der deutschen Tierschutzgesetze durchgeführt.

### 2.2.2 Genetik der Versuchstiere

Um die Rolle des Adaptermoleküls MyD88, welches ein zentrales Molekül des angeborenen Immunsystems darstellt, zu untersuchen, wurden MyD88-defiziente Mäuse verwendet [110]. Diese Mauslinie (MyD88LSL) wurde so generiert, dass eine loxP-flankierte Stop-Kassette in das erste Intron des MyD88-Gens eingefügt wurde, die durch einen Transkriptionsstop die Bildung der MyD88-RNS verhindert und so in Folge auch kein Protein gebildet werden kann. Diese Mauslinie ermöglicht eine Zelltyp-spezifische Reexpression von MyD88 nach Verpaarung mit einer Cre-exprimierenden Maus. Die MyD88-defizienten Mäuse, die auf beiden Allelen die Stop-Kassette tragen, besitzen den gleichen Phänotyp wie konventionelle knock-out Mäuse. Als Kontrolltiere wurden heterozygote Wurfgeschwister verwendet, die auf dem einen Allel die Stop-Kassette und auf dem anderen Allel das WT-Allel trugen. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass diese heterozygoten Mäuse denselben Phänotyp wie Wildtyp-Mäuse aufwiesen. Um weiter im Detail die Rolle von MyD88 ausschließlich in einzelnen Zelltypen untersuchen zu können, wurden die MyD88LSL-Mäuse mit verschiedenen Cre-Linien verkreuzt, wobei die Cre-Rekombinase von Zelltyp-spezifischen Promotoren reguliert wird (Abb. 6). Durch die Cre-Rekombinase wird die loxP-flankierte Stop-Kassette aus dem Intron herausgeschnitten. Daraus resultiert, dass das MyD88-Gen wieder transkribiert werden kann und man erhält Nachkommen, die MyD88 nur in einzelnen bestimmten Zelltypen exprimieren, während der Rest des Organismus defizient für MyD88 ist. In dieser Arbeit wurden folgende Cre-Linien mit der MyD88LSL-Linie verkreuzt: Zur Expression von MyD88 in basalen Keratinozyten durch die Verkreuzung mit K5Cre-[111], in myeloiden Zellen durch LysMCre-[112], in Dendritischen Zellen durch CCL17Cre-[113] und in Mastzellen durch Mcpt5Cre-[114] Mäusen, während der Rest des Körpers jeweils defizient für MyD88 war.



**Abbildung 6. Genetisches Mausmodell**

Generierung von Mauslinien, die MyD88 exklusiv in einzelnen Zelltypen, wie bspw. Keratinozyten, exprimieren, während die restlichen Zellen des Organismus defizient für MyD88 sind

### 2.2.3 Genotypisierung der Versuchstiere

Um die Genotypen der einzelnen Mäuse zu bestimmen, wurde aus Schwanzspitzenbiopsien die genomische DNS isoliert und anschließend eine PCR durchgeführt, die mittels eines Agarosegels ausgewertet wurde. Hierfür wurden die Schwanzspitzenbiopsien mit 500 µl Lyse-Puffer und Proteinase K bei 56 °C unter Schütteln inkubiert, bis das Gewebe lysiert war. Nachfolgend wurde die DNS gefällt. Hierfür wurde das Lysat bei 13000 rpm für 10 Min. zentrifugiert. Der DNS-haltige Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Durch kräftiges Schütteln wurde die DNS gefällt und durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 Min. sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die ausgefallene DNS mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 13000 rpm für 5 Min. wurde die DNS vollständig getrocknet und in TE-Puffer 1 Std. bei 56 °C oder über Nacht bei 4 °C gelöst. Die gelöste DNS konnte über mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt werden. Die so gewonnene genomische DNA wurde in die für die Mauslinie spezifische Genotypisierungs-PCR eingesetzt. Hierfür wurde ein Reaktionsansatz wie in Tab. 14 ersichtlich angesetzt. Bestand die Genotypisierungs-PCR aus drei Primern (Mcpt5Cre), so wurde das Volumen des dritten Primers vom Reinstwasser abgezogen. Die für jede Mauslinie notwendigen Primer und ihre Primersequenzen sind in Tab. 6 dargestellt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Hierbei wurde die DNS mit dem DNS-Farbstoff SybrSafe sichtbar gemacht. Durch eine daneben aufgetragenen 100 bp-DNS-Leiter wurde die PCR ausgewertet.

**Tabelle 14.** Reaktionsansatz für Genotypisierungs-PCR á 20µl

Volumen in µl	Reagenz
4,0	MyTaq Red-Puffer
0,7	Vorwärts-Primer
0,7	Rückwärts-Primer
0,05	MyTaq Polymerase
13,55	Reinstwasser
1,0	genomische DNS

### 2.2.4 Isolierung und Kultivierung primärer Keratinozyten

Primäre Keratinozyten wurden *ex vivo* aus der Haut von Ohren und Schwanz der Mäuse gewonnen. Hierfür wurden die Ohren und der Schwanz abpräpariert, mit 70% EtOH desinfiziert und bis zur weiteren Verwendung in PBS auf Eis aufbewahrt. Die Ohren wurden mit Pinzetten in dorsale und ventrale Seiten getrennt, sowie die Schwanzhaut mit einem Skalpell der Länge nach aufgeschnitten, um sie von Knochen, Knorpel und Gewebe zu befreien. Anschließend wurden die Hautstücke mit der Dermis nach unten gerichtet für 90 Min. in 0,05 % Trypsin-EDTA im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Hierbei wurde der Verbund von Epidermis und Dermis entlang der Basallamina aufgetrennt, um anschließend die Epidermis von der Dermis isolieren zu können. Die Epidermis wurde mit Hilfe eines Stempels einer Spritze durch ein 70 µm Nylonzellsieb in Keratinozytenmedium gedrückt, um die Zellen der Epidermis zu vereinzeln. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm und 4 °C für 7 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Keratinozytenmedium mit EGF aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels der Trypanblau-Vital-Färbung bestimmt und in einer Dichte von 0,25\*10<sup>6</sup> Zellen / 250 µl in kollagenisierte (20 Min. KollagenA im Inkubator, danach einmal mit PBS spülen) 96-well-Flachbodenplatten ausgesät und im Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. An Tag 7 wurde der Überstand abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.5 Isolierung und Kultivierung primärer embryonaler Fibroblasten

Primäre embryonale Fibroblasten wurden aus Mäusen an Tag 14 der Embryonalentwicklung gewonnen. Hierfür wurden der Kopf und die fetale Leber entfernt und das verbleibende Bindegewebe durch ein 70 µm Nylonzellsieb in RPMI-Medium vereinzelt. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 1200 rpm und 4 °C für 7 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Vital-Färbung bestimmt und in einer Dichte von 1x10<sup>6</sup>/ml auf Petrischalen ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Waren die Zellen konfluent wurden sie zweimal im Verhältnis 1:3 gesplittet, indem sie mit 0,05% Trypsin-EDTA in PBS von der Petrischale gelöst wurden. Nachdem sie erneut konfluent waren, wurden sie durch erneute

Trypsinierung geerntet und für *in vitro* Versuche eingesetzt oder zur Aufbewahrung in 10% DMSO/RPMI eingefroren.

### 2.2.6 Trypanblau-Vital-Färbung

Mit Hilfe der Trypanblau-Vital-Färbung wurden die Zellzahlen der Zellkulturen bestimmt. Es wurde eine 1:10 Verdünnung der Zellen in Trypanblau, die in einem definierten Volumen aufgenommen wurden, hergestellt, gemischt und davon 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Durch Kapillarkräfte wird die Zelllösung unter das Deckglas gesogen. Hierbei färben sich tote Zellen blau, wohingegen lebende Zellen weiß erscheinen. Das Prinzip der Neubauer-Zählkammer besteht darin, dass durch einen definierten Abstand von 0,1 mm zwischen Deckglas und Zählkammer sich ein Flüssigkeitsvolumen von  $10^4$  ergibt. Unter dem Mikroskop wurden die lebenden Zellen aus zwei diagonal gegenüberliegenden Großquadraten, die aus je 16 Kleinquadraten bestehen, gezählt und der Mittelwert der zwei Großquadrate gebildet. Der Mittelwert wurde mit dem Flüssigkeitsvolumen der Zählkammer ( $10^4$ ) und dem Verdünnungsfaktor (10) multipliziert. Das Ergebnis ergibt die Zellzahl pro ml. Um die Gesamtzellzahl zu berechnen, wurde die Zellzahl pro ml mit dem Ausgangsvolumen multipliziert.

### 2.2.7 *in vitro* Bestrahlung primärer Keratinozyten

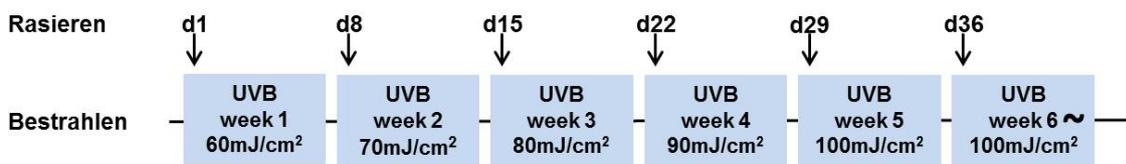
Keratinozyten wurden wie unter 2.2.6 beschrieben, aus der Epidermis von naiven MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen isoliert und für die UVB-Bestrahlung auf kollagenisierten 24-well-Flachbodenplatten in einer Dichte  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in 1 ml ausgesät. Anschließend wurden die Keratinozyten wie oben beschrieben kultiviert und an Tag 7 mit  $100 \text{ mJ/cm}^2$  UVB in PBS bestrahlt. Anschließend wurde das PBS gegen Keratinozytenmedium gewechselt und einen Tag später die DNS der Zellen mithilfe des QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit isoliert.

### 2.2.8 *in vitro* Bestrahlung primärer embryonaler Fibroblasten

Die wie oben beschriebenen primären embryonalen Fibroblasten wurden mittels 0,05% Trypsin-EDTA von der Petrischale gelöst, das Trypsin wurde mit RPMI-Medium abgestoppt und die Zellsuspension bei 1200 rpm und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 7 Min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS aufgenommen und mittels Trypanblau-Vital-Färbung die Zellzahl bestimmt. Für die UVB-Bestrahlung wurden  $0,5 \cdot 10^6$  Zellen pro well einer 24-well-Platte ausgesät und mit  $100 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt. Anschließend wurde das PBS durch RPMI-Medium ausgetauscht und einen Tag später die DNS der Zellen mithilfe des QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit isoliert.

### 2.2.9 Chronische UVB-Bestrahlung (Lichtalterung)

Über einen Gesamtzeitraum von 6 Wochen wurden Mäuse mit einer niedrigen und über die Wochen ansteigenden Dosis an UVB-Licht bestrahlt, um Symptome der Lichtalterung zu induzieren. Die Bestrahlung erfolgte an 5 Tagen pro Woche, wobei die Mäuse jeweils am ersten Tag am Rücken rasiert wurden. In der ersten Woche wurde mit einer Dosis von  $60 \text{ mJ/cm}^2$  begonnen, die pro Woche um  $10 \text{ mJ/cm}^2$  gesteigert wurde. In Woche 5 und 6 wurden die Mäuse mit der höchsten Dosis von  $100 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlt. Mäuse, die als Kontrolle dienten, wurden am ersten Tag jeder Woche am Rücken rasiert (Abb. 7).



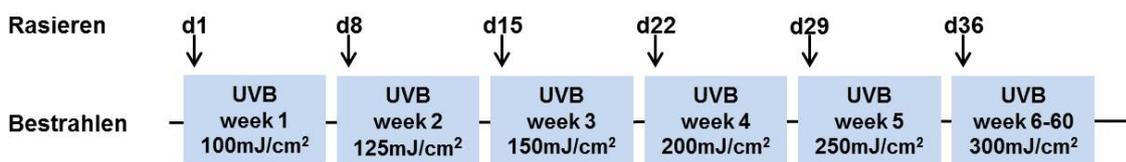
**Abbildung 7. Modell zur sechswöchigen chronischen UVB-Bestrahlung**

Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von sechs Wochen fünfmal pro Woche mit UVB-Strahlen bestrahlt. Hierbei wurde in Woche eins mit einer geringen Dosis begonnen, um keine Entzündungsreaktionen zu induzieren. Pro Woche wurde die Dosis um  $10 \text{ mJ/cm}^2$  gesteigert.

An Tag 39 wurden die Mäuse schmerzfrei mit  $\text{CO}_2$  getötet und die benötigten Proben entnommen. Es wurden ausschließlich Wurfgeschwisterweibchen verwendet. Diese hatten bei Versuchsbeginn ein Alter von 6-10 Wochen. Wurden Tiere aus verschiedenen Würfen verwendet, so wurden diese gleichmäßig auf die Kontroll- und Versuchsgruppen verteilt.

### 2.2.10 Modell für UVB-induzierte Photokarzinogenese

Hierfür wurden die Mäuse über einen Gesamtzeitraum von 55 Wochen dreimal wöchentlich mit UVB-Licht bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis begann niedrig. Von Woche zu Woche wurde die UVB-Dosis wie folgt gesteigert, um die Tiere langsam an die UVB-Bestrahlung zu gewöhnen und eine klinische Entzündungsreaktion zu vermeiden:  $100 \text{ mJ/cm}^2$  in Woche 1,  $125 \text{ mJ/cm}^2$  in Woche 2,  $150 \text{ mJ/cm}^2$  in Woche 3,  $200 \text{ mJ/cm}^2$  in Woche 4,  $250 \text{ mJ/cm}^2$  in Woche 5,  $300 \text{ mJ/cm}^2$  ab Woche 6.



**Abbildung 8. Modell zur Photokarzinogenese**

Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von 55 Wochen dreimal pro Woche mit UVB-Strahlen bestrahlt. Um keine Entzündungsreaktion zu induzieren wurde mit einer geringen Dosis gestartet, die über die ersten sechs Wochen langsam auf die endgültige Dosis gesteigert wurde

Zu Versuchsbeginn und wenn es nötig war, wurden die Mäuse am Rücken rasiert. Einmal in der Woche wurde die Anzahl und Größe der Tumore dokumentiert. Am Ende der 55 Wochen wurden die Mäuse schmerzfrei getötet und die benötigten Proben entnommen. Es wurden ausschließlich Wurfgeschwisterweibchen verwendet. Diese hatten bei Versuchsbeginn ein Alter von 6-10 Wochen. Wurden Tiere aus verschiedenen Würfen verwendet, so wurden diese gleichmäßig auf die Kontroll- und Versuchsgruppen verteilt.

### **2.2.11 Präparation der Rückenhaut**

Ein ausreichend großes Areal der Rückenhaut wurde freipräpariert und vom Unterhautfettgewebe entfernt. Ein Teil wurde für die Gewebeschnitte mit anschließender histologischer Färbung auf PBS gelagert und anschließend in Einbettmedium senkrecht stehend auf Trockeneis eingebettet. Der andere Teil der Rückenhaut wurde in gleichmäßige Stücke aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.2.12 Isolierung genomischer DNS aus der Rückenhaut**

Um mittels South-Western blot die relative Menge an UVB-induzierten DNS-Schäden zu ermitteln, wurde die genomische DNS aus der Rückenhaut der Versuchstiere isoliert. Hierfür wurde ein Stück Rückenhaut, welches bei -80 °C gelagert wurde, aufgetaut und Reste des Unterhautfettgewebes entfernt. Die Haut wurde in kleine Stücke geschnitten und die DNS anhand des Standardprotokolls des DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen isoliert. Mit Hilfe des Nanodrop-Photometers wurde die DNS-Konzentration bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.2.13 South-Western-Blot**

Mittels einer Slot-Blot-Apparatur konnte genomische DNS auf eine Membran transferiert werden, um anschließend mit Hilfe eines Antikörpers UVB-induzierte DNS-Schäden (CPDs) sichtbar zu machen. Hierfür wurden im ersten Schritt je 1 µg DNS pro Probe in 100 µl TE-Puffer verdünnt und für 5 Min. bei 100 °C erhitzt, um die DNS zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben für 2 Min. auf Eis inkubiert und 50 µl pro Probe mit Hilfe einer Slot Blot-Apparatur unter Erzeugung eines Vakuums auf eine durch Wasser aktivierte positiv geladene Nylonmembran transferiert. Im Anschluss wurde die Membran für 1 Std. auf ein mit 0,4 M NaOH getränktes Whatman Papier gelegt, um eine weitere Denaturierung und Trennung der komplementären DNS-Stränge sicherzustellen. Nachfolgend wurden die unspezifischen Bindungen für 1 Std. mit Blockierungspuffer blockiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem 1:2500 verdünnten Anti-Thymindimer Antikörper (Primärantikörper) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem 1:5000 verdünnten an eine Peroxidase gekoppelten IgG Sekundärantikörper für 2 Std. inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran erneut gewaschen und mit einem ECL-Detektionsreagenz versetzt

und nach Belichtung (Biorad Imager) aufgenommen. Um eine relative Quantifizierung der Menge der DNS-Schäden zu berechnen, musste ein DNS-Abgleich erfolgen. Hierfür wurden die zuvor benutzten Antikörper durch Inkubation in Stripping Puffer von der Membran gelöst. Die DNS wurde mit 0,02 % Methylblau für 5 Min. angefärbt. Anschließend wurde die Membran gewaschen und erneut am Biorad Imager belichtet. Nachfolgend wurden die Dichtewerte der Banden mit Hilfe der Programmsoftware ImageJ bestimmt und die relative Menge der DNS-Schäden mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Menge der CPDs pro Probe} = \text{Dichtewert(CPD)} / \text{Dichtewert(DNS)}$$

### 2.2.14 RNS-Isolierung aus der Rückenhaut

Um mittels Real Time PCR quantitativ die Expression bestimmter Gene zu untersuchen, musste die RNS aus der Rückenhaut der Versuchstiere isoliert werden. Hierfür wurde ein Stück Rückenhaut, welches bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert wurde, aufgetaut und Reste des Unterhautfettgewebes entfernt. Die Haut wurde in kleine Stücke geschnitten und in ein mit Glasperlen befülltes Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die RNS anhand des Standardprotokolls des RNeasy Plus Universal Mini Kit von Qiagen isoliert. Mit Hilfe des Nanodrop-Photometer wurde die RNS-Konzentration bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.2.15 Real-Time PCR

Mit Hilfe der Methode der Real-Time PCR wird quantitativ die Expression bestimmter Gene untersucht, wobei die Vervielfältigung der Nukleinsäuren und deren Detektion in einem Schritt kombiniert wird. Einer der gängigsten Verfahren ist der Nachweis bestimmter DNS-Sequenzen mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie in diesem Fall SYBR Green, der ein asymmetrischer Cyanin-Farbstoff ist, doppelsträngige DNS bindet und grünes Licht bei 521 nm emittiert. Am Ende der Elongation eines jeden Zyklus wird die Fluoreszenzintensität gemessen, welche sich proportional zur Menge der doppelsträngigen DNS verhält. Dies gibt dann Aufschluss über die Quantität des amplifizierten DNS-Fragments. Im ersten Schritt wurde die isolierte RNS aus der Rückenhaut in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben. Hierfür wurde von jeder Probe 1  $\mu\text{g}$  RNS mit RNase-freiem Wasser auf 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und mit 3  $\mu\text{l}$  Oligo (dT)<sub>18</sub> Primer versetzt. Dieser Ansatz wurde für 10 Min. bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz folgende Komponenten hinzu gegeben:

9,4  $\mu\text{l}$  RNase freies Wasser

8  $\mu\text{l}$  5xRT-Puffer

4  $\mu\text{l}$  DTT (100 mM)

4  $\mu\text{l}$  dNTP (10 mM)

0,8  $\mu\text{l}$  RNase Inhibitor

0,8  $\mu\text{l}$  Reverse Transkriptase

und die Umschreibung für 60 Min. bei 42 °C veranlasst. Um sicherzustellen, ob die umgeschriebene cDNS in allen Proben zu gleichen Teilen umgeschrieben war, wurde zunächst das *Housekeeping*-Gen RPS6 in allen Proben mittels PCR bestimmt. Anschließend wurde getestet, ob die entworfenen Primersequenzen der zu untersuchenden Gene für diese Art von RNS geeignet waren. Für alle Primerpaare wurde zunächst die Effizienz der Amplifikation des Genabschnitts durch serielle Verdünnung eines Gemisches aller cDNS-Proben bestimmt. Dieses Gemisch an cDNS wurde in folgenden Konzentrationen in die RT-PCR eingesetzt: pur, 1:8, 1:64, 1:512 und 1:4096. Hierfür wurden 2 Mastermixe angesetzt:

Mastermix1 (Primer):

7,5 µl SYBR Green

0,3 µl Vorwärts-Primer (10 µM)

0,3 µl Rückwärts-Primer (10 µM)

Mastermix2 (cDNA):

5 µl cDNA

1,9 µl RNase freies Wasser

Anschließend wurden die beiden Mastermixe wie folgt zusammen pipettiert: 8,1 µl Mastermix1 + 6,9 µl Mastermix2 Das Programm der RT-PCR wurde wie folgt benutzt:

Aktivierung der Polymerase: 95 °C 15 Min.

Amplifikation: 95 °C 20 Sek.

60 °C 40 Sek. (40 Zyklen)

Schmelzkurvenanalyse: Temperaturerhöhung von 65 °C auf 95 °C um 0,5 °C alle 5 Sek.

Anschließend wurde der lineare Anstieg (Effizienz) mittels der Bio-Rad Software ermittelt und für spätere Auswertungen herangezogen (Tab. 7). Nachdem die Effizienz der Primerpaare bestimmt worden war, wurden die Primer mit den einzelnen cDNS-Proben verwendet, wie oben beschrieben. Hierfür wurde die cDNS in einer Verdünnung von 1:5 eingesetzt. Abschließend wurde die relative Quantifizierung und die x-fache Induktion der Gene nach der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode bestimmt. Dabei wurde der Effizienzkoeffizient ( $y$ ), abhängig von der Effizienz der Primerpaare eingesetzt. Zur Normalisierung wurde das Referenzgen 18S verwendet:

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\text{Referenzgen})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Behandlung}) - \Delta Ct (\text{Kontrolle})$$

$$x\text{-fache Induktion} = y^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 2.2.16 Herstellung von Proteinlysaten aus der Haut

Um mit Hilfe von ELISA oder WB Proteine in der Haut nachzuweisen, wurden Proteinlysate aus der Rückenhaut der Versuchstiere hergestellt. Hierfür wurde ein Stück Rückenhaut, welches bei -80 °C gelagert wurde, aufgetaut und Reste des Unterhautfettgewebes entfernt. Die Haut wurde in kleine Stücke geschnitten und in ein mit Glasperlen befülltes Reaktionsgefäß über-

führt. Pro Reaktionsgefäß wurden 500 µl RIPA-Puffer mit Proteinase-Inhibitor zugesetzt und im Homogenisator 2x bei 6500 rpm 2x30 Sek. mit 20 Sek. Pause homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenisat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Reaktionsgefäß mit den Glasperlen mit 500 µl RIPA-Puffer mit Proteinase-Inhibitor nachgespült. Die nicht gelösten Bestandteile wurden bei 13000 rpm für 15 Min. bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand, der die Proteine enthält, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe des Nanodrop-Photometers wurden die Protein-Konzentration bei einer OD von 260 bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

### 2.2.17 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Um die in den Überstand von kultivierten Zellen freigesetzten oder im Serum vorhandenen Zytokine und Chemokine quantitativ nachzuweisen, wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Das Prinzip des Sandwich-ELISAs beruht darauf, dass das nachzuweisende Antigen zwischen zwei Antikörpern, die spezifisch für dieses Antigen sind, gebunden wird. Damit die beiden spezifischen Antikörper sich nicht gegenseitig blockieren, erkennen sie andere Epitope des Antigens. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Standardprotokolle der Hersteller (Tab. 12). Die Probenverdünnungen wurden mit PBS angesetzt. Verwendet wurden half area ELISA-Flachboden-Mikrotiterplatten der Firma Costar bzw. für den Gesamt-IgE ELISA Medisorp-Platten der Firma Nunc. Im ersten Schritt wurde eine 96-well-ELISA-Flachboden-Mikrotiterplatte mit dem Erstantikörper (Fängerantikörper) beschichtet. Die Platte wurde mit einer speziellen Folie verschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte gewaschen, indem die Vertiefungen der Platte 3x mit ELISA-Waschpuffer befüllt wurden und anschließend die Platte auf einem Tuch ausgeklopft, um Pufferreste zu entfernen. Im nächsten Schritt wurden unspezifische Bindungsstellen für 1 Std. mit Blockierungspuffer blockiert. In dieser Zeit wurden, wenn nötig, die Proben verdünnt, um eine für die Messung geeignete Probenkonzentration zu erhalten. Um die absolute Menge der produzierten Zytokine oder Chemokine später auswerten zu können wurde eine 7-stufige Standardreihe aus rekombinanten Protein hergestellt, innerhalb dieser die Messwerte der Proben liegen sollten. Nach der einstündigen Inkubationszeit wurde die Platte, wie oben beschrieben, gewaschen. Anschließend wurden auf die blockierte Platte die vorbereiteten Proben, die Standardreihe in Duplikaten, sowie eine Negativkontrolle aufgetragen und für 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte erneut gewaschen und für weitere 2 Std. bei RT mit biotinyliertem Zweitantikörper (Detektionsantikörper) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Platte für 20 Min. bei RT mit dem Streptavidin-Konjugat inkubiert. Streptavidin hat eine hohe Affinität zu Biotin und ist an die Meerrettich-Peroxidase (horse radish peroxidase, HRP) gebunden. Eine Signalverstärkung wird dadurch erreicht, dass mehrere Biotin-Moleküle an das Streptavidin binden können. Anschließend wurde die Platte gewaschen. Im letzten

Schritt wurde zur Farbentwicklung das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB) auf die Platte gegeben und im Dunkeln bei RT inkubiert, bis die ersten fünf Verdünnungsstufen der Standardreihe gut sichtbar blau gefärbt waren. Das Substrat TMB wird durch das Enzym HRP in einen blauen Farbstoff oxidiert. Die Reaktion wurde mit 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt, welches durch die Verringerung des pH-Wertes zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führte. Die Farbintensität der einzelnen Plattenvertiefungen wurden mit einem Absorptions-Mikroplatten-Leser bei einer Wellenlänge von 450 nm und mit einer Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Mit einer speziellen Software wurde aus den Standardreihen eine Standardkurve erstellt, anhand derer die Konzentration des nachgewiesenen Proteins berechnet wurde.

### **2.2.18 Anfertigung von Gefrierschnitten am Kryostaten**

Um histologische Übersichts- und Immunfluoreszenzfärbungen durchzuführen, wurden von der Rückenhaut Gefrierschnitte am Kryostaten hergestellt. Hierzu wurden von senkrecht eingebetteten Hautstücken bei -20 °C mit Hilfe des Kryostaten Querschnitte mit einer Dicke von 10 µm angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger überführt, trocknen gelassen und mit eiskaltem Aceton für 10 Min. fixiert und entwässert. Die fertigen Schnitte wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### **2.2.19 Hämatoxylin/Eosin (H&E)-Färbung**

Mittels der HE-Färbung wurde die Gewebestruktur als Übersichtsfärbung dargestellt. Das Prinzip dieser Färbung beruht darauf, dass durch die Oxidation von Hämatoxylin zu Hämalansaure basophile Gewebestrukturen, wie Zellkerne, blau dargestellt werden und basische acidophile Strukturen, wie Zytoplasma und Kollagen, durch das Eosin rot angefärbt werden. Die eingefrorenen Objektträger wurden aufgetaut und mit PBS für 5 Min. rehydriert. Im ersten Schritt wurden sie 10 Min. in der nach Gill modifizierten Hämatoxylin-Lösung inkubiert und zweimal in Leitungswasser kurz gewaschen. Anschließend wurden die Präparate für 30 Sek. in 70 % EtOH mit 1 % HCl differenziert und für 10 Min. in Leitungswasser gebläut, wobei durch den hohen pH-Wert des Leitungswassers die bräunliche Farbe des Hämatoxylin in bläuliches Hämalan umschlägt. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 30 Sek. in 70 % EtOH gespült und anschließend für 30 Sek. in alkoholischem Eosin gefärbt. Hierauf folgte die Differenzierung und Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 %, 2x 99 %) für je 2 Min. Abschließend wurden die Objektträger für 5 Min. in Xylol geklärt und in Euparal eingedeckelt.

### **2.2.20 Toluidinfärbung**

Mittels der Toluidinfärbung wurden die Granula der Mastzellen histologisch sichtbar gemacht. Toluidinblau ist ein Farbstoff, der aufgrund seiner basischen Eigenschaften an saure Proteoglykane bindet, welche in den zytoplasmatischen Granula enthalten sind. Hierbei erscheinen

die Granula der Mastzellen violett (metachromatisch), währenddessen der Rest des Gewebes dunkelblau dargestellt wird (orthochromatisch). Die eingefrorenen Präparate wurden aufgetaut und 5 Min. in Leitungswasser rehydriert. Anschließend wurden die Mastzellgranula für 10 Min. in der 0,01 %igen wässrigen Toluidinblau-Lösung gefärbt. Abschließend wurde der überschüssige Farbstoff mit Leitungswasser entfernt, die Objektträger trocknen gelassen und in Euparal eingedeckelt.

### 2.2.21 Immunfluoreszenzfärbung

Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden durch Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen gezielt bestimmte Proteine nachgewiesen. Hierbei wurden an einen Fluoreszenzfarbstoff direkt-gekoppelte Antikörper oder Sekundärantikörper verwendet. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops konnten die an spezifische Proteine gebundenen Antikörper sichtbar gemacht werden. Hierfür wurden die eingefrorenen Objektträger aufgetaut und mit einem fetthaltigen ImmEdge Stift die Präparate umrandet. Anschließend wurden die Präparate für 5 Min. in PBS rehydriert und die unspezifischen Bindungsstellen für 1 Std. mit Blockierungspuffer blockiert. Im nächsten Schritt wurden die Präparate für 2 Std. mit der Antikörperlösung inkubiert und gewaschen. Wurden Primärantikörper verwendet, die nicht an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren, wurde noch ein zusätzlicher Inkubationsschritt für 2 Std. mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper durchgeführt und anschließend erneut gewaschen. Wurden die Präparate innerhalb der nächsten Tage mikroskopiert, wurden die Objektträger mit 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI)-haltigem Eindeckelmedium eingedeckelt. DAPI ist ein Marker für Zellkerne, da es in die DNS interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert. Sollten die Schnitte jedoch noch Wochen später unter dem Mikroskop betrachtet werden können, so wurde eine 2 minütige DAPI-Färbung mit anschließendem Waschschrift eingefügt und die Schnitte anschließend in Mowiol eingedeckelt. Die Aushärtung erfolgte in beiden Varianten über Nacht im Dunkeln bei RT.

### 2.2.22 TUNEL-Färbung

Um im Fluoreszenzmikroskop Zellen im Gewebe identifizieren zu können, die in Apoptose gegangen sind, wurde die TUNEL-Färbung angewendet. Das Prinzip dieser Färbung beruht darauf, dass das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Nukleotide an die freien Hydroxygruppen des DNS-Strangs versieht. Diese entstehen durch Endonukleasen, die während der Apoptose den DNS-Strang fragmentieren. Die Färbung wurde anhand des Standardprotokolls des Apoptosedetektionskits der Firma Roche durchgeführt.

### 2.2.23 Gewebeeinbettung mit dem Kunststoff JB-4

Um die Gewebestruktur und –veränderung der Dermis im Detail besser untersuchen zu können, wurde die Gewebeeinbettung mit JB-4 Plus<sup>®</sup> durchgeführt. JB-4 ist ein Kunststoff, der wasserlöslich ist und auch unter dem Namen 2-Hydroxyethyl-Methacrylat (HEMA) oder Glycol-Methacrylat (GMA) bekannt ist. Das Prinzip dieser Gewebeeinbettmethode beruht darauf, dass das fixierte Gewebe zuerst mit einer Infiltrationslösung, die aus dem Kunststoffmonomer JB-4 und dem Weichmacher-haltigem Aushärtungsbeschleuniger Benzoyl Peroxid besteht, inkubiert wurde, damit die Lösung in das gesamte Gewebe eindringt und sich verteilt. Als nächstes wird zum Einbetten des Gewebes zu der vorherigen Lösung ein spezieller Härter hinzugegeben. Im Gegensatz zu Paraffin ist der Vorteil dieser Kunststoffeinbettungsmethode, dass der flüssige Kunststoff besser in das Gewebe eindringt und somit zu einer besseren Erhaltung der Gewebemorphologie führt. Im ersten Schritt wurde das bei -80 °C eingefrorene Gewebe in 4 % PFA über Nacht auf einer Wippe bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde das fixierte Gewebe wie folgt entwässert: 2x in 70 %, 1x in je (80 %, 90 %, 96 %), 2x in 100 % EtOH für je 30 Min. Anschließend erfolgten 5 Inkubationsschritte in der Infiltrationslösung für je 30 Min., wobei die letzte Inkubation über Nacht erfolgte. Am nächsten Tag wurden die Gewebestücke in entsprechende Förmchen senkrecht stehend nach dem Standardprotokoll des JB-4 PlusR Embedding Kit der Firma Polysciences, Inc. eingebettet. Anschließend wurden Hautquerschnitte am Ultramikrotom mithilfe einer aus Glas gebrochenen Schneideklinge in einer Dicke von 2 µm angefertigt und auf Objektträger überführt.

### 2.2.24 Elastika van Gieson-Färbung

Um die Anordnung und Verteilung der elastischen Fasern und des Kollagens in der Dermis darzustellen, wurden die in JB-4 eingebetteten Gewebeschnitte mithilfe der Elastika van Gieson-Übersichtsfärbung angefärbt. Hierbei werden Zellkerne (schwarz-braun), elastische Fasern (schwarz), Kollagen (rot) und Muskulatur (gelb) in verschiedenen Farben dargestellt. Die Färbung erfolgte mit dem Färbe-Kit der Firma Merck, wobei das Standardprotokoll wie folgt an die in JB-4 eingebetteten Hautschnitte angepasst wurde: 10 Min. in Elastin nach Weigert, 1 Min. unter fließendem Leitungswasser, 5 Min. in Weigert´s Lösung A+B 1:1, 1 Min. unter fließendem Leitungswasser, 2 Min. in Pikrofuchsin-Lösung, 1 Min. in Leitungswasser. Anschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte auf der Heizplatte getrocknet und mit Gelatine eingedeckelt.

### 2.2.25 Masson-Goldner Trichrom-Färbung

Um die Struktur des Bindegewebes und seine einzelnen Bestandteile, die elastischen Fasern und das Kollagen, im Detail zu untersuchen, wurden die in JB-4 eingebetteten Gewebeschnitte

mithilfe der Masson-Goldner Trichrom-Färbung angefärbt. Hierbei werden Zellkerne (schwarzbraun), Zytoplasma und Muskulatur (ziegelrot) und Bindegewebe (grün) in verschiedenen Farben dargestellt. Die Färbung erfolgte mit dem Färbe-Kit der Firma Merck, wobei das Standardprotokoll wie folgt an die in JB-4 eingebetteten Hautschnitte angepasst wurde: kurzes Eintauchen in 96 % EtOH, kurzes Eintauchen in 80 % EtOH, kurzes Eintauchen in 70 % EtOH, kurzes Eintauchen in Leitungswasser, 10 Min. in Hämatoxylin nach Weigert, 1 Min. unter fließendem Leitungswasser, kurzes Eintauchen in 1 % Essigsäure, 15 Min. in Azophloxin-Lösung, kurzes Eintauchen in 1 % Essigsäure, 5 Min. in Phosphowolframsäure+Orange G, kurzes Eintauchen in 1 % Essigsäure, 15 Min. in Lichtgrün, kurzes Eintauchen in 1 % Essigsäure, kurzes Eintauchen in 70 % EtOH. Anschließend wurden die gefärbten Gewebeschnitte auf der Heizplatte getrocknet und mit Entellan eingedeckelt.

### 2.2.26 Präparation der brachialen Lymphknoten

Die brachialen Lymphknoten, die hinter dem Schulterblatt liegen, wurden entnommen und bis zur weiteren Verwendung in RPMI-Medium bei 4 °C gelagert. Mit dem Stempel einer Spritze wurde der Lymphknoten durch ein Zellsieb gedrückt, um eine Zellsuspension herzustellen. Die Zellen wurden in RPMI-Medium aufgenommen, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm 7 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml RPMI-Medium aufgenommen und mit Hilfe der Trypanblau-Vital-Färbung die Zellzahl bestimmt und für die FACS-Färbung eingesetzt.

### 2.2.27 Durchflusszytometrie (FACS)

Die zelluläre Zusammensetzung der brachialen Lymphknoten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Messungen wurden mit dem Zytometer FACS Canto II von BD durchgeführt und mit der Programmsoftware FACSDiva ausgewertet. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht darauf, dass während der Messung die Zellen durch eine dünne Kapillare einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden. Das von den Zellen gebrochene Laserlicht wird von verschiedenen Detektoren aufgefangen und kann mit Hilfe der Software analysiert werden. Hierbei werden unter anderem das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) ermittelt, wobei das FSC die Größe und das SSC die Granularität der Zelle widerspiegelt. Des Weiteren enthält das FACS Canto II zusätzliche Laser, welche das emittierte Licht von angeregten Fluorochromen, die an Antikörper gekoppelt sind, messen können. Das hier verwendete Gerät besitzt sechs Fluoreszenzkanäle für die folgenden Fluorochrome: FITC (Emissionsmaximum 519 nm), PE (578 nm), PerCP (675 nm), Pe-Cy7 (785 nm), APC (660 nm) und APC-Cy7 (780 nm). Die Antikörperfärbungen der Zellsuspensionen wurden in einer auf Eis gekühlten 96-well-Platte durchgeführt. Hierbei waren die Konzentrationen der eingesetzten Antikörper und Sekundärfarbstoffe bereits titriert und wurden in den

angegebenen Konzentrationen eingesetzt (s. Tab. 8). Vor jeder Färbung wurden die Antikörper in PBS verdünnt, wobei bei gleicher Färbung mehrerer Proben ein Mastermix vorbereitet wurde. Pro Plattenvertiefung wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen pipettiert und die Platte wurde bei 1200 rpm für 7 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Um Fc-Bindungsstellen auf der Oberfläche der Zellen zu blockieren wurden die Zellen in 50 µl α-Maus CD16/CD32 Antikörper (Fc-Block) aufgenommen und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden weitere 50 µl mit der doppelten Konzentration der gewünschten Antikörper zugefügt, sodass die Zellen in einem Volumen von 100 µl in den angegebenen Konzentrationen für 20 Min. auf Eis gefärbt wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und in 200 µl Laufpuffer aufgenommen, um für die Messung in FACS-Röhrchen überführt zu werden. Kam ein Biotin-gekoppelter Erstantikörper zum Einsatz, war nach dem Waschen eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Streptavidin, welches Biotin mit hoher Affinität bindet, erforderlich. War es nicht möglich die gefärbten Zellen am selben Tag zu messen, wurden diese mit 1% PFA/PBS fixiert und bei 4 °C gelagert.

### 2.2.28 Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wurde das Blut aus der Vene im Bauchraum (*Vena cava*) entnommen und ohne Antikoagulanzen aufgenommen und bei RT aufbewahrt. Das entnommene Blut wurde 2x 15 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert, um das Serum von koagulierten zellulären Blutbestandteilen zu trennen. Das Serum wurde mit einer Pipette in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.29 Melaninmessung

UVB-Strahlung aktiviert die Melanozyten zur Bildung von Melanin. Dieses geben sie an die in der Epidermis sitzenden Keratinozyten ab, die das Melanin zum Schutz vor UV-induzierten DNS-Schäden um ihre Zellkerne formieren. Um das in der Epidermis befindliche Melanin quantifizieren zu können, wurde aus der Epidermis der Ohren- und Schwanzhaut eine Zellsuspension hergestellt (s. 2.2.5). Durch Zugabe von 25 µl 4 M NaOH zu  $1 \cdot 10^6$  Epidermiszellen in 100 µl PBS wurden die Epidermiszellen im Ultraschallbad lysiert. Anschließend wurden 50 µl der Probe und eine Standardreihe des Melanins (Sigma) in die Vertiefungen einer 96well half area Mikrotiterplatte pipettiert. Im Tecan-Reader wurde die Absorption bei 335 nm gemessen.

### 2.2.30 Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL)

Um zu bestimmen, ob die Hautbarriere intakt ist, wurde der transepidermale Wasserverlust (TEWL) gemessen. Im gesunden Zustand kann Flüssigkeit in Form von verdunstetem Wasser oder durch Schweißsekretion den Körper durch die Haut verlassen. Ist die Hautbarriere verletzt oder zerstört, kann Flüssigkeit den Körper unkontrolliert über die Haut verlassen. Um den

TEWL der verwendeten Mäuse zu bestimmen, wurde die TewameterR-Sonde der Firma Courage+Khazaka verwendet. Diese wurde auf der rasierten Rückenhaut der Mäuse aufgesetzt. Das Prinzip dieser Sonde nennt sich auch „offene Kammer“ Messung, welche in einem offenen Zylinder zwei Temperatur- und zwei Feuchtigkeitssensoren besitzt. Hiermit kann der TEWL, also die Verdunstungsrate in Gramm Wasser pro Quadratmeter und Stunde ( $\text{g}/\text{m}^2 \cdot \text{h}$ ) erfasst werden. Die gemessenen Werte werden mit der Software CSI ausgelesen.

### 2.2.31 Auswertung und Statistik

Die Ergebnisse wurden in der Regel in mindestens drei unabhängigen Versuchen bestätigt. Jeder Versuch beinhaltete mindestens drei biologische Replikate. Mithilfe der Software GraphPad Prism 6 wurde die grafische und statistische Auswertung vorgenommen. Die Abbildungen stellen den Mittelwert dar, wobei der Standardfehler als Streuungsmaß in die Abbildungen eingefügt wurde. Bei dem Vergleich von zwei unterschiedlichen Versuchsgruppen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit, bei Annahme einer Normalverteilung, mithilfe des Student'schen t-Tests berechnet. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt unterschieden und dargestellt:

\*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$  / \*\*\*  $p < 0,001$ .

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Rolle von MyD88 nach chronischer UVB-Bestrahlung

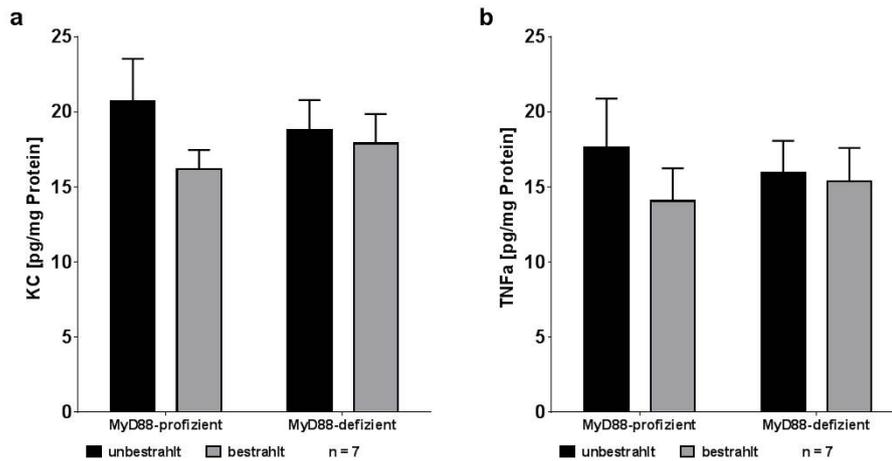
MyD88 ist ein zentrales Adaptermolekül des angeborenen Immunsystems. Vor allem Pathogene aktivieren TLRs, die spezifische molekulare Strukturen der Pathogene, auch PAMPs genannt, erkennen. Durch die TLR-vermittelte Pathogenerkennung kommt es zur Aktivierung des Adaptermoleküls MyD88 und resultiert in der Induktion des angeborenen Immunsystems, um Pathogene zu bekämpfen [115]. Jedoch ist mittlerweile bekannt, dass TLRs neben PAMPs auch durch endogene Signalmoleküle (DAMPs), die von geschädigten oder gestressten Zellen abgegeben werden, aktiviert werden können [116]. Dies ist auch unter dem Danger-Modell bekannt das besagt, dass das Immunsystem Signalmoleküle erkennt, die von verletzten Geweben oder gestressten Zellen sezerniert werden (zusammengefasst in [117]).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob chronische UVB-Strahlung DAMPs freisetzen oder induzieren können und es MyD88-abhängig zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt. Weiter wurden dann die Zusammenhänge zwischen MyD88 und der UVB-induzierten Lichtalterung analysiert.

#### 3.1.1 UVB-induzierte Entzündungsreaktion der Haut

UV-Strahlung kann akut zu Entzündungsreaktionen in der Haut führen. Diese Reaktion ist als Sonnenbrand bekannt, welcher wesentlich durch die Dauer und Stärke der UV-Strahlung, sowie durch den Hauttyp des einzelnen Individuums beeinflusst wird. Ein Sonnenbrand kann sich durch Rötung und Abschälung der Haut bis hin zur Blasenbildung äussern [63]. Im Gegensatz zur akuten UV-Strahlung führt chronische UV-Bestrahlung zur vorzeitigen Hautalterung. Diese zeigt sich klinisch durch Pigmentflecken und Faltenbildung [118].

Das Ziel dieser Arbeit war, ein Modell zur Lichtalterung (*Photoaging*) zu entwickeln, um im Mausmodell die Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu analysieren. Hierzu wurde ein Protokoll verwendet, bei dem die Mäuse über einen Zeitraum von sechs Wochen einer suberythemalen Dosis an UVB-Strahlen ausgesetzt wurden (Abb. 7). Zunächst wurde überprüft, ob es zu einer unerwünschten Entzündung der Haut kommt. Dazu wurden verschiedene Entzündungsparameter kontrolliert, um das hier verwendete Modell der Lichtalterung von einer akuten Entzündungsreaktion abzugrenzen.



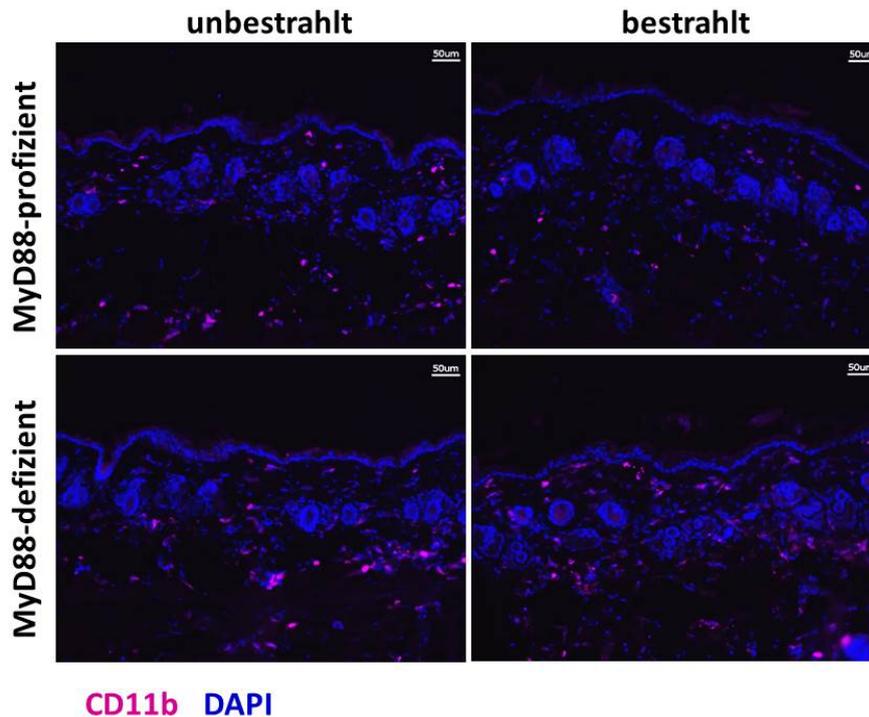
**Abbildung 9. Keine Induktion proinflammatorischer Zytokine im Modell der Lichtalterung**

Konzentration der proinflammatorischen Zytokine (a) KC und (b) TNF $\alpha$  in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut MyD88-profizienter und -defizienter Mäuse. Dargestellt ist die Zytokinkonzentration pro 1mg Protein. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt.

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass durch eine akute Bestrahlung mit einer hohen Dosis an UVB eine Entzündungsreaktion in Abhängigkeit von MyD88 ausgelöst werden kann [107]. Es wurde beobachtet, dass nach akuter UVB-Bestrahlung MyD88-defiziente Mäuse eine geringere lokale Entzündungsreaktion zeigten. In der vorliegenden Arbeit wurden beispielhaft die proinflammatorischen Zytokine KC und TNF $\alpha$  im Modell der Lichtalterung analysiert. Hierfür wurden aus der Rückenhaut der bestrahlten und unbestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Tiere Proteinlysate hergestellt und die Konzentration an KC und TNF $\alpha$  mittels ELISA quantitativ bestimmt (Abb. 9).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine KC und TNF $\alpha$  nach chronischer Bestrahlung nicht erhöht war. Dies ist ein Hinweis darauf, dass in dem hier angewendeten Modell der Lichtalterung keine Entzündungsreaktion induziert wurde.

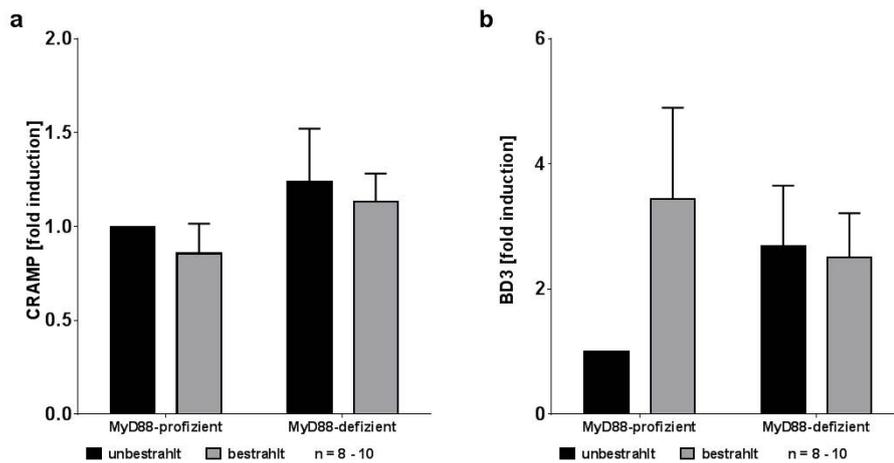
Zusätzlich wurde auch das entzündliche Infiltrat in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung untersucht. Hierfür wurde auf Gefrierschnitten der Rückenhaut eine Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b durchgeführt, um histologisch Neutrophile und Makrophagen darzustellen. In Abb. 10 ist dargestellt, dass es bei den unbestrahlten Kontrollschnitten keine MyD88-abhängigen Unterschiede in der Expression von CD11b gab. Auch konnten keine Unterschiede in der Zellzahl der CD11b-positiven Zellen in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung detektiert werden. Dies bestätigt weiter, dass das hier angewandte chronische Bestrahlungsmodell keine offensichtliche Hautentzündung induziert.



**Abbildung 10. UVB- und MyD88-unabhängige Expression von CD11b in der Dermis**

Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung gegen CD11b in der Dermis auf Rückenhautquerschnitten. Maßstabsbalken=50µm, 200x Vergrößerung

Auch antimikrobielle Peptide (AMPs) werden TLR-abhängig exprimiert und tragen zur Pathogenabwehr bei. Sie sind für die frühe Erkennung und schnelle Bekämpfung beispielsweise von Bakterien verantwortlich. Des Weiteren ist bekannt, dass sie durch akute UVB-Bestrahlung verstärkt von Keratinozyten produziert werden [119]. Durch die Analyse der AMPs *Cathelicidin-related antimicrobial peptide* (CRAMP) und beta-Defensin 3 (BD3) wurde ihre Rolle im Modell der Lichtalterung untersucht. In Abb. 11a ist gezeigt, dass die mRNA-Expression von CRAMP durch die chronische UVB-Bestrahlung nicht reguliert wird. Im Gegensatz dazu ist die mRNA-Expression von BD3 in den unbestrahlten MyD88-defizienten Mäusen höher im Vergleich zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen (Abb. 11b). Des Weiteren zeigt Abb. 11b, dass die mRNA-Expression von BD3 in den bestrahlten MyD88-profizienten Mäusen leicht erhöht ist. Dies bedeutet, dass chronische UVB-Bestrahlung BD3 MyD88-abhängig aktiviert, ähnlich wie dies zur Pathogenabwehr geschieht und zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt, wohingegen CRAMP im Modell der Lichtalterung nicht reguliert ist.



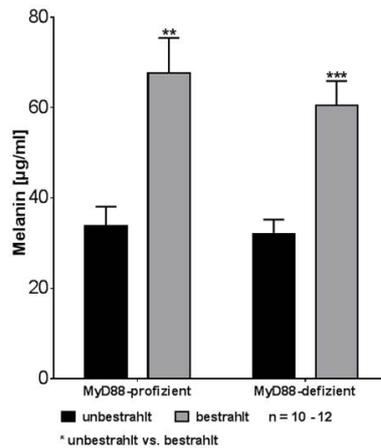
**Abbildung 11. AMPs können MyD88-abhängig durch chronische UVB-Bestrahlung hochreguliert werden**

mRNS-Expression der AMPs (a) CRAMP und (b) BD3 in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut MyD88-profizienter und -defizienter Mäuse. Dargestellt ist die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt.

Im Modell der Lichtalterung konnte keine Erhöhung in der Konzentration der proinflammatorischen Zytokine KC und  $TNF\alpha$ , noch in der Infiltration von Neutrophilen in der Dermis festgestellt werden. Jedoch wurde ein leichter Anstieg des AMP BD3 beobachtet. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine unerwünschte Entzündungsreaktion ausgeschlossen werden kann, aber bestimmte Zellen durch die UVB-Strahlung aktiviert werden können.

### 3.1.2 Pigmentierung und DNS-Schaden

Im Modell der Lichtalterung (Abb. 7) wies die Rückenhaut der Versuchsmäuse makroskopisch keine Schädigung auf. Im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrolltieren wurde jedoch bei den bestrahlten Versuchstieren eine stärkere Pigmentierung beobachtet. Das Ausmaß dieser UVB-induzierten Pigmentierung wurde aus Lysaten der Epidermis quantifiziert (Abb. 12).



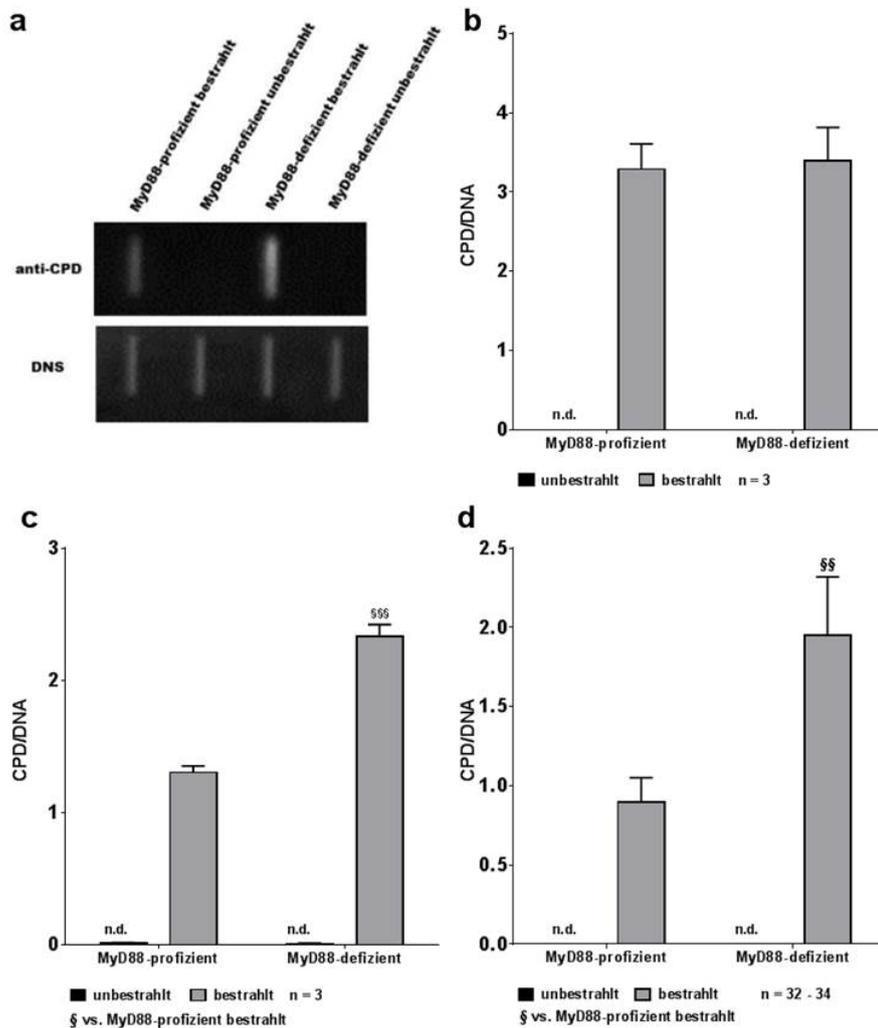
**Abbildung 12. Die Melaninkonzentration in der Epidermis ist unabhängig von MyD88**

Melaninkonzentration der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäuse. Die Melaninmenge wurde durch Absorptionsmessung bei 305nm aus einem Epidermislysat bestimmt. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\*  $p < 0,01$  / \*\*\*  $p < 0,001$ )

Melanin wird von Melanozyten gebildet, die durch UVB-Strahlung aktiviert werden. Diese geben das Melanin an die Keratinozyten in der Epidermis weiter, welche es zum Schutz vor DNS-Schäden um ihren Zellkern lagern [77]. Die chronische Bestrahlung mit UVB führte wie erwartet zu einer signifikanten Erhöhung des Melaningehalts in der Epidermis. Die Konzentration an Melanin, welches in der Epidermis eingelagert wurde, war in MyD88-profizienten und -defizienten bestrahlten Versuchstieren vergleichbar. In einer anderen Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass nach akuter UVB-Bestrahlung die Bräunung der Mäuse abhängig von MyD88 war [107]. Dies bedeutet, dass nach akuter UVB-Bestrahlung die Bräunung der Mäuse MyD88-abhängig ist, jedoch gleicht sich dieser Unterschied möglicherweise über die sechs Wochen Bestrahlung aus. Somit schützt diese UVB-induzierte Pigmentierung MyD88-profiziente und -defiziente Tiere im Modell der Lichtalterung in gleichem Maße und ist nicht unmittelbare Ursache für weitere phänotypische Unterschiede.

Die Pigmentierung der Haut soll durch DNS-Schäden und deren Reparatur im Zusammenhang stehen [120]. UVB-Strahlen induzieren DNS-Schäden in der Haut, welche zu einer Strukturveränderung der DNS führen. Die häufigsten UVB-induzierten Strukturveränderungen sind Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD). Hierbei werden benachbarte Thyminе über einen Cyclo-

butanring kovalent gebunden. Nachfolgend führt dies zu Mutationen, welche die Tumorentstehung begünstigen [70].

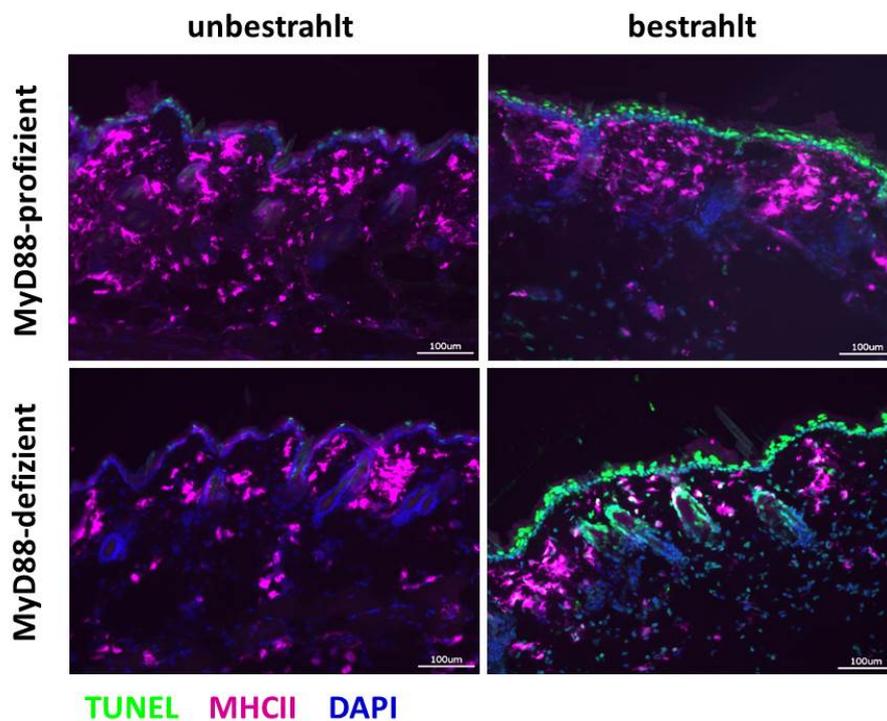


**Abbildung 13. UVB-induzierte Formation von CPDs ist abhängig von MyD88**

(a) Repräsentatives Bild eines South-Western-Blots. Die auf einer Membran aufgebrachte DNS wurde mit einem anti-Thymindimer-Antikörper sichtbar gemacht und anschließend wurde die Gesamt-DNS mit Methylblau angefärbt. Es wurde die relative Menge der CPDs pro DNS berechnet. Relative Menge der CPDs der (b) *in vitro* kultivierten und bestrahlten Fibroblasten, (c) *in vitro* kultivierten und bestrahlten Keratinozyten und (d) *in vivo* bestrahlten Haut-DNS. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\* p < 0,01) n.d.=nicht detektierbar

Um den DNS-Schaden im hier verwendeten Modell der Lichtalterung zu untersuchen, wurde mithilfe eines South-Western-Blots die Menge der CPDs spezifisch mit einem Antikörper in der DNS nachgewiesen (Abb. 13a). Dies wurde sowohl aus der DNS von *in vitro* kultivierten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Fibroblasten (MEF) (Abb. 13b) und Keratinozyten (Abb. 13c), als auch aus der Haut-DNS der *in vivo* bestrahlten MyD88-profizienten

und -defizienten Versuchsmäuse (Abb. 13d) quantifiziert. In den jeweils dazugehörigen unbestrahlten Kontrollen konnten keine CPD-Formationen detektiert werden. Interessanterweise war die Bildung der UVB-induzierten CPDs *in vitro* in den Keratinozyten und *in vivo* in der gesamten Haut signifikant erhöht in der Abwesenheit von MyD88, obwohl die Konzentration an Melanin und somit der natürliche Schutz des Körpers vor UVB-Strahlung in beiden Genotypen gleich war. Jedoch wird die Formation der CPDs in den *in vitro* bestrahlten Fibroblasten nicht von MyD88 beeinflusst. Dies bedeutet, dass CPDs wie erwartet nur nach UVB-Bestrahlung gebildet wurden und dass MyD88-abhängige Signalwege abhängig vom Zelltyp den Körper vor UVB-induzierten DNS-Schäden schützen.

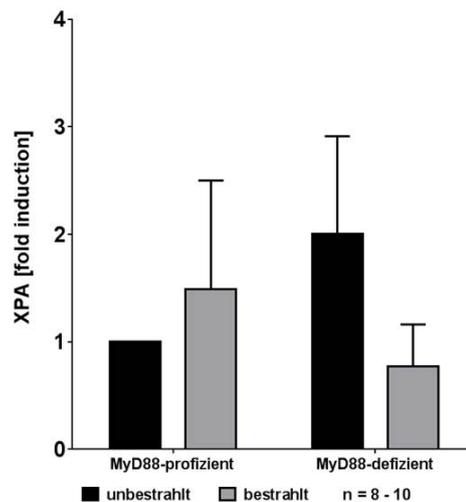


**Abbildung 14. Das Fehlen von MyD88 erhöht die Apoptoserate in der Epidermis nach chronischer UVB-Bestrahlung**

Repräsentative Bilder der TUNEL- (grün) und MHCII-Färbung (lila) auf Querschnitten der Rückenhaut. Maßstabsbalken=100µm, 200x Vergrößerung

Zellen können nach starker Schädigung ihrer DNS den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten. Die Apoptose dient zur Eliminierung einzelner stark geschädigter Zellen, ohne die umliegenden Nachbarzellen zu beeinträchtigen [121]. Während dieser Zelleliminierung wird die DNS der Zelle durch Endonukleasen fragmentiert. Die dabei entstehenden freien DNS-Stränge können mithilfe einer TUNEL-Färbung detektiert und histologisch sichtbar gemacht werden, um die in Apoptose gegangenen Zellen darzustellen. Die Abb. 14 zeigt Querschnitte der Rückenhaut, in der in grün die TUNEL-Färbung dargestellt ist. Mit MHCII wurden

die dendritischen Zellen gegengefärbt (lila). Die Hautproben von bestrahlten Mäusen zeigten eine höhere Apoptoserate als die von unbestrahlten Mäusen, wobei diese noch stärker in MyD88-defizienten Mäusen, vor allem in der Dermis, im Vergleich zu den MyD88-profizienten bestrahlten Mäusen erhöht war. Da Zellen die Apoptose unter anderem dann einleiten, wenn ihre DNS stark geschädigt ist, stützt dieses Ergebnis zusätzlich den Befund, dass MyD88 vor UVB-induziertem DNS-Schaden schützt. Somit schützt das angeborene Immunsystem, im Speziellen die MyD88-abhängige Aktivierung, vor UVB-induzierten DNS-Schäden und der damit verbundenen Apoptoserate.



**Abbildung 15. Die Induktion der mRNA-Expression des DNS-Reparaturenzyms XPA durch UVB ist abhängig von MyD88**

Die Abbildung zeigt die mRNA-Expression des DNS-Reparaturenzyms XPA in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. Dargestellt ist die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt.

Bevor die Zelle die Apoptose einleitet, werden entstandene DNS-Schäden repariert. Da CPDs zu einer Strukturveränderung und damit zu einer Auswölbung der DNS führt, können diese Schäden mithilfe der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) beseitigt werden. Der Mechanismus dieser Reparaturmaschinerie ist komplex und gliedert sich in mehrere Schritte, bei denen der DNS-Schaden erkannt, der DNS-Strang geschnitten, der geschädigte Abschnitt herausgeschnitten, der DNS-Strang neu synthetisiert und abschließend wieder ligiert wird. An diesem Prozess sind eine Vielzahl an Proteinen beteiligt. Beispielhaft wurde in dieser Arbeit die mRNA-Expression von *Xeroderma Pigmentosum complementation group A* (XPA) mithilfe der RT-PCR untersucht (Abb. 15). XPA ist ein Protein, welches während der NER für die Überprüfung der DNS-Schäden verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Expression von XPA in MyD88-profizienten Mäusen nach chronischer UVB-Bestrahlung leicht erhöht war. Im

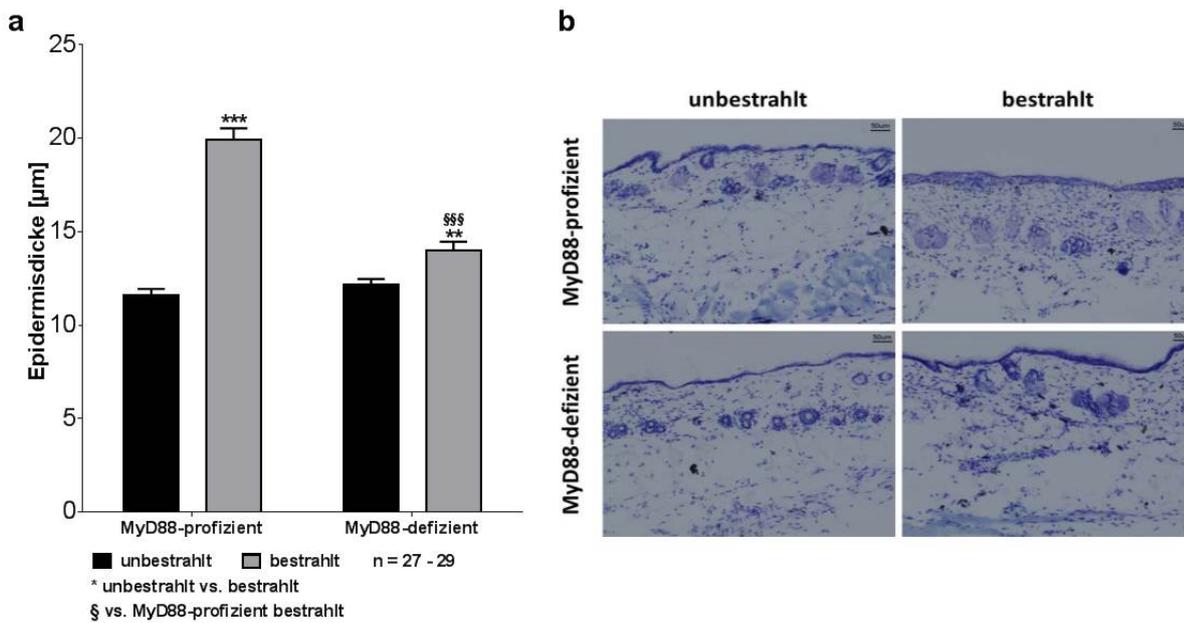
Vergleich dazu war diese bei MyD88-defizienten Mäusen vermindert. Dies könnte bedeuten, dass MyD88-defiziente Mäuse mehr DNS-Schäden aufweisen, da bei ihnen die DNS-Reparatur weniger aktiviert ist.

Somit konnte bestätigt werden, dass UVB-Strahlung zu DNS-Schäden in der Haut und der damit verbundenen Apoptose der geschädigten Zellen führt. Interessanterweise konnte nachgewiesen werden, dass dieser Mechanismus durch die Abwesenheit von MyD88 verstärkt wird und so MyD88 vor DNS-Schäden und der darauf folgenden Apoptose schützt. Vorläufige Daten zeigen, dass die mRNA-Expression des DNS-Reparaturenzyms XPA in MyD88-defizienten Mäusen nach chronischer UVB-Bestrahlung im Vergleich zu MyD88-profizienten Mäusen verringert zu sein scheint. Somit könnte möglicherweise die Aktivierung von MyD88 die DNS-Reparatur verstärken und vor DNS-Schäden und Apoptose schützen.

#### 3.1.3 UVB-induzierte Veränderungen der Strukturkomponenten der Epidermis

Die Epidermis ist die äußere Hautschicht und damit der Teil der Haut, der mit der Umwelt in Berührung kommt. Sie besteht zu einem großen Teil aus Keratinozyten, die ihr die Struktur verleihen und die Barriere zur Umwelt bilden. Keratinozyten proliferieren, wandern dadurch nach außen und verhornen dort zu Korneozyten. Ein Charakteristikum der Lichtalterung der Haut ist die verstärkte Keratinozytenproliferation und Verdickung der Epidermis. Diese Verdickung dient als physikalischer Schutz und Barriere gegen die UV-Strahlung, da hierdurch die Strahlen durch mehr Zellschichten dringen müssen und absorbiert werden. Die Verdickung der Epidermis von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen wurde im Modell der Lichtalterung histologisch analysiert und die Epidermisdicke quantifiziert (Abb. 16a). Hierfür wurden die Gefrierquerschnitte der Rückenhaut mit Toluidinblau angefärbt, sodass die Epidermis gut sichtbar von der Dermis abzugrenzen war (Abb. 16b).

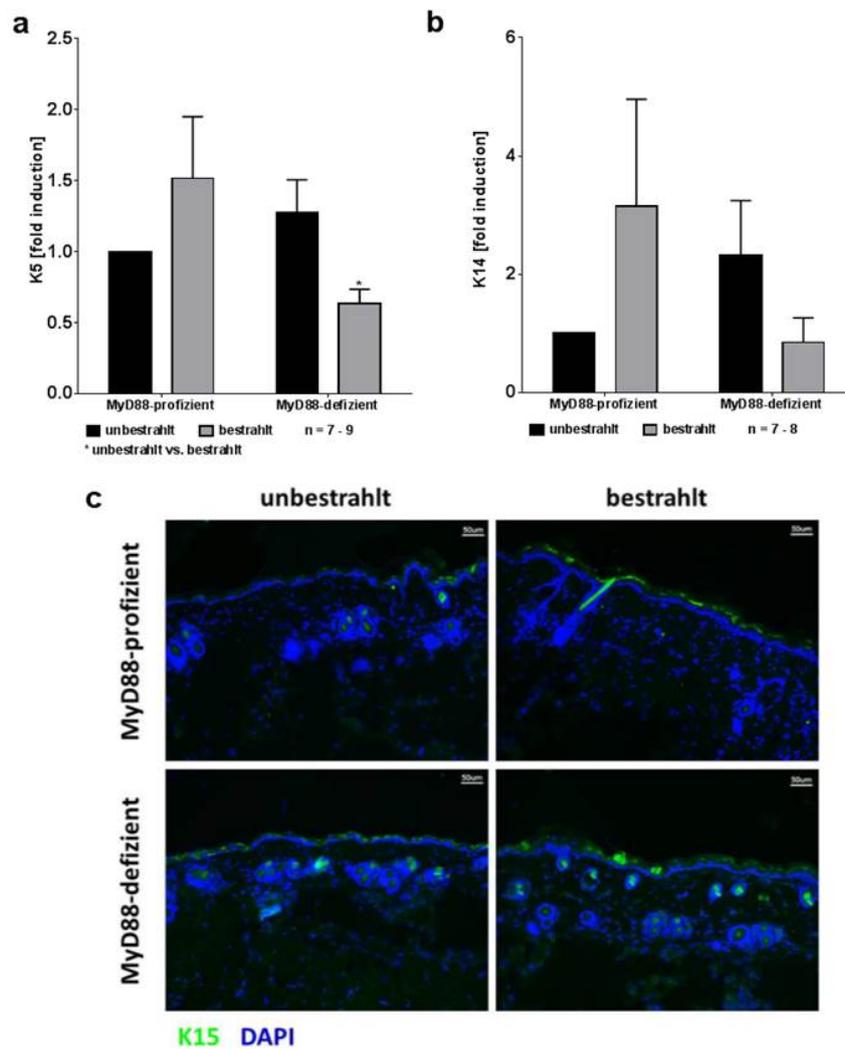
Dabei zeigte sich, dass die Epidermis der MyD88-profizienten und -defizienten Mäuse nach chronischer UVB-Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen signifikant verdickt war. Interessanterweise war die UVB-induzierte Epidermisverdickung in MyD88-defizienten im Vergleich zu den -profizienten Mäusen signifikant reduziert. Somit führt die Lichtalterung der Haut zum Aufbau einer Schutzbarriere gegen UVB-Strahlung durch die Verdickung der Epidermis, die erstaunlicherweise abhängig von MyD88 reguliert ist.



**Abbildung 16. UVB-induzierte Verdickung der Epidermis ist abhängig von MyD88**

(a) Quantitative Auswertung der Epidermisverdickung von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. (b) Repräsentative Bilder der Toluidinblau-Histologie. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\* p < 0,01 / \*\*\* p < 0,001) Maßstabsbalken = 50 µm, 200x Vergrößerung

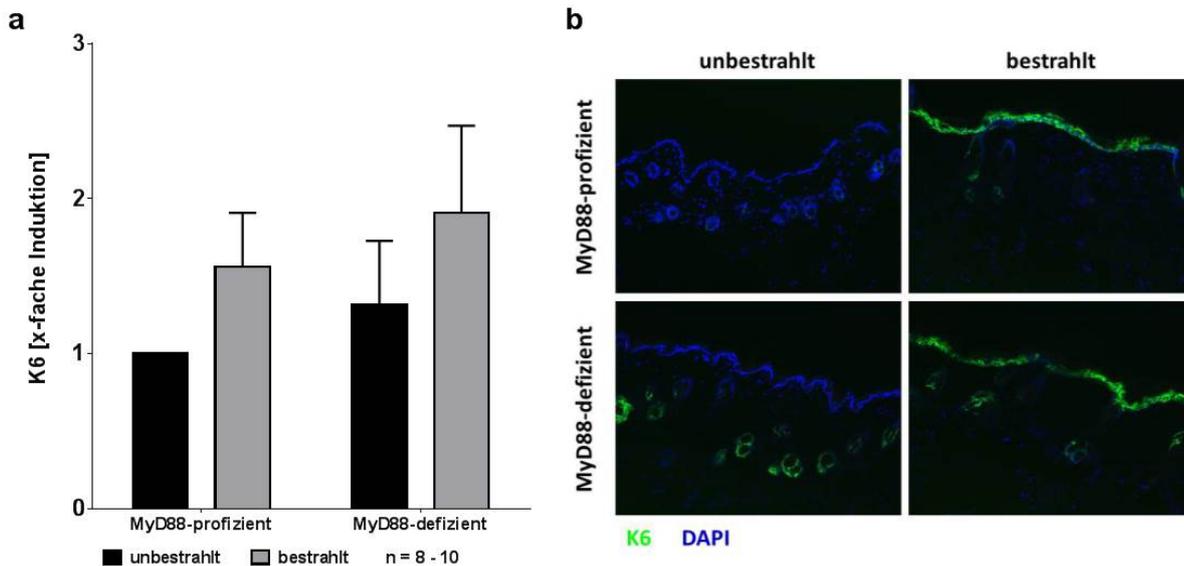
Die Epidermisverdickung kommt durch die vermehrte Proliferation der Keratinozyten zustande, welche durch die Expression verschiedener Keratine kontrolliert wird. Keratine sind Strukturproteine, die abhängig vom Epitheltyp und dem Differenzierungsstatus der Zelle exprimiert werden. Somit werden beispielsweise in basalen, aktivierten oder differenzierten Keratinozyten unterschiedliche Keratine exprimiert. Hier wurde der Frage auf den Grund gegangen, welche veränderte Keratinexpression für die UVB-induzierte Verdickung der Epidermis verantwortlich ist. Zu diesem Zweck wurde die Expression ausgewählter Keratine untersucht. Keratinozyten, die in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert sind, die auch Stammzellen beinhalten, exprimieren die Keratine K5 und K14 [122]. Sie sind verantwortlich für die Stabilität und Regenerationsfähigkeit der Epidermis. Zusammen mit den Keratinen K5/K14 wird auch K15 in den basalen Keratinozyten exprimiert [123]. Die basalen Keratinozyten werden von der proliferierenden Keratinozytenschicht nach oben in die Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) geschoben, wo sie differenzieren und keratinisieren. In diesem Differenzierungsprozess wechselt auch die Keratinexpression zu K1 und K10 [124]. In dieser Arbeit wurde die mRNA-Expression von K5 (Abb. 17a) und K14 (Abb. 17b) mittels RT-PCR untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Keratine K5 und K14 auf mRNA-Ebene in Abhängigkeit von MyD88 nach chronischer UVB-Bestrahlung hochreguliert waren. Die Proteinexpression von K15 wurde zusätzlich mithilfe eines Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers histologisch dargestellt (Abb. 17c).



**Abbildung 17. MyD88-abhängige Aktivierung basaler Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung**

mRNS-Expression der basalen Keratinozytenmarker (a) K5 und (b) K14 in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. Dargestellt ist die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen. (c) Repräsentative Bilder der K15-Histologie. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert mit SEM dargestellt (\*  $p < 0,05$ ) Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$ , 200x Vergrößerung

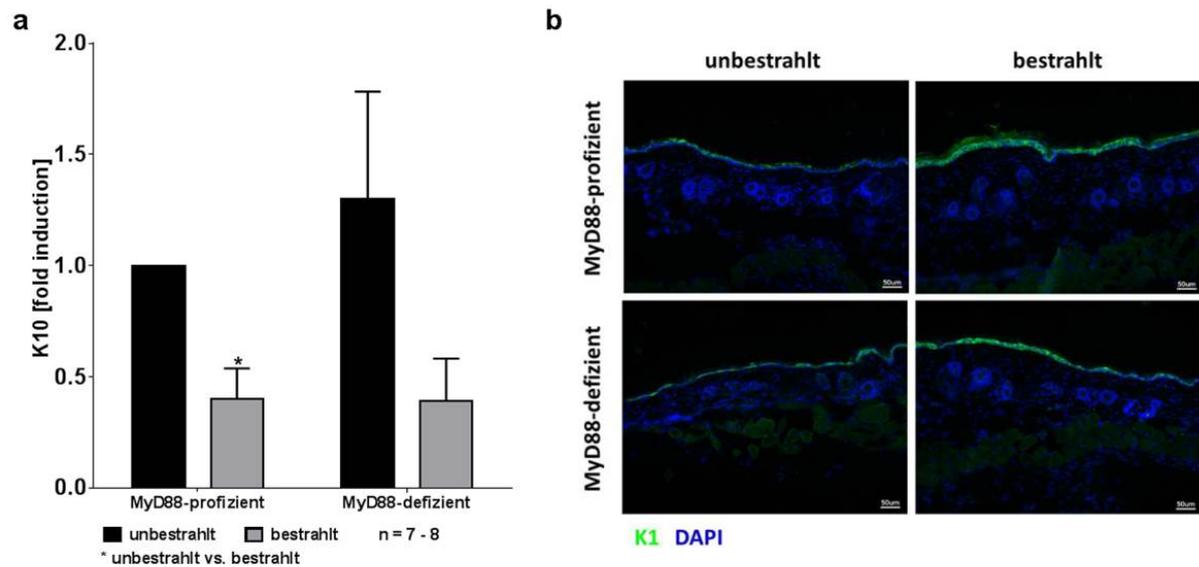
Nach chronischer UVB-Bestrahlung war in MyD88-profizienten Mäusen die K15-Expression im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollmäusen hochreguliert. Im Vergleich dazu war in unbestrahlten MyD88-defizienten Mäusen eine leicht erhöhte K15-Expression zu sehen, die durch UVB-Bestrahlung nicht erhöht werden konnte. So konnte auf RNS- und Proteinebene gezeigt werden, dass die Hochregulation der Marker von basalen Keratinozyten nach chronischer UVB-Bestrahlung nur in MyD88-profizienten Mäusen detektiert werden konnte, obgleich die Induktion beider Marker nur schwach war. Dies könnte bedeuten, dass die verringerte Differenzierung zu basalen Keratinozyten in MyD88-defizienten Mäusen für die fehlende Epidermisverdickung nach UVB-Strahlung mit verantwortlich ist.



**Abbildung 18. MyD88-unabhängige Aktivierung der K6-Expression nach UVB-Bestrahlung**  
 mRNS-Expression des Keratins K6 (a) in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. Dargestellt ist die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen. (b) Repräsentative Bilder der K6-Histologie. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt. Maßstabsbalken = 100  $\mu$ m, 200x Vergrößerung

Im Gegensatz zu den basalen Keratinozyten exprimieren aktivierte und proliferierende Keratinozyten K6 [125]. Eine Aktivierung kann zum Beispiel durch Verletzungen, Entzündungen oder UV-Strahlung induziert werden. Im Modell der Lichtalterung war die K6-Expression sowohl auf mRNA-Ebene (Abb. 18a), als auch auf Proteinebene (Abb. 18b) erst nach UVB-Bestrahlung induziert, wohingegen in den unbestrahlten Kontrollmäusen keine Expression zu detektieren war. Jedoch war diese Hochregulation nicht abhängig von MyD88. Somit induziert chronische UVB-Strahlung die Expression von K6 MyD88-unabhängig.

Gegensätzlich zeigte sich, dass die mRNA-Expression von K10 (Abb. 19a) unabhängig von MyD88 nach sechswöchiger UVB-Bestrahlung vermindert war. Dies bedeutet, dass die Keratinozyten sich zu diesem Zeitpunkt nicht im Differenzierungsstadium befanden. Untersuchungen der Proteinexpression von K1 (Abb. 19b) ergaben, dass Keratin K1 in den unbestrahlten Kontrollmäusen exprimiert wird. Nach der sechswöchigen UVB-Bestrahlung konnte eine leichte Erhöhung der Proteinexpression festgestellt werden, die aber unabhängig von MyD88 war. Somit ist K1 schon in unbestrahlter Haut vorhanden und kann durch UVB-Bestrahlung weiter erhöht werden. Da K10 immer mit K1 zusammen exprimiert wird, korrelieren möglicherweise die reduzierten mRNA-Level nicht mit der Proteinexpression.

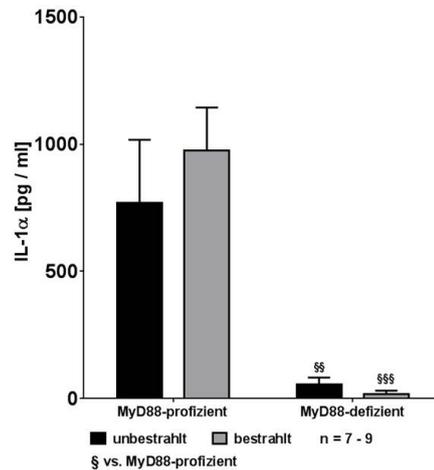


**Abbildung 19. MyD88-unabhängige Aktivierung der K10- und K1-Expression nach UVB-Bestrahlung**  
mRNS-Expression des Keratins K10 (a) in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. Dargestellt ist die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen. (b) Repräsentative Bilder der K1-Histologie. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt. Maßstabsbalken = 50 µm, 200x Vergrößerung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass chronische UVB-Bestrahlung Einfluss auf die Keratinexpression in der Epidermis nimmt. Zum einen resultiert diese in eine MyD88-unabhängigen Induktion der proliferierenden Keratinozyten, welche durch den Stressfaktor UV-Strahlung zur Proliferation aktiviert werden. Gegenätzlich wird dazu passend die Differenzierung der Keratinozyten ebenfalls MyD88-unabhängig gehemmt. Erstaunlicherweise konnte nachgewiesen werden, dass die basalen Keratinozyten MyD88-abhängig im Modell der Lichtalterung aktiviert werden und dies zur MyD88-abhängigen Epidermisverdickung beitragen kann.

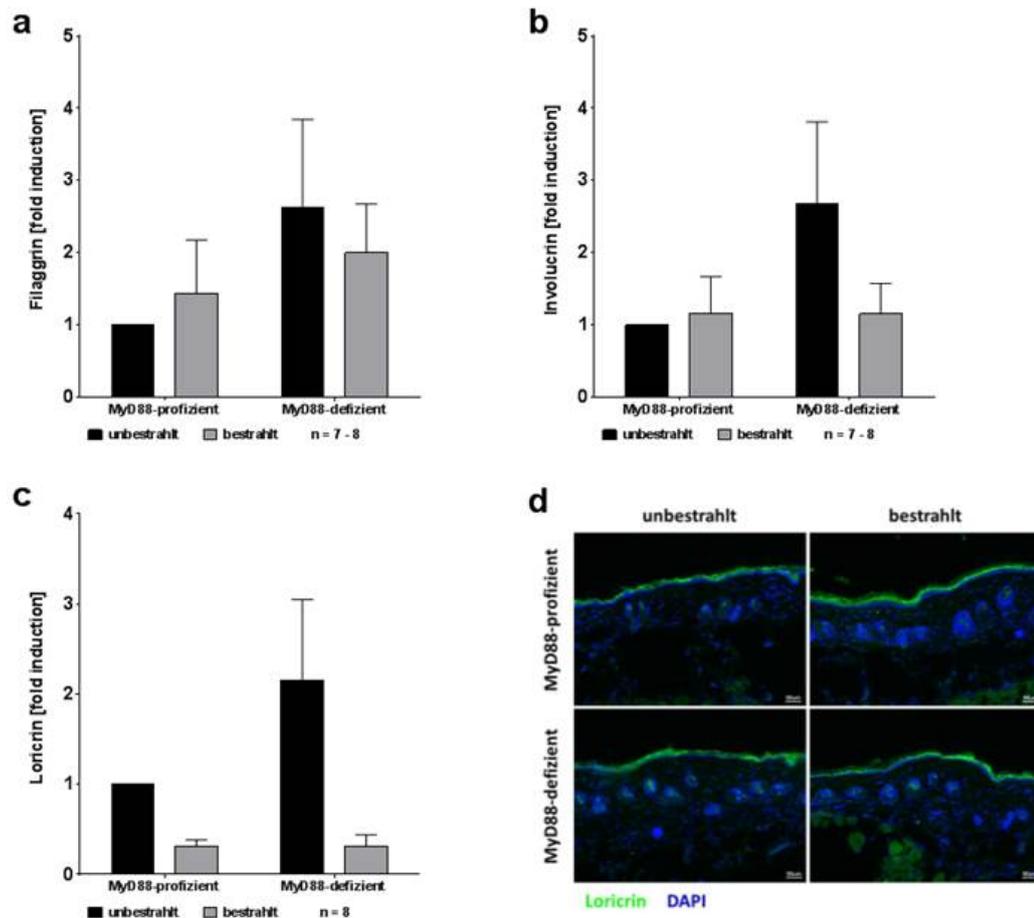
Im Prozess der Keratinozytenaktivierung und -differenzierung ist es bekannt, dass Keratinozyten Zytokine freisetzen. Hierbei spielt das Zytokin IL-1 $\alpha$  eine bedeutende Rolle [126]. Des weiteren ist die Sekretion von IL-1 $\alpha$  abhängig von MyD88 [127]. Es wurde untersucht, ob in diesem Modell der Lichtalterung das bedeutende Zytokin IL-1 $\alpha$  von den Keratinozyten gebildet wird. Hierfür wurden primäre Keratinozyten aus der Epidermis der Ohr- und Schwanzhaut von bestrahlten und unbestrahlten Mäusen *ex vivo* isoliert und für sieben Tage kultiviert. Aus den Überständen wurde mittels ELISA die Freisetzung von IL-1 $\alpha$  gemessen (Abb. 20). Es zeigte sich, dass die Konzentration von IL-1 $\alpha$  tendenziell vermehrt von Keratinozyten gebildet wird, die aus der Epidermis von chronisch bestrahlten MyD88-profizienten Mäusen stammen. Im Gegensatz dazu ist die IL-1 $\alpha$ -Konzentration von Keratinozyten aus der Epidermis von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-defizienten Mäusen signifikant reduziert. Aus den Überständen wurden auch weitere Zytokine gemessen, die ebenfalls bei dem Entwicklungszyklus der Keratinozyten eine Rolle spielen und für die Differenzierung der Keratinozyten mit

verantwortlich sind [126]. Es konnte jedoch weder  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  noch  $\text{TGF}\beta$  in den Keratinozytenkulturüberständen detektiert werden. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Zytokine nicht von den Keratinozyten selbst, sondern von anderen Zellen in der Haut sekretiert werden.



**Abbildung 20. MyD88-abhängige Produktion von IL-1 $\alpha$  ist unabhängig von der UVB- Bestrahlung**  
Konzentration von IL-1 $\alpha$  in den Überständen der *ex vivo* kultivierten Keratinozyten der chronisch bestrahlten und unbestrahlten Ohren- und Schwanzhautepidermis von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert +SEM dargestellt (\*\*  $p < 0,01$  / \*\*\*  $p < 0,001$ )

Eine weitere wichtige Strukturkomponente innerhalb der Epidermis stellt der *Cornified Envelope* dar. Dieser befindet sich an der Innenseite der Hornschicht, wo er eine dichte, schwer durchdringbare Barriere zur Umwelt bildet. Die Hauptkomponenten des *Cornified Envelope* stellen die Strukturproteine Filaggrin, Involucrin und Loricrin dar, welche während des Prozesses der Keratinisierung (Verhornung) gebildet werden [34]. Filaggrin wird von Keratinozyten gebildet und über Disulfidbrücken mit Keratinen verknüpft. Es ist maßgeblich für die Struktur und Festigkeit der Epidermis verantwortlich. Auch spielt Filaggrin eine wichtige Rolle für den Schutz gegen UV-Strahlung. Das Fehlen von Filaggrin führt zu einer Reduktion von Urocan-säure, welches protektiv gegen UV-Strahlung wirkt [128]. Das Strukturprotein Involucrin wird in einer frühen Phase des Differenzierungsprozesses der Epidermis gebildet. Es ist direkt an der Zellmembran lokalisiert und dient als Gerüst, an dem im weiteren Verlauf des Verhornungsprozesses andere Strukturproteine verankert werden [129]. Loricrin ist mit 70-85 % die Hauptkomponente des *Cornified Envelope* und dient als Hauptverstärkungsprotein [35].



**Abbildung 21. MyD88-unabhängige Expression der *Cornified Envelope*-Proteine**

mRNS-Expression der Hauptkomponenten (a) Filaggrin, (b) Involucrin und (c) Loricrin des *Cornified Envelopes* in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut MyD88-profizienter und -defizienter Mäuse. Dargestellt ist die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen. (d) Repräsentative Bilder der Loricrin-Histologie. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert +SEM dargestellt. Maßstabsbalken = 50 µm, 200xVergrößerung

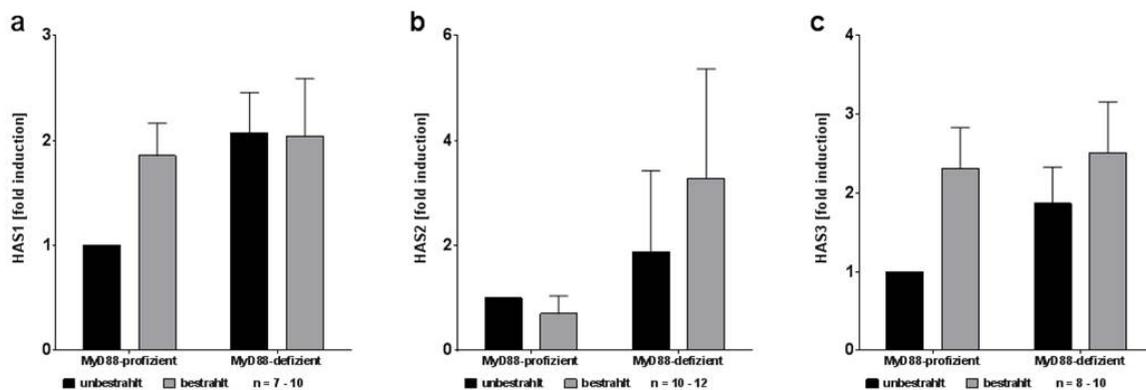
Es stellte sich die Frage, ob chronische UVB-Bestrahlung im Modell der Lichtalterung einen Einfluss auf diese drei Hauptkomponenten des *Cornified Envelope* hat. Interessanterweise zeigten alle drei *Cornified Envelope*-Komponenten im unbestrahlten Zustand eine leichte Erhöhung in den MyD88-defizienten Mäusen im Vergleich zu den -profizienten Kontrollen auf mRNS-Ebene (Abb. 21). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass chronische UVB-Bestrahlung zu einem leichten Anstieg der mRNS-Expression von Filaggrin führt (Abb. 21a). Diese Aufregulation ist jedoch in MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen vergleichbar. Dies bedeutet, dass chronische UVB-Bestrahlung die Filaggrin-Expression und somit auch den Schutz vor UV-Strahlung induziert. Im Gegensatz dazu ist die mRNS-Expression von Involucrin (Abb. 21b) nach der UVB-Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen nicht verändert. Dies bedeutet, dass das Grundgerüst des *Cornified Envelope* durch UVB-Bestrahlung

nicht verändert wird. Die Hauptkomponente Loricrin hingegen wird nach chronischer UVB-Bestrahlung auf mRNA-Ebene deutlich herunter reguliert (Abb. 21c). Da UVB-Strahlung auf Loricrin scheinbar einen Einfluss hat, wurde hier zusätzlich die Proteinexpression histologisch dargestellt (Abb. 21d). Hier konnte nachgewiesen werden, dass Loricrin schon in der Epidermis der unbestrahlten Kontrolltiere vorhanden war. Jedoch hatte die chronische UVB-Bestrahlung, im Gegensatz zu den mRNA-Analysen keinen Einfluss auf die Proteinexpression. Dies könnte hierdurch erklärt werden, dass das Strukturprotein Loricrin eine hohe Expression aufweist, die auf Proteinebene nicht unterschieden werden konnte.

Somit hat chronische UVB-Bestrahlung keinen relevanten Einfluss auf die Ausbildung des *Cornified Envelope*, welcher auch nach chronischer UVB-Bestrahlung als schützende Barriere fungiert.

#### 3.1.4 UVB-induzierte Veränderungen der Strukturkomponenten der Dermis

Die Dermis liegt geschützt unterhalb der Epidermis und besteht hauptsächlich aus den strukturgebenden Fibroblasten, elastischen Fasern und Kollagen, die zusammen ein Netzwerk bilden und dieser ihre Struktur und Elastizität verleihen. Generell führt die Lichtalterung der Haut zu Veränderungen in der Dermis. Klinisch sind diese Veränderungen durch Faltenbildung, verminderte Zugfestigkeit und eine lederartige Erscheinung der Haut zu erkennen.



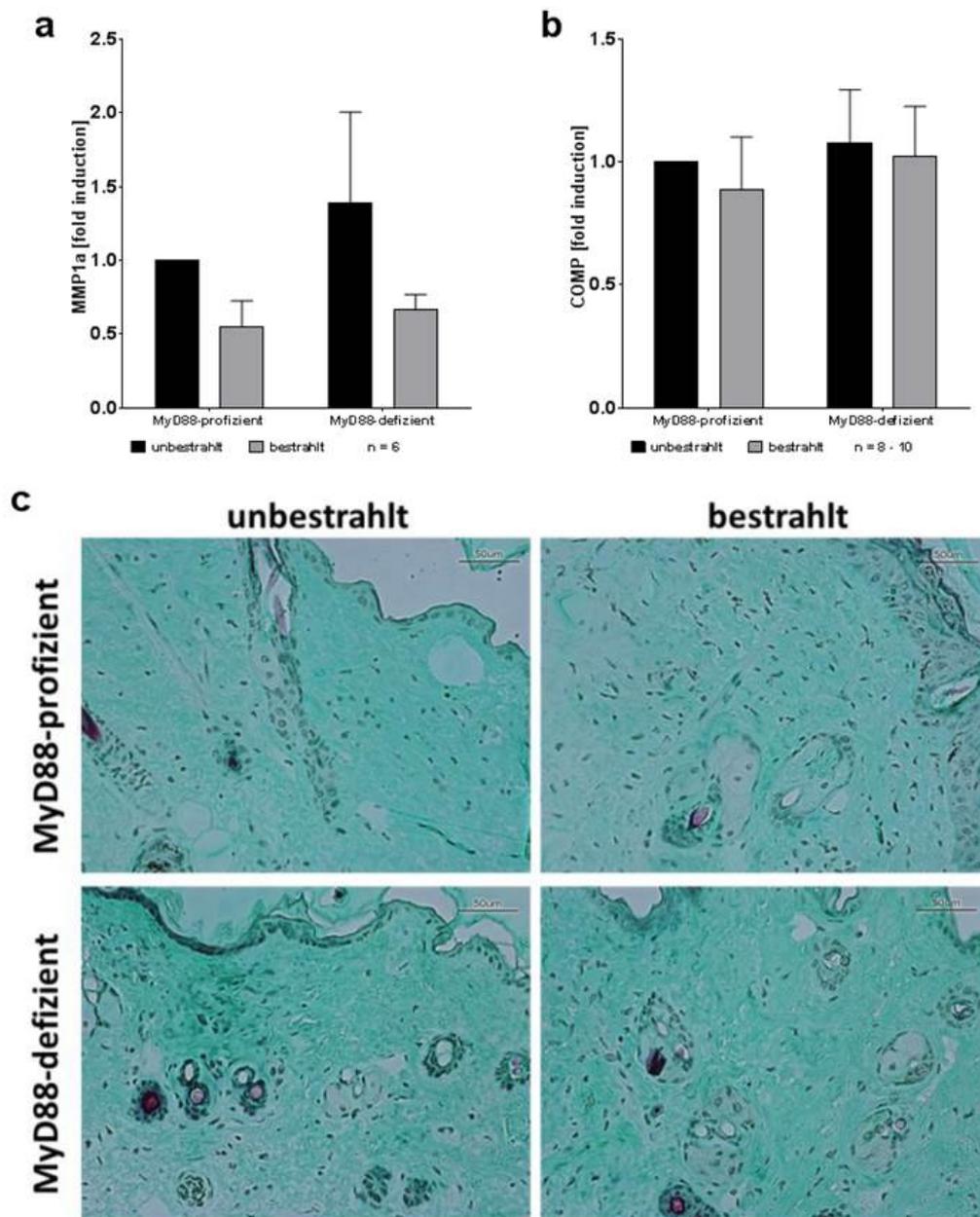
**Abbildung 22. MyD88-abhängige Expression der Hyaluronsäure-Synthasen (HAS) 1-3 nach chronischer UVB-Bestrahlung**

mRNA-Expression der Hyaluronsäure-Synthasen (HAS) (a) HAS1, (b) HAS2 und (c) HAS3 in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut MyD88-profizienter und -defizienter Mäuse. Dargestellt ist die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert +SEM dargestellt.

Ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und eine der strukturgebenden Komponenten ist die Hyaluronsäure (HA = *hyaluronic acid*), die von HA-Synthasen (HAS) gebildet wird. HA kann TLRs aktivieren [84] und somit als DAMP wirken. Da bekannt ist, dass mehrwöchige

UVB-Bestrahlung die Expression der HAS erhöhen [85] [86], wurde die Regulation der drei HAS im Modell der Lichtalterung in MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen untersucht. Abb. 22 zeigt die Expressionen der HAS1-3 von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen auf mRNA-Ebene. Hierbei ist die x-fache Induktion der Gene im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrolle der MyD88-profizienten Mäuse dargestellt. Es zeigte sich, dass die mRNA-Expression von HAS1 und HAS3 nach chronischer UVB-Bestrahlung vor allem in den MyD88-profizienten Mäusen erhöht ist. Gegenätzlich konnte ein Anstieg der mRNA-Expression von HAS2 vorallem in den bestrahlten MyD88-defizienten Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 22b). Es zeigte sich, dass im Modell der Lichtalterung MyD88-abhängige Signalwege für die Synthese der HA eine Rolle spielen, die als DAMP wirken und in Folge das angeborene Immunsystem aktivieren könnte.

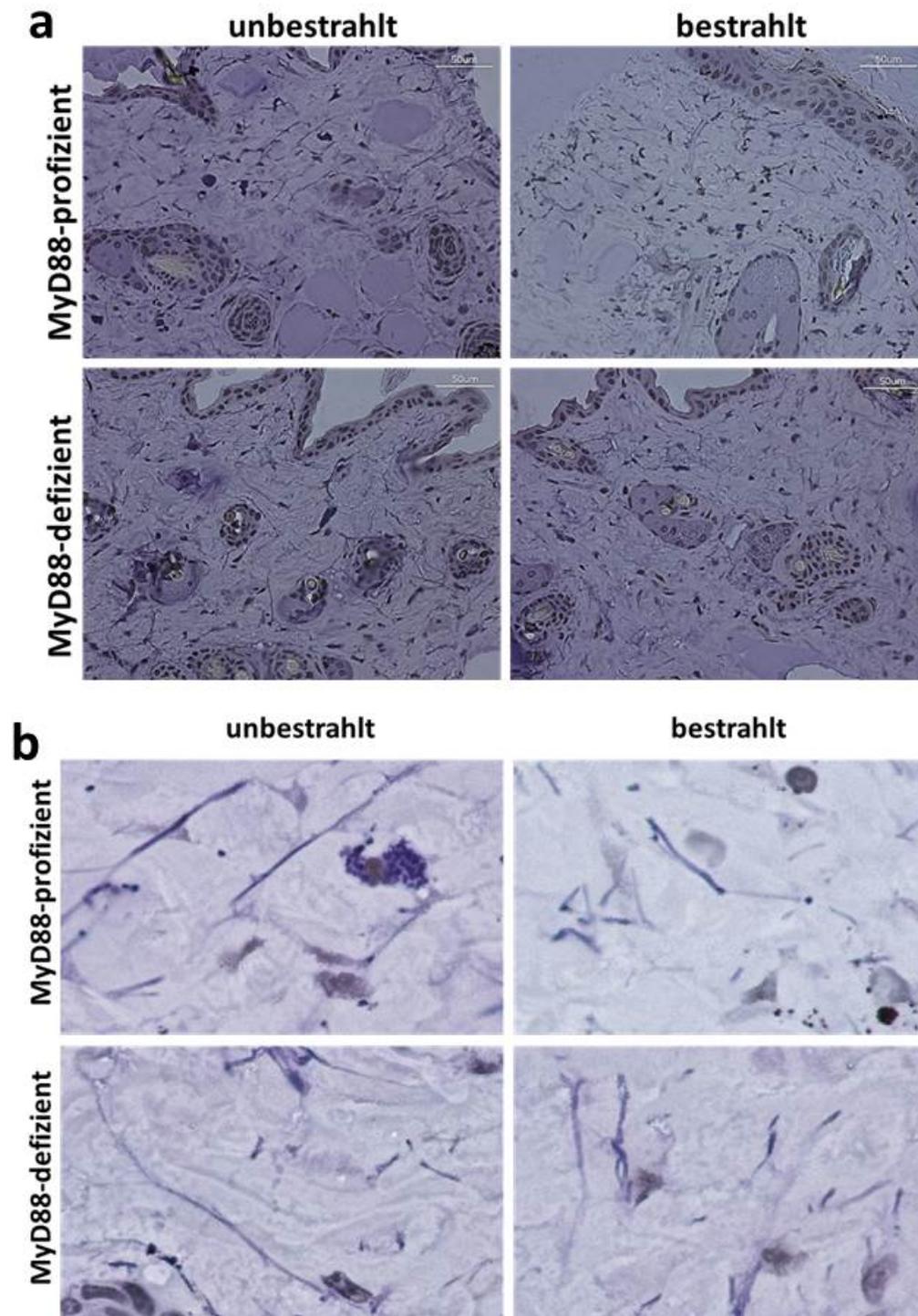
Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Dermis ist das Kollagen, welches der Haut ihre Festigkeit und Stabilität verleiht [81]. Chronische UVB-Bestrahlung führt zu einer Aktivierung der Matrix-Metalloproteinasen, die das Kollagen abbauen. Bei diesem Prozess spielt vor allem MMP1 $\alpha$ , auch Kollagenase genannt, eine wichtige Rolle, es baut Typ1-Kollagen in den Geweben ab. Ein weiteres wichtiges Protein in der Strukturgebung der Dermis ist das Protein COMP (*Cartilage Oligomeric Matrix Protein*). Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des Kollagennetzwerks und der Elastizität der Haut. Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Expression von MMP1 $\alpha$  und COMP auf den Kollagengehalt der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung hat. Hierbei konnte beobachtet werden, dass die Expression von MMP-1 $\alpha$  in der Haut von bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen reduziert ist (Abb. 23a). Im Vergleich dazu konnten keine Unterschiede in der Expression von COMP auf mRNA-Ebene detektiert werden (Abb. 23b). Dies könnte bedeutet, dass chronische UVB-Bestrahlung die Aktivität der Kollagenase nicht beeinflusst und es so infolge zu keinem Einfluss auf den Abbau des Kollagens haben könnte. Um dieses zu analysieren, wurde das Kollagen auf Hautquerschnitten der Rückenhaut von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen histologisch gefärbt. Bei dieser Übersichtsfärbung wird das vorhandene Kollagen grün angefärbt. Es zeigte sich in den Histologien, dass die Übersichtsfärbungen keine Unterschiede bezüglich des Kollagens aufwiesen (Abb. 23). Jedoch zeigte sich auch hier, dass die MyD88-abhängige Verdickung der Epidermis auch hier nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Zellkerne in der Dermis von vor allem bestrahlten MyD88-profizienten Mäusen eine veränderte Form aufwiesen. Gegenätzlich zu einer runden Form des Zellkerns im unbestrahlten Zustand wiesen sie nach UVB-Bestrahlung eine langgestreckte Form auf. Dies deutet daraufhin, dass die Zellen in der Dermis durch die UVB-Bestrahlung beeinflusst wurden. Da die Übersichtsfärbung für Kollagen jedoch schwer zu beurteilen ist, müssten weitere Analysen der Kollagenexpression im WB angefertigt werden.



**Abbildung 23. Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf den Kollagengehalt der Dermis** mRNA-Expression von (a) MMP-1 $\alpha$  und (b) COMP in chronisch bestrahlter und unbestrahlter Rückenhaut MyD88-profizienter und -defizienter Mäuse. Dargestellt ist die x-fache Induktion mit Bezug zu den unbestrahlten MyD88-profizienten Mäusen. (c) Repräsentative Bilder der Kollagenhistologie (Masson-Goldner trichrom). Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt. Maßstabsbalken = 50 $\mu$ m, 400x Vergrößerung

Ein weiteres klinisches Symptom der Lichtalterung in der Haut ist die Faltenbildung. Diese wird bedingt durch die Zerstörung der elastischen Fasern, die ein Netzwerk in der Dermis bilden und ihr dadurch ihre Zugfestigkeit verleiht. Durch chronische UVB-Bestrahlung wird dieses Netzwerk zerstört, indem die elastischen Fasern gespalten werden und sich verdicken. Die im normalen Zustand langen dünnen Fasern sind dann als kurze dickere Fragmente zu erkennen und können der Dermis keine Spannung mehr verleihen. Um die elastischen Fasern in unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen zu untersuchen wurde eine Histologiefärbung der elastischen Fasern (Elastika van Gieson-Färbung) angefertigt. In Abb. 24 sind repräsentative Bilder dieser histologischen Färbung aller Gruppen dargestellt. Die elastischen Fasern können durch ihre dunkelblaue Färbung identifiziert werden. Die elastischen Fasern der unbestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäuse zeigen ein strukturiertes Netzwerk, welches sich mit dünnen langen Fasern gleichmäßig durch die Dermis zieht. Im Vergleich dazu ist zu sehen, dass das elastische Fasernetzwerk in den bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen zerstört ist. Dies ist daran zu erkennen, dass die dunkelblauen Fasern kürzer und dicker erscheinen und kein gleichmäßiges Netzwerk zu erkennen ist. Dies bedeutet, dass es im Modell der Lichtalterung zu einer Zerstörung des elastischen Fasernetzwerks kommt. Es ist jedoch unklar, ob es nach Bestrahlung Unterschiede zwischen den MyD88-profizienten und defizienten Mäusen gibt. Hierfür müssten noch weiterführende Analysen durchgeführt werden.

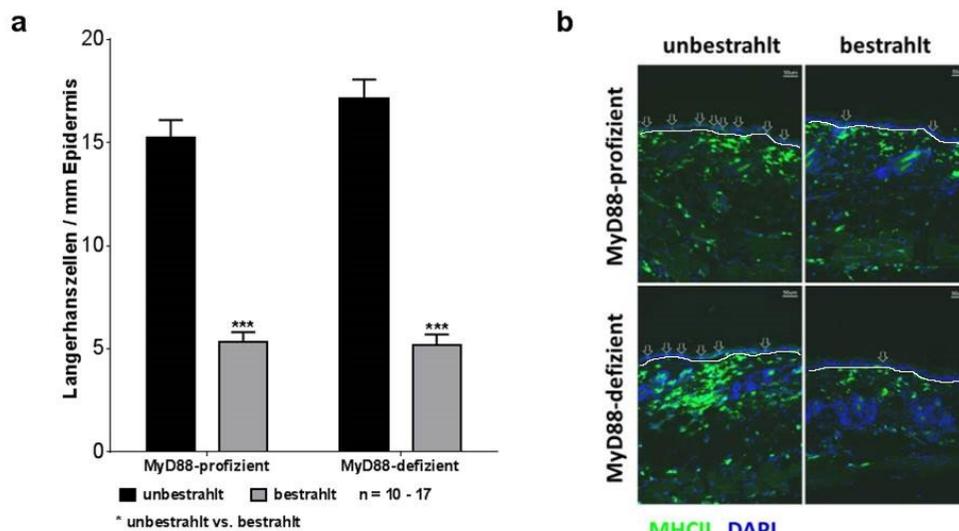
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das hier verwendete Modell der Lichtalterung eine Veränderung in der Expression der HAS und der Zerstörung der elastischen Fasern aufzeigt, welche zu einer vorzeitigen Faltenbildung beitragen könnte.



**Abbildung 24. chronische UVB-Bestrahlung führt zur Zerstörung des elastischen Fasernetzwerks**  
Repräsentative Bilder der Elastika von Gieson-Färbung auf Hautquerschnitten der Rückenhaut von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen (a) Übersicht, Maßstabsbalken = 50 µm, 400x Vergrößerung (b) Detailvergrößerung einzelner Fasern.

### 3.1.5 UVB-induzierte Veränderungen der Immunzellen in der Haut

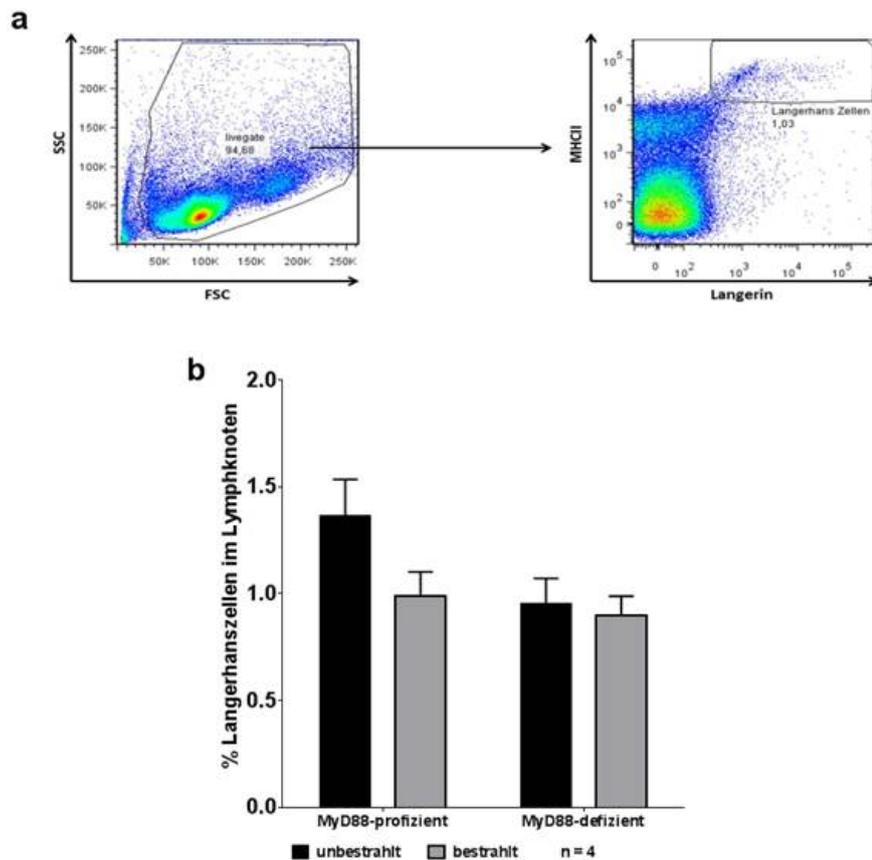
Neben den Keratinozyten sind die Langerhanszellen eine der wichtigsten Immunzellpopulationen in der Epidermis. Nach ihrer Aktivierung wandern sie durch die Lymphgefäße in den drainierenden Lymphknoten, um dort die vorher aufgenommenen Antigene zu präsentieren und das adaptive Immunsystem zu aktivieren.



**Abbildung 25. MyD88-unabhängige Reduktion der Langerhanszellen in der Epidermis nach chronischer UVB-Bestrahlung**

(a) Quantitative Auswertung der Anzahl der Langerhanszellen in der Epidermis von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. (b) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung gegen MHCII. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$ , 200x Vergrößerung

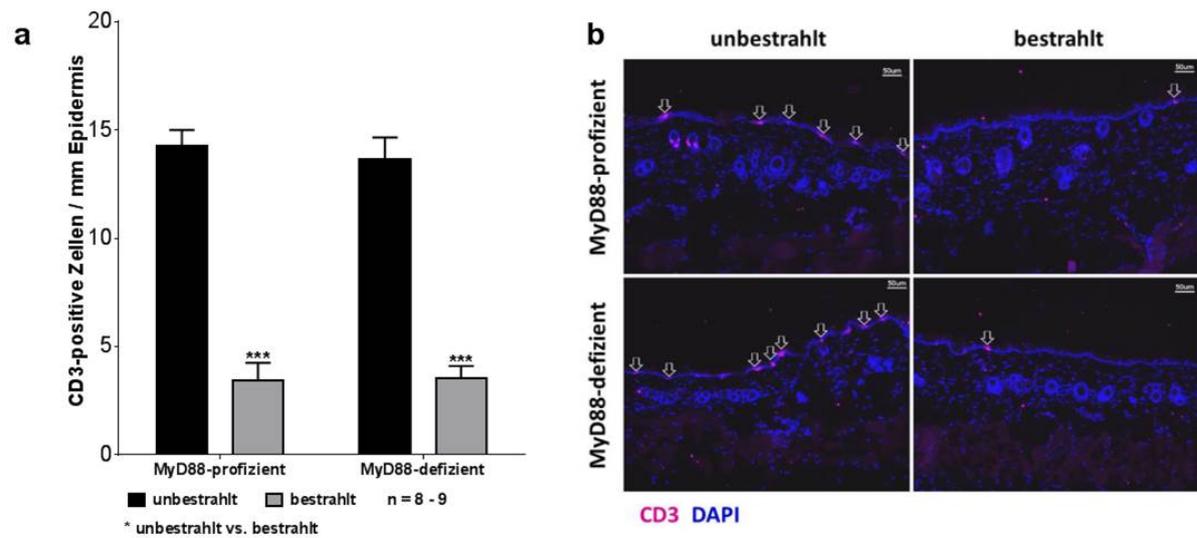
Da Langerhanszellen aus der Epidermis auswandern können, aber auch durch UV-Strahlung geschädigt werden wurden sie im Modell der Lichtalterung analysiert. Zuerst wurden die Zellzahlen der Langerhanszellen in der Epidermis quantifiziert (Abb. 25a). Hierfür wurden Gefrierschnitte der Rückenhaut der Versuchstiere mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung gegen MHCII gefärbt (Abb. 25b), da MHCII in der Epidermis nur von Langerhanszellen exprimiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl der Langerhanszellen in der Epidermis nach der chronischen UVB-Bestrahlung signifikant verringert war. Jedoch war die Reduktion unabhängig von MyD88.



**Abbildung 26. Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Frequenz der Langerhanszellen im drainierenden brachialen Lymphknoten**

(a) Exemplarische *Gating-Strategie* der im FACS gemessenen aus der Haut ausgewanderten dendritischen Zellen. (b) Prozentualer Anteil der im drainierenden brachialen Lymphknoten befindlichen aus der Haut ausgewanderten dendritischen Zellen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt.

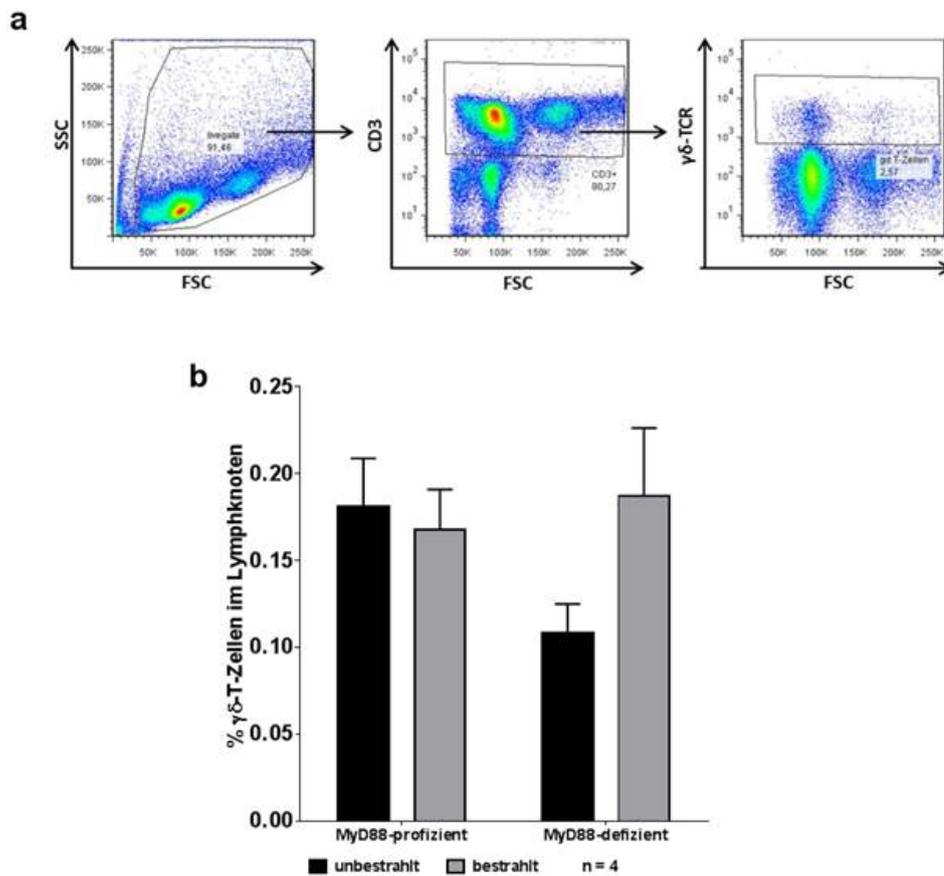
Um herauszufinden, ob die verringerte Zellzahl durch die Aktivierung und Migration der Langerhanszellen in den Haut-drainierenden Lymphknoten zurückzuführen ist, wurden die Langerhanszellen im brachialen Lymphknoten mittels FACS-Färbung analysiert. Abb. 26a zeigt repräsentativ die *Gating-Strategie* der Population der aus der Haut ausgewanderten dendritischen Zellen. Der prozentuale Anteil der im Lymphknoten befindlichen aus der Haut ausgewanderten dendritischen Zellen war im Modell der Lichtalterung nur leicht verändert (Abb. 26b). Die bestrahlten MyD88-profizienten Mäuse zeigten tendenziell eine Reduktion der Zellfrequenzen im Vergleich zu ihren unbestrahlten Kontrollen. Diese Ergebnis müsste durch weitere FACS-Analysen verifiziert werden. Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Langerhanszellen nicht in den drainierenden Lymphknoten gewandert sind, sondern durch die UVB-Bestrahlung depletiert wurden.



**Abbildung 27. MyD88-unabhängige Reduktion der  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Epidermis nach chronischer UVB-Bestrahlung**

(a) Quantitative Auswertung der Anzahl der  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Epidermis von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. (b) Repräsentative Bilder der Immunfluoreszenzfärbung gegen CD3. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\*\*)  $p < 0,001$ . Maßstabsbalken = 50  $\mu$ m, 200x Vergrößerung

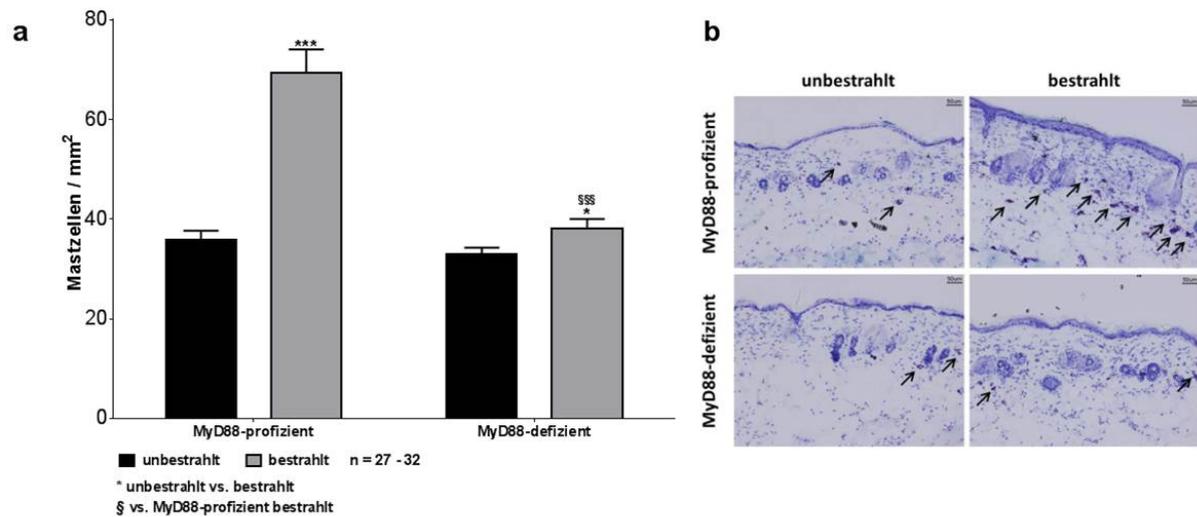
Eine weitere Zellpopulation der Epidermis sind die  $\gamma\delta$ T-Zellen. Zusammen mit den LZ bilden sie ein dichtes Netzwerk und dienen als immunologische Barriere. Sie spielen eine wichtige Rolle während der Wundheilung und bei der Kontrolle der Tumorentstehung. Da UVB-Strahlung als erstes auf die Epidermis trifft wurde untersucht, ob die Anzahl der  $\gamma\delta$ T-Zellen verändert waren. Hierfür wurden aus Gefrierschnitten der Rückenhaut die Zellzahlen in der Epidermis quantifiziert (Abb. 27a), die mithilfe einer Immunfluoreszenzfärbung gegen CD3 (Abb. 27b) gefärbt wurden. Abb. 27 zeigt, dass die Zellzahl der  $\gamma\delta$ T-Zellen nach chronischer UVB-Bestrahlung signifikant verringert war. Interessanterweise war dies jedoch unabhängig von MyD88.



**Abbildung 28. Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Frequenz der  $\gamma\delta$ T-Zellen im drainierenden brachialen Lymphknoten**

(a) Exemplarische *Gating-Strategie* der im FACS gemessenen  $\gamma\delta$ T-Zellen. (b) Prozentualer Anteil der im drainierenden brachialen Lymphknoten befindlichen  $\gamma\delta$ T-Zellen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt.

Nicht nur Langerhanszellen auch  $\gamma\delta$ T-Zellen sind in der Lage in den drainierenden brachialen Lymphknoten einzuwandern. Mittels FACS-Analyse wurde untersucht, ob die  $\gamma\delta$ T-Zell-Population im brachialen Lymphknoten im Modell der Lichtalterung verändert war. Abb. 28a zeigt die angewendete *Gating-Strategie*. In Abb. 28b sind die prozentualen  $\gamma\delta$ T-Zell-Frequenzen im drainierenden brachialen Lymphknoten dargestellt. Obwohl zuvor eine Reduktion der Zellzahlen in der Epidermis festgestellt wurden, waren die Frequenzen der  $\gamma\delta$ T-Zellen im Modell der Lichtalterung nicht verändert. Es konnte lediglich eine reduzierte Zellfrequenz in den unbestrahlten MyD88-defizienten Mäusen beobachtet werden, die noch in weiteren Analysen untersucht werden müssten. Dies deutet darauf hin, dass die  $\gamma\delta$ T-Zellen im Modell der Lichtalterung nicht in den drainierenden Lymphknoten einwandern, sondern gibt einen Hinweis darauf, dass sie durch die UV-Strahlen, wie die Langerhanszellen, depletiert werden.



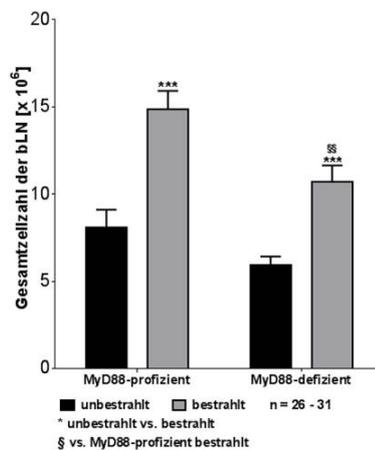
**Abbildung 29. MyD88-abhängiger Anstieg der Mastzell-Anzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung**

(a) Quantitative Auswertung der Anzahl der Mastzellen in der Dermis von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. (b) Repräsentative Bilder der Toluidinblaufärbung. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert +SEM dargestellt (\*  $p < 0,05$  / \*\*\*  $p < 0,001$ ). Maßstabsbalken = 50  $\mu\text{m}$ , 200x Vergrößerung

Neben der Epidermisverdickung ist ein Anstieg der Mastzellen in der Dermis ein weiteres bekanntes Charakteristikum der Lichtalterung der Haut. Es ist jedoch noch unbekannt, ob dieses Phänomen der Proliferation in der Haut oder der Infiltration aus umliegenden Geweben geschuldet ist. Um einen weiteren Beleg zu liefern, dass durch das in dieser Arbeit verwendete Modell Lichtalterung induziert wurde, wurde die Anzahl der Mastzellen in der Dermis (Abb. 29a) mittels einer Toluidinblaufärbung der Rückenhautquerschnitte (Abb. 29b) quantifiziert. Der Farbstoff Toluidinblau färbt die Granula der Mastzellen lila an. Chronische UVB-Bestrahlung führte zu einem hoch signifikanten Anstieg der Mastzellen in der Dermis der MyD88-profizienten Tiere. Interessanterweise war dieser Anstieg der Mastzellen auch signifikant abhängig von MyD88. In diesem Kapitel konnte verdeutlicht werden, dass im Modell der Lichtalterung das angeborene Immunsystem abhängig vom Zelltyp eine Rolle spielt. UVB-Strahlung scheint Langerhanszellen und  $\gamma\delta\text{T}$ -Zellen der Epidermis zu schädigen. In beiden Zellpopulation ist eine MyD88-unabhängige Reduktion in der Zellzahl festzustellen. Anhand von FACS-Analysen im drainierenden Lymphknoten konnte eine Migration der Zellen ausgeschlossen werden, was auf eine Depletion der Zellen durch UVB-Strahlen schließen lässt. Interessanterweise konnte im Gegensatz dazu gezeigt werden, dass die Erhöhung der Mastzellen signifikant abhängig von der Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Modell der Lichtalterung ist.

### 3.1.6 UVB-induzierte Immunantwort im Haut-drainierenden Lymphknoten

Um die durch chronische UVB-Bestrahlung induzierte adaptive Immunantwort zu untersuchen, wurden die Haut-drainierenden brachialen Lymphknoten weiterführend untersucht. Aktivierte Antigen-präsentierende Zellen wandern in den Lymphknoten ein und induzieren dort durch Präsentation von phagozytierten und prozessierten Antigenen die adaptive Immunantwort. Diese Aktivierung geht mit der Proliferation und Differenzierung der Lymphozyten einher. Zuerst wurden die absoluten Zellzahlen der brachialen Lymphknoten bestimmt (Abb. 30).

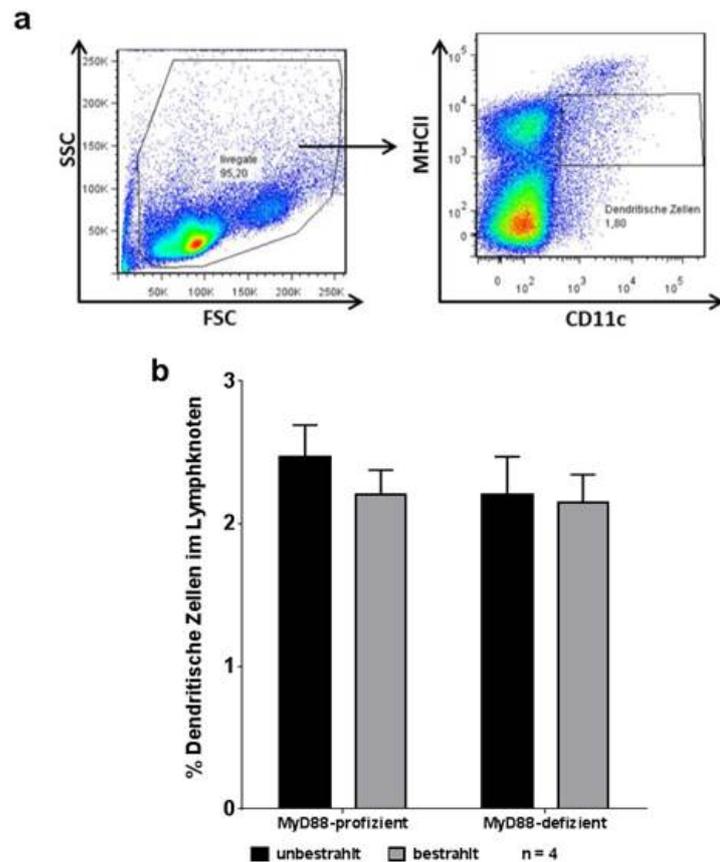


**Abbildung 30. MyD88-abhängiger Anstieg der Zellzahlen im brachialen Lymphknoten nach chronischer UVB-Bestrahlung**

Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\*  $p < 0,01$  / \*\*\*  $p < 0,001$ )

Nach der sechswöchigen UVB-Bestrahlung wurde makroskopisch eine leichte Vergrößerung der Lymphknoten festgestellt. Durch Bestimmung der Zellzahlen der entnommenen Lymphknoten konnte bestätigt werden, dass die chronische UVB-Bestrahlung einen MyD88-abhängigen Anstieg der Lymphknotenzellzahl induziert. Dies lässt darauf schließen, dass eine UV-abhängige adaptive Immunantwort aktiviert wird, die abhängig von MyD88 ist.

Um die Veränderung der Zellpopulationen im Lymphknoten nach chronischer UVB-Bestrahlung zu analysieren, wurden die Zellsuspensionen der Lymphknoten mittels FACS analysiert. Es wurden die Frequenzen der Zellpopulationen und deren Aktivierung ausgewertet. Durch Antigene aktivierte dendritische Zellen wandern von der Rückenseite der Haut in den brachialen Lymphknoten ein, um dort Antigene an T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren. In Abb. 31 sind die prozentualen Anteile der dendritischen Zellen im brachialen Lymphknoten dargestellt. Es konnten jedoch keine Genotyp- oder UV-abhängigen Unterschiede in der Frequenz der dendritischen Zellen festgestellt werden.

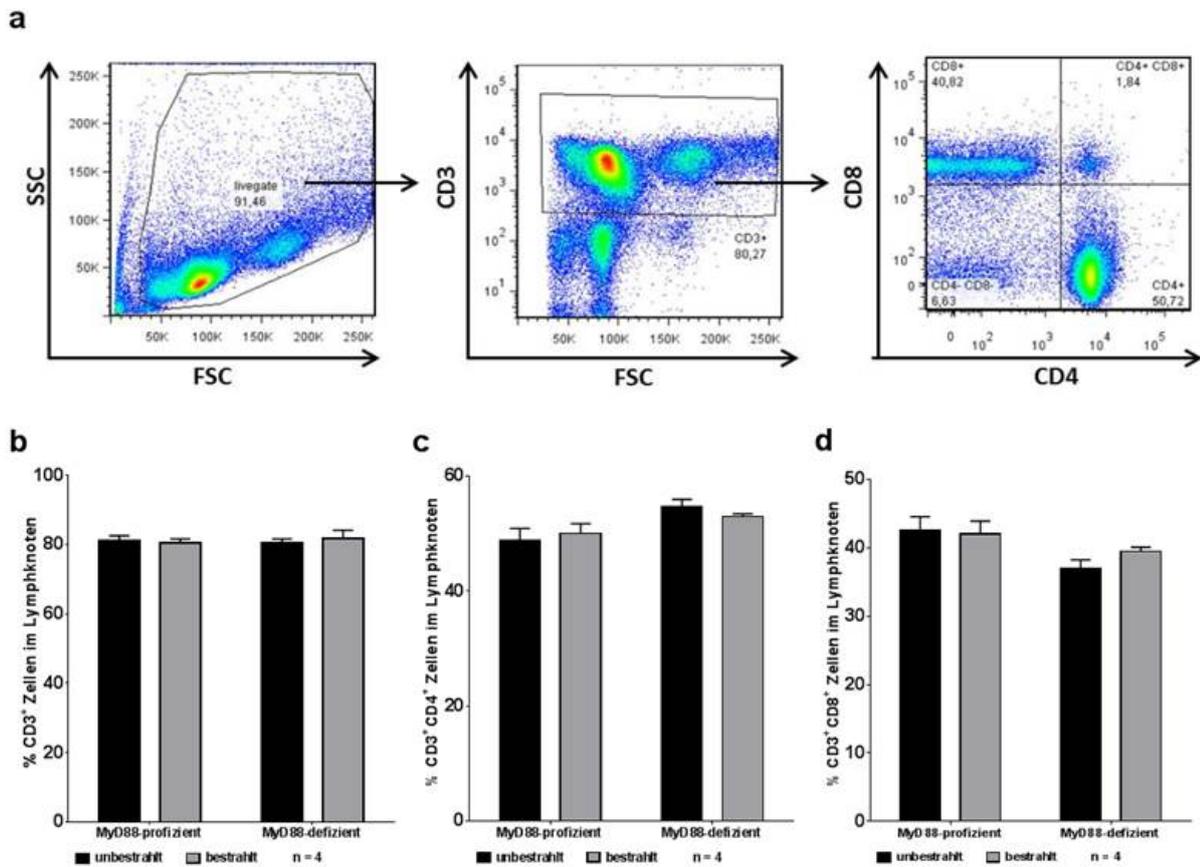


**Abbildung 31. Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Frequenz der dendritischen Zellen im drainierenden brachialen Lymphknoten**

(a) Die Abbildung zeigt exemplarisch die *Gating-Strategie* der im FACS gemessenen dendritischen Zellen von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. (b) Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der im drainierenden brachialen Lymphknoten befindlichen dendritischen Zellen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert mit SEM dargestellt.

In Abb. 32a ist die Gatingstrategie der T-Zellpopulationen der FACS-Analyse dargestellt. Wie in Abb. 32b zu erkennen ist gibt es keine Genotyp- bzw. UV-abhängigen Unterschiede in der Frequenz der einzelnen T-Zellpopulationen.

### 3.1 Die Rolle von MyD88 nach chronischer UVB-Bestrahlung

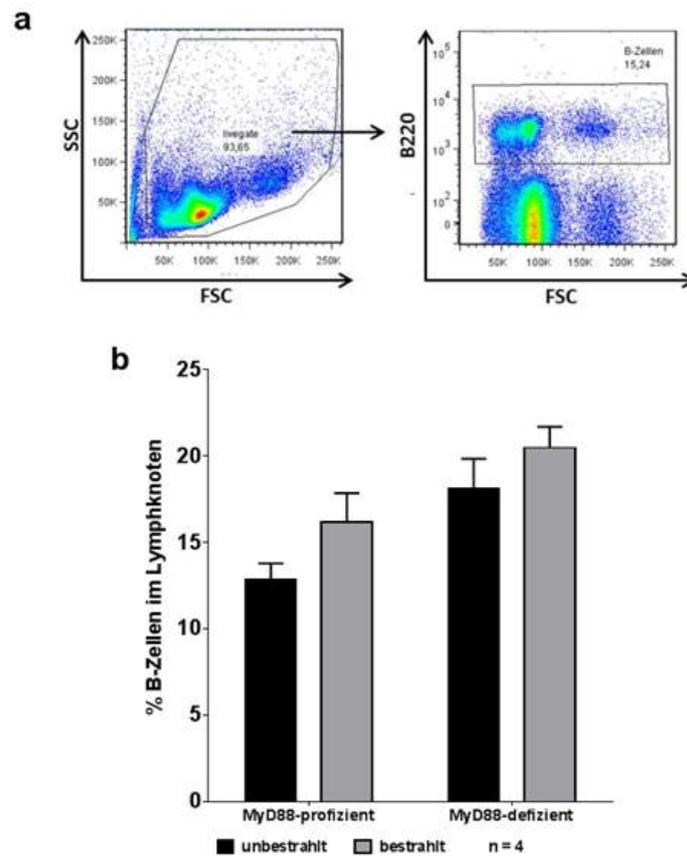


**Abbildung 32. Chronische UVB-Bestrahlung hat keinen Einfluss auf die Frequenz der verschiedenen T-Zellpopulationen im drainierenden brachialen Lymphknoten**

(a) Die Abbildung zeigt exemplarisch die *Gating-Strategie* der im FACS gemessenen T-Zellpopulationen von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. (b) Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der im drainierenden brachialen Lymphknoten befindlichen T-Zellpopulationen.

Die ermittelten Daten sind als Mittelwert mit SEM dargestellt.

Um naive B-Zellen zu aktivieren, bedarf es in der Regel eines zusätzlichen Signals von T-Helferzellen. Dies bedeutet, dass eine B-Zelle erst zur Produktion von Antikörpern aktiviert werden kann, wenn zuvor T-Helferzellen für dasselbe Antigen spezifisch aktiviert wurden. Nachfolgend wurde untersucht, ob nach chronischer UV-Bestrahlung die humorale Immunantwort aktiviert wurde. In Abb. 33a ist die *Gating-Strategie* der FACS-Analyse der B-Zellen dargestellt. Wie in Abb. 33b zu sehen, ist die Frequenz der B-Zellen in MyD88-defizienten im Vergleich zu MyD88-profizienten Mäusen im unbehandelten Zustand leicht erhöht. Auch wurde eine leichte Erhöhung der prozentualen B-Zell-Frequenzen nach chronischer UVB-Bestrahlung beobachtet.



**Abbildung 33. chronische UVB-Bestrahlung hat einen leichten Einfluss auf die Frequenz der B- Zellen im drainierenden brachialen Lymphknoten**

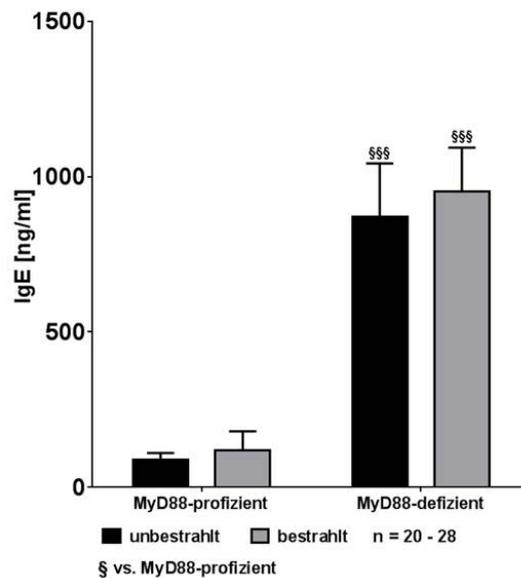
(a) Die Abbildung zeigt exemplarisch die *Gating-Strategie* der im FACS gemessenen B-Zellen von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. (b) Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der im drainierenden brachialen Lymphknoten befindlichen B-Zellen.

Die ermittelten Daten sind als Mittelwert mit SEM dargestellt.

Zusammenfassend konnte verdeutlicht werden, dass nach chronischer UVB-Bestrahlung die drainierenden brachialen Lymphknoten MyD88-abhängig vergrößert waren, welches auf eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems hindeutet. Genauere Untersuchungen der Subpopulationen von dendritischen Zellen, T- und B-Zellen zeigten keine prozentualen Veränderungen. Lediglich die B-Zellpopulation war leicht erhöht.

### 3.1.7 Humorale Immunantwort

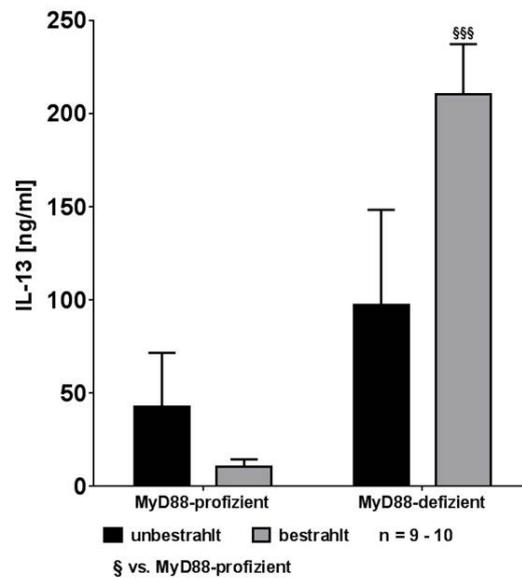
Wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, induziert die chronische UVB-Bestrahlung einen MyD88-abhängigen Anstieg der Mastzellen in der Dermis. Es ist bekannt, dass Mastzellen durch IgE-Antikörper aktiviert und sensibilisiert werden. Aus diesem Grund wurden die Seren der UVB-bestrahlten und unbestrahlten MyD88-defizienten und -profizienten Tiere per ELISA auf ihre Serum-IgE-Spiegel untersucht.



**Abbildung 34. MyD88-defiziente Mäuse haben eine signifikant höhere IgE-Konzentration im Serum**  
Die Abbildung zeigt die Konzentration an IgE-Antikörpern im Serum von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Tieren. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert mit SEM dargestellt (\*\*\*)  $p < 0,001$

Abb. 34 zeigt, dass MyD88-defiziente Mäuse im unbestrahlten Zustand eine signifikant höhere IgE-Antikörperkonzentration im Serum besitzen im Vergleich zu den MyD88-profizienten Kontrolltieren. Jedoch sind keine Unterschiede zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Gruppen zu erkennen. Dies bedeutet, dass die chronische UVB-Bestrahlung im Modell der Lichtalterung keinen Einfluss auf die IgE-Konzentration im Serum hatte.

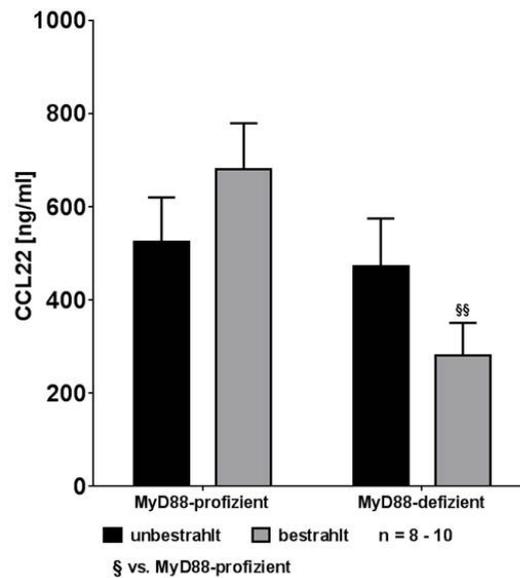
Der Isotypwechsel zu IgE ist abhängig von dem Zytokin IL-13, welches von  $T_H2$ -Zellen produziert wird. Um zu untersuchen, ob der signifikant höhere IgE-Spiegel der MyD88-defizienten Mäuse mit einer höheren Konzentration an IL-13 assoziiert ist, wurde die IL-13-Konzentration im Serum der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäuse bestimmt.



**Abbildung 35. MyD88-defiziente Mäuse zeigen eine signifikant höhere Produktion des T<sub>H</sub>2-Zytokins IL-13 nach chronischer UVB-Bestrahlung**

Die Abbildung zeigt die Konzentration des T<sub>H</sub>2-Zytokins IL-13 im Serum von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienter und -defizienter Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert mit SEM dargestellt (\*\*\*) p < 0,001)

In Abb. 35 ist dargestellt, dass die MyD88-defizienten Mäuse im unbestrahlten Zustand einen leicht erhöhten IL-13-Spiegel im Serum im Vergleich zu den MyD88-profizienten Kontrollmäusen hatten. Des Weiteren konnte eine signifikant höhere IL-13-Konzentration nach chronischer UVB-Bestrahlung bei den MyD88-defizienten Mäusen detektiert werden. Dies weist daraufhin, dass durch das Fehlen von MyD88 eine verstärkte T<sub>H</sub>2-assoziierte Immunreaktion nach chronischer UVB-Bestrahlung ausgelöst wird, welche über die Sekretion von IL-13 gezeigt wurde. Diese hat jedoch keinen Einfluss auf den IgE-Isotypenwechsel.



**Abbildung 36. MyD88-defiziente Mäuse zeigen eine signifikant geringere Produktion des Chemokins CCL22 nach chronischer UVB-Bestrahlung**

Die Abbildung zeigt die Konzentration des Chemokins CCL22 im Serum von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienter und -defizienter Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert mit SEM dargestellt (\*\* p < 0,01)

Das Chemokin CCL22 wird von DZ und Makrophagen produziert. Es ist ein chemotaktischer Lockstoff für DZ und CCR4-exprimierende T<sub>H</sub>2-Zellen. Auch ist bekannt, dass CCL22 durch T<sub>H</sub>2-vermittelte Zytokine induziert wird, so spielt es beispielsweise bei der chronisch entzündlichen Hauterkrankung atopische Dermatitis (AD) eine Rolle. AD-Patienten zeigen erhöhte IgE-Level, die mit erhöhten CCL22-Konzentrationen einhergehen.[130]. Um zu untersuchen, ob es in diesem Bestrahlungsmodell einen Zusammenhang zwischen dem erhöhten IgE-Level und dem Chemokin CCL22 gibt, wurde mittels ELISA die CCL22-Konzentration im Serum der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Tiere bestimmt. In Abb. 36 ist dargestellt, dass die Konzentration des Chemokins CCL22 nach chronischer UVB-Bestrahlung in MyD88-profizienten Mäusen leicht ansteigt, wohingegen die CCL22-Konzentration im Serum MyD88-defizienter Mäuse nach chronischer UVB-Bestrahlung im Vergleich zu den bestrahlten MyD88-profizienten Mäusen signifikant abnimmt. Dies lässt darauf schließen, dass die CCL22-Produktion in diesem Modell nicht mit einer T<sub>H</sub>2-Polarisierung in Verbindung steht. Möglicherweise wird das CCL22 von Keratinozyten gebildet, die in bestrahlten MyD88-defizienten Mäusen reduziert sind und somit auch weniger CCL22 produzieren können.

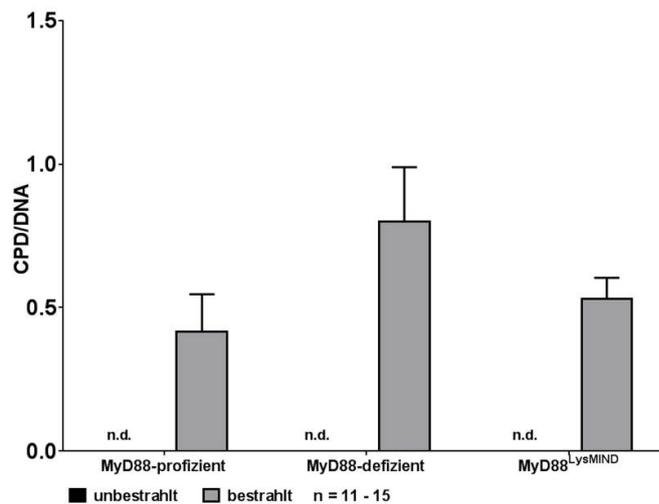
## 3.2 Zelltyp-abhängige Funktion von MyD88 im Modell der Lichtalterung

Zur Analyse der Funktion von MyD88 im Modell der Lichtalterung in einzelnen Zellpopulationen wurden Mäuse generiert, die MyD88 nur spezifisch in einzelnen Zelltypen reexprimieren. Hierfür wurden MyD88LSL-Mäuse, die eine loxP-flankierte Stop-Kassette im ersten Intron des MyD88-Gens tragen [110], mit verschiedenen Cre-Linien gekreuzt, welche die Cre-Rekombinase unter dem Promotor ausgewählter in der Haut vorhandenen Zellpopulationen exprimieren. Die Verpaarungen wurden so angesetzt, dass die Nachkommen homozygot für MyD88LSL und heterozygot für Cre wurden. Cre-negative, sowie MyD88-heterozygote (-profiziente) Wurfgeschwister dienten als Kontrollen. In diesen konditionellen knock-in-Mauslinien wird die Stop-Kassette durch die Cre-Rekombinase in den spezifischen Zellpopulationen deletiert, sodass eine Reexpression von MyD88 in einzelnen Zellpopulationen induziert wurde, während der restliche Organismus defizient für MyD88 blieb. In diesem Kapitel wird dargestellt, welche Zellpopulationen für die MyD88-abhängigen Charakteristika der Lichtalterung verantwortlich sind.

### 3.2.1 Makrophagen-spezifische Rolle von MyD88 im Modell der Lichtalterung

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort. Sie sind in den Geweben lokalisiert und können dort direkt die Einleitung einer Immunantwort induzieren. Um die spezifische Rolle von MyD88 in Makrophagen untersuchen zu können, wurden MyD88LSL-Mäuse mit LysMCre-Mäusen verkreuzt. Die Nachkommen dieser Tiere exprimieren MyD88 ausschließlich in Zellen myeloiden Ursprungs (MyD88<sup>LysMIND</sup>). Die Generierung der Linie und der Nachweis, dass in diesen Nachkommen MyD88 nur in LysM-positiven Zellen reexprimiert wird, wurde in Gais *et al.* [110] und Bald *et al.* [95] veröffentlicht.

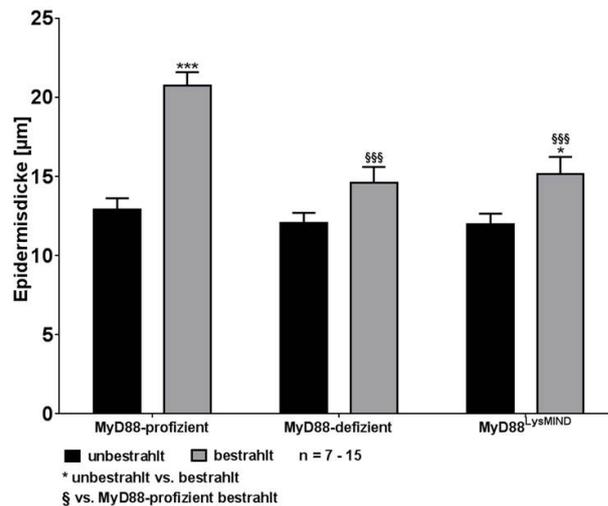
In Kapitel 3.1 ist dargestellt, dass die Induktion von UVB-induzierten CPDs in MyD88-defizienten Tieren im Modell der Lichtalterung stark erhöht war und somit die Expression von MyD88 einen Schutz gegen UVB-induzierte DNS-Schäden darstellt. Nachfolgend wurde untersucht, ob eine Expression von MyD88 in den Makrophagen den Schutz vor DNS-Schäden beeinflussen kann. Die Expression von MyD88 in den Makrophagen (MyD88<sup>LysMIND</sup>) führt zu einer Reduktion der CPD-Level (Abb. 37) auf das Niveau der MyD88-profizienten Mäuse. Dies bedeutet, dass Makrophagen MyD88-abhängig maßgeblich am Schutz vor UVB-induzierten DNS-Schäden beteiligt sind.



**Abbildung 37. Die Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen führt nach chronischer UVB- Bestrahlung zu weniger DNS-Schäden in der Haut**

Relative Menge der CPDs der *in vivo* bestrahlten Haut-DNS von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>LysMIND</sup> Mäusen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt.

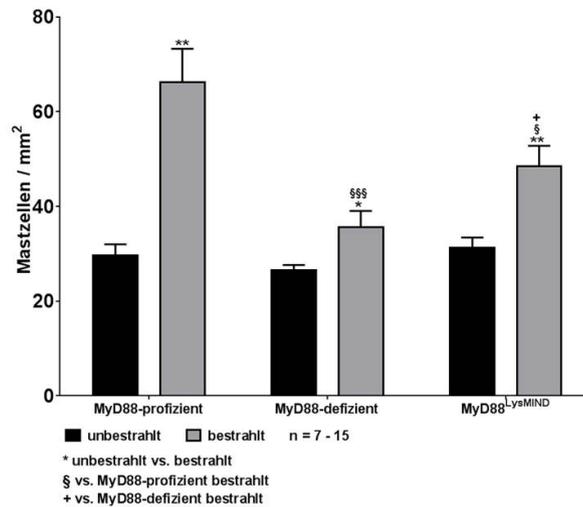
Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Verstärkung der physikalischen Barriere gegen UV-Strahlung durch die Verdickung der Epidermis, signifikant abhängig von MyD88 ist. Nachfolgend wurde untersucht, ob die alleinige Reexpression von MyD88 in Makrophagen einen Einfluss auf die Verdickung der Epidermis hat. Es zeigte sich, dass nach chronischer UVB-Bestrahlung die Epidermisverdickung bei den MyD88<sup>LysMIND</sup>-Mäusen ausblieb (Abb. 38).



**Abbildung 38. Die Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen hat keinen Einfluss auf die Epidermisdicke nach chronischer UVB-Bestrahlung**

Quantitative Auswertung der Epidermisverdickung der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>LysMIND</sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\* p < 0,05 / \*\*\* p < 0,001)

Dies ist vergleichbar mit der Epidermisdicke der MyD88-defizienten Mäuse. Im unbestrahlten Zustand zeigten alle drei Mauslinien eine vergleichbar dicke Epidermis. Somit hat die exklusive Expression von MyD88 in Makrophagen keinen Einfluss auf die Verdickung der Epidermis nach chronischer UVB-Bestrahlung.



**Abbildung 39. Die Reexpression von MyD88 in myeloiden Zellen kann teilweise die Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung wiederherstellen**

Quantitative Auswertung der Mastzellzahlen in der Dermis der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>Lys<sup>MIND</sup></sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\* p < 0,05 / \*\* p < 0,01 / \*\*\* p < 0,001)

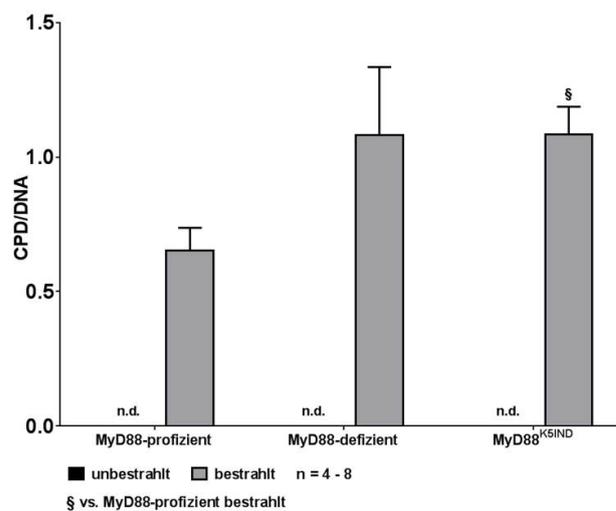
Ein stark MyD88-abhängiger Effekt nach chronischer UVB-Bestrahlung ist der Anstieg der Mastzellen in der Dermis. Es wurde untersucht, ob die Expression von MyD88 in Makrophagen einen Einfluss auf die Mastozytose hatten. In Abb. 39 ist die quantitative Auswertung der Mastzellzahlen in der Dermis von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>Lys<sup>MIND</sup></sup> Mäusen dargestellt. In der Haut unbestrahlter Mäuse konnten keine Unterschiede in der Frequenz der Mastzellen der drei Mauslinien nachgewiesen werden. Jedoch zeigt sich nach chronischer UVB-Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der Mastzellen in der Dermis bei den MyD88-profizienten Tieren. Wie schon gezeigt wurde ist dieser Effekt bei den MyD88-defizienten Mäusen nicht zu beobachten. Interessanterweise führt die Expression von MyD88 spezifisch in Makrophagen zu einer partiellen Wiederherstellung des Phänotyps der MyD88-profizienten Mäuse. Um zu ermitteln, ob auch andere Zelltypen an der Mastozytose beteiligt sind, wurden nachfolgend auch andere MyD88<sup>IND</sup>-Linien untersucht.

Zusammenfassend konnte dargelegt werden, dass die Expression von MyD88 exklusiv in Makrophagen keinen Einfluss auf die UVB-induzierte Verdickung der Epidermis hat, aber die Akkumulation von Mastzellen in der Dermis partiell wiederherstellt. Dies lässt darauf schließen, dass Makrophagen an der Proliferation oder Rekrutierung von Mastzellen nach UVB-Bestrahlung involviert zu sein scheinen. Des Weiteren lässt sich in den MyD88<sup>Lys<sup>MIND</sup></sup>-Mäusen der Schutz

vor der Formation von CPDs auf das gleiche Level wie in den MyD88-profizienten Mäusen wiederherstellen.

#### 3.2.2 Keratinozyten-spezifische Rolle von MyD88 im Modell der Lichtalterung

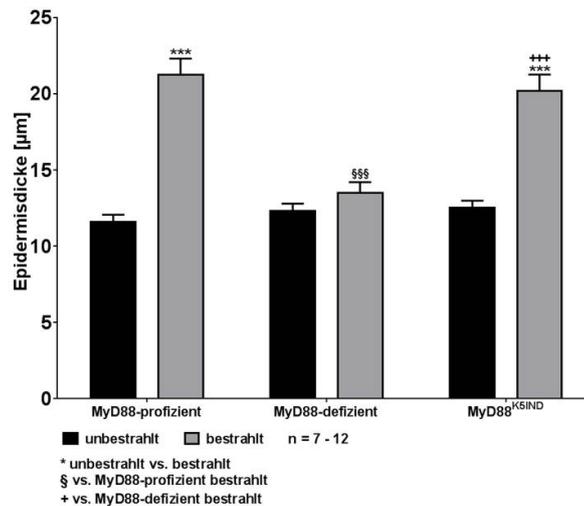
Die Epidermis besteht zu einem großen Teil aus Keratinozyten. Diese bilden ein Netzwerk mit den  $\gamma\delta$ T-Zellen und LZ und geben der Epidermis ihre Struktur und Festigkeit. Sie können jedoch auch immunologische Funktionen übernehmen. Nach Verletzung sezernieren sie Zytokine, um andere Immunzellen zu aktivieren und/oder sie proliferieren und differenzieren weiter, um die Hautbarriere aufrecht zu erhalten. Wie in Kapitel 3.1 nachgewiesen wurde, hat die chronische UVB-Bestrahlung einen Einfluss auf die Epidermisverdickung. Um im Detail untersuchen zu können, welche Rolle die Keratinozyten bei den MyD88-abhängigen UVB-induzierten Symptomen spielen, wurden MyD88LSL-Mäuse mit K5Cre-Mäusen so verpaart, dass die Nachkommen homozygot für MyD88LSL waren und heterozygot für K5Cre. Dieser Genotyp führt zu einer spezifischen Reexpression von MyD88 exklusiv in den epidermalen Keratinozyten. Die spezifische Expression von MyD88 in Keratinozyten wurde in [127] bereits nachgewiesen.



**Abbildung 40. Die Reexpression von MyD88 in Keratinozyten hat keinen Einfluss auf die CPD- Formation nach chronischer UVB-Bestrahlung**

Relative Menge der CPDs der *in vivo* bestrahlten Haut-DNS von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>K5IND</sup> Mäusen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt. (\* p < 0,05)

Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass das Fehlen von MyD88 zu einer Akkumulation von CPDs und damit zu mehr DNS-Schäden in der *in vivo* bestrahlten Maushaut führt, wurde die spezifische Rolle von MyD88 in Keratinozyten auf die Formation von CPDs untersucht. Wie in Abb. 40 dargestellt, war nach chronischer UVB-Bestrahlung die relative Menge der CPDs bezogen auf die Gesamt-DNS der MyD88<sup>K5IND</sup> im Vergleich zu den MyD88-profizienten Mäusen signifikant erhöht. Weiterhin war die Menge der durch UVB-Strahlen entstandenen DNS-Schäden der MyD88<sup>K5IND</sup>-Mäusen vergleichbar mit der Menge der DNS-Schäden der MyD88-defizienten Mäuse. Dies bedeutet, dass die Expression von MyD88 in Keratinozyten selbst nicht vor der Entstehung von CPDs schützt.



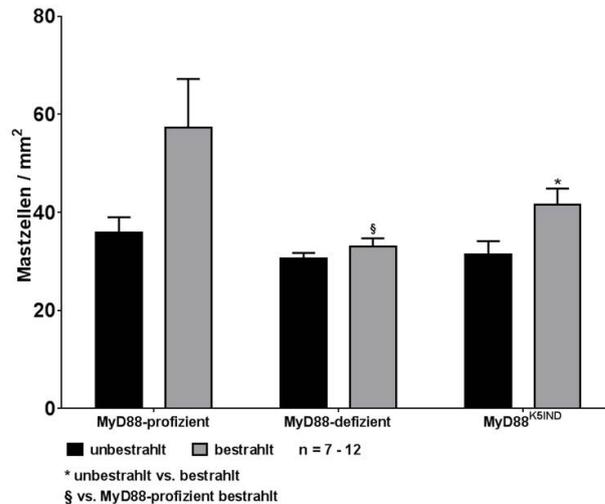
**Abbildung 41. Die Reexpression von MyD88 in Keratinozyten stellt die Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung wieder her**

Quantitative Auswertung der Epidermisverdickung der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>K5IND</sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\*\*)  $p < 0,001$ )

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung signifikant abhängig von MyD88 war. Es wurde untersucht, ob intrinsische MyD88-abhängige Signalwege in Keratinozyten für den Befund der Epidermisverdickung verantwortlich waren. Interessanterweise führte die Expression von MyD88 spezifisch in Keratinozyten zu einer vollständigen Wiederherstellung der Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung (Abb. 41).

Weiterführend wurde untersucht, ob die Keratinozyten den MyD88-abhängigen Anstieg der Mastzellen in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung beeinflussen, da chronische UVB-Bestrahlung im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrolltieren, zu einem signifikanten Anstieg der Mastzellen in der Dermis der MyD88-profizienter Tiere führte (Kapitel 3.1). In Abb. 42 ist der Einfluss der Keratinozyten auf die Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung dargestellt. Exklusive MyD88-induzierte Signaltransduktion in Keratinozyten ver-

änderte die Mastzellzahlen nicht, sodass sich folgern lässt, dass MyD88 in Keratinozyten die Rekrutierung der Mastzellen nicht beeinflusst.



**Abbildung 42. Die Reexpression von MyD88 in Keratinozyten hat einen geringen Einfluss auf die Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung**

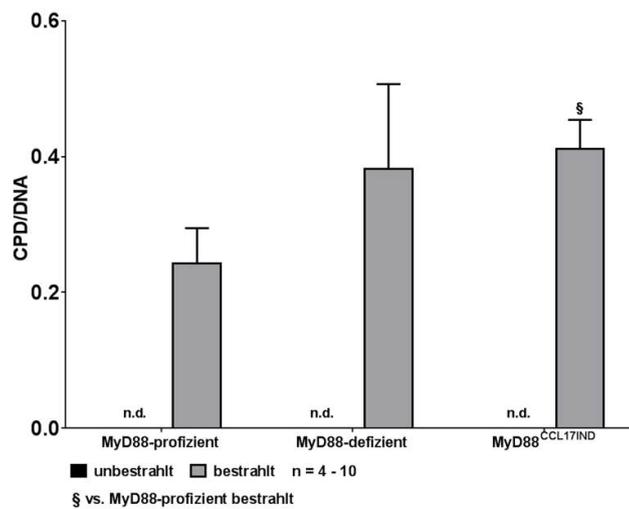
Quantitative Auswertung der Mastzellzahlen in der Dermis der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>K5IND</sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt (\*  $p < 0,05$ )

Zusammenfassend konnte verdeutlicht werden, dass die exklusive Reexpression von MyD88 spezifisch in den Keratinozyten interessanterweise einen Zell-intrinsischen Einfluss auf die Verdickung der Epidermis und damit auf Proliferation der Keratinozyten hat, währenddessen ein Effekt auf die DNS-Schäden und auf die Anzahl der Mastzellen in der Dermis, ausblieb.

#### 3.2.3 Spezifische Rolle von MyD88 in dendritischen Zellen im Modell der Lichtalterung

Dendritische Zellen spielen eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem. Sie fungieren als Wächter in Barriereorganen. LZ sind epidermale DZ, die Antigene erkennen, phagozytieren und diese im drainierenden Lymphknoten den T-Zellen präsentieren, um das erworbene Immunsystem zu aktivieren. Nachfolgend wurde die Rolle von MyD88 spezifisch in DZ analysiert. Hierfür wurden MyD88LSL- mit CCL17Cre-Mäusen so verpaart, dass die Nachkommen homozygot für MyD88LSL und heterozygot für CCL17Cre waren. Diese Nachkommen besitzen eine spezifische Expression von MyD88 in den peripheren CCL17<sup>+</sup>-DZ, beispielsweise LZ und dermale DZ.

Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die CPD-Formation unter der Abwesenheit von MyD88 erhöht war und die MyD88-abhängige Signaltransduktion in Keratinozyten keinen Einfluss hatte, wurde untersucht, ob durch die Reexpression von MyD88 exklusiv in DZ die Akkumulation von DNS-Schäden auf das Level der MyD88-profizienten Mäuse reduziert werden kann.

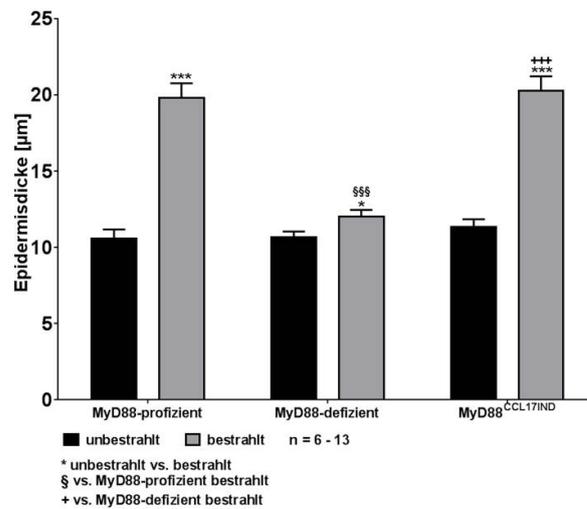


**Abbildung 43. Die Reexpression von MyD88 in Dendritischen Zellen hat keinen Einfluss auf die CPD-Formation nach chronischer UVB-Bestrahlung**

Relative Menge der CPDs der *in vivo* bestrahlten Haut-DNS von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>CCL17IND</sup> Mäusen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. (\* p < 0,05)

In Abb. 43 sind die CPD-Level von MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>CCL17IND</sup> unbestrahlten und bestrahlten Mäusen dargestellt. In den unbestrahlten Kontrollmäusen konnten keine Bildung von CPDs detektiert werden. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von MyD88 in DZ, wie auch vorher beobachtet in Keratinozyten, nicht vor DNS-Schäden schützen konnte. Da MyD88-abhängige Signalwege weder in Keratinozyten noch in LZ vor UVB-induzierter CPD-Bildung schützen konnte, ist es wahrscheinlich, dass MyD88-abhängige Signalwege in Zellen der Dermis dafür verantwortlich sind.

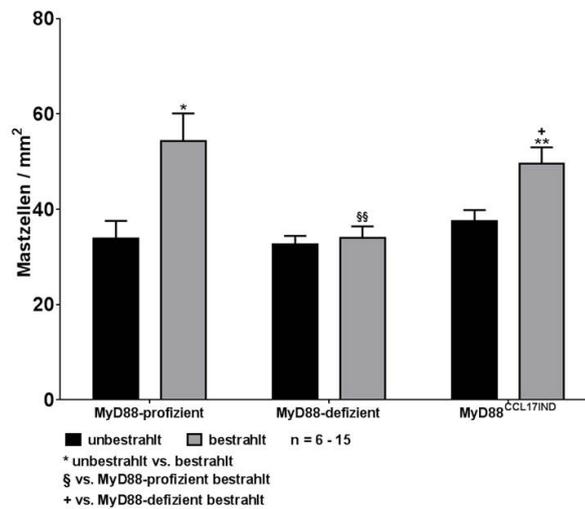
Die DZ der Epidermis, auch LZ genannt, sind ein essenzieller Bestandteil und bilden mit den Keratinozyten ein Netzwerk. Da schon gezeigt werden konnte, dass die Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung signifikant MyD88-abhängig ist, war es interessant zu untersuchen, ob MyD88-abhängige Signalwege in DZ für die Verdickung der Epidermis relevant sind. Die Reexpression von MyD88 in DZ stellte wieder vollständig den Phänotyp der UVB-induzierten Epidermisverdickung der MyD88-profizienten Mäuse her (Abb. 44). Interessanterweise bedeutet dies, dass MyD88-abhängige Signalwege in LZ wie auch in Keratinozyten zu einer Proliferation von Keratinozyten führt.



**Abbildung 44. Die Reexpression von MyD88 in dendritischen Zellen stellt die Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung wieder her**

Quantitative Auswertung der Epidermisverdickung der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>CCL17IND</sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert mit SEM dargestellt (\* p < 0,05 / \*\*\* p < 0,001)

Auch für diese Mauslinie wurde untersucht, ob die Mastozytose durch chronische UVB-Bestrahlung von MyD88-abhängigen Signalwegen in CCL17<sup>+</sup> DZ beeinflusst wird. In den bestrahlten MyD88<sup>CCL17IND</sup>-Mäuse konnten im Vergleich zu den bestrahlten MyD88-defizienten Mäusen signifikant mehr Mastzellen in der Dermis detektiert werden (Abb. 45), diese aber deutlich geringer als in bestrahlten MyD88-profizienten Mäusen waren. Dieser partielle Effekt der Mastzellakkumulation war vergleichbar mit dem der MyD88<sup>LysMIND</sup>-Mäuse, sodass MyD88-abhängige Signalwege in Makrophagen und DZ partiell zur Mastozytose beitragen.



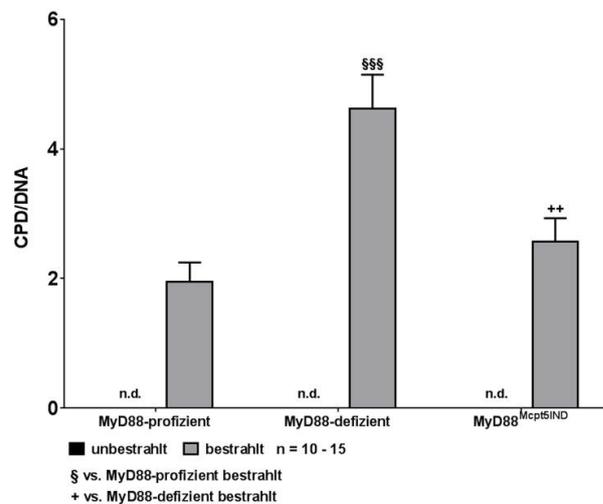
**Abbildung 45. Die Reexpression von MyD88 in dendritischen Zellen kann teilweise die Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung wiederherstellen**

Quantitative Auswertung der Mastzellzahlen in der Dermis der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>CCL17IND</sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ )

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt verdeutlicht werden, dass die Signaltransduktion durch MyD88 in DZ im Modell der Lichtalterung nicht vor der Bildung von CPDs schützt. Im Gegensatz dazu greift sie in Signalwege ein, die die Verdickung der Epidermis vollständig und die Akkumulation von Mastzellen partiell wiederherstellen.

#### 3.2.4 Mastzell-spezifische Rolle von MyD88 im Modell der Lichtalterung

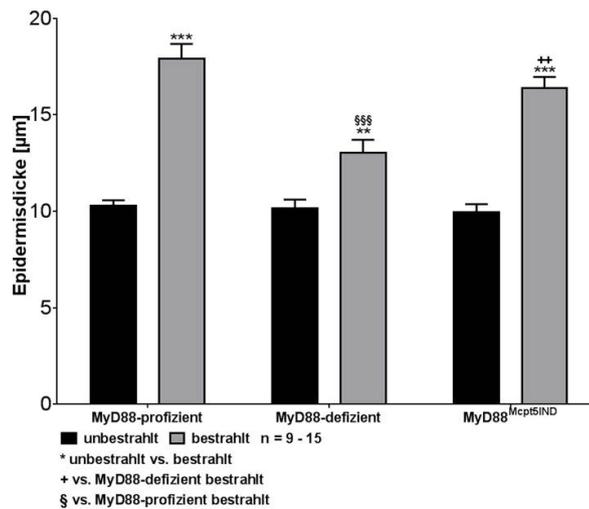
Der Anstieg der Mastzellzahl in der Dermis (Mastozytose) ist ein bekanntes Charakteristikum lichtgealterter Haut. Die genauen Mechanismen, die zu der erhöhten Zellzahl führen sind aber nicht bekannt. Auch hat die spezifische Expression von MyD88 in Makrophagen, Keratinozyten und DZ keinen oder nur geringfügigen Einfluss auf die Ausbildung der Mastozytose. Um herauszufinden, ob die MyD88-Signaltransduktion in Mastzellen selbst eine Rolle spielt, wurden die MyD88-abhängigen Signalwege in Mastzellen analysiert, indem MyD88<sup>LSL</sup>- mit Mcpt5Cre-Mäusen gekreuzt wurden.



**Abbildung 46. Die Reexpression von MyD88 in Mastzellen führt nach chronischer UVB- Bestrahlung zu weniger DNS-Schäden in der Haut**

Relative Menge der CPDs der *in vivo* bestrahlten Haut-DNA von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>M<sub>cpt5</sub>IND</sup> Mäusen. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt. (\*\* p < 0,01 / \*\*\* p < 0,001)

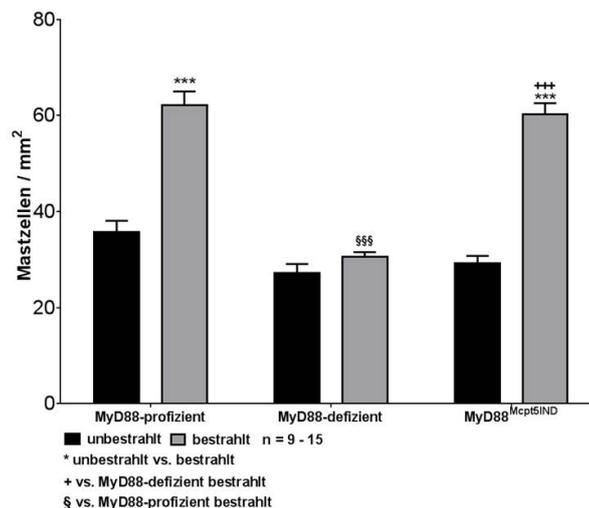
Um zu überprüfen, ob die Expression von MyD88 in den Mastzellen zum Schutz vor DNS-Schäden beteiligt ist, wurde die relative Menge der UVB-induzierten CPD-Bildung in bestrahlten MyD88<sup>M<sub>cpt5</sub>IND</sup>-Mäusen im Vergleich zu den MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen bestimmt. In Abb. 46 ist zu sehen, dass das Level der CPD-Formationen in den MyD88<sup>M<sub>cpt5</sub>IND</sup> auf das verringerte Level der MyD88-profizienten Mäuse reduziert ist. Somit reduziert die MyD88-induzierte Signaltransduktion in Mastzellen den DNS-Schaden in der gesamten Haut fast auf das Ausgangsniveau der MyD88-profizienten Tiere.



**Abbildung 47. Die Reexpression von MyD88 in Mastzellen stellt die Epidermisverdickung nach chronischer UVB-Bestrahlung wieder her**

Quantitative Auswertung der Epidermisverdickung der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>Mcpt5<sup>IND</sup></sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\* p < 0,01 / \*\*\* p < 0,001)

Nun wurde untersucht, ob MyD88-abhängige Signalwege in Mastzellen die Verdickung der Epidermis, welche als Schutzbarriere dient, nach chronischer UVB-Bestrahlung signifikant MyD88-abhängig verdickt war. Es wurde untersucht, ob die Reexpression von MyD88 ausschließlich in den Mastzellen die Verdickung der Epidermis gegen UVB-Strahlen wiederherstellen kann. Die exklusive Expression von MyD88 in Mastzellen konnte den Phänotyp der Epidermisverdickung der MyD88-profizienten Mäuse größtenteils wiederherstellen (Abb. 47).



**Abbildung 48. Die Reexpression von MyD88 in Mastzellen führt zur vollständigen Wiederherstellung der Mastzellanzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung**

Quantitative Auswertung der Mastzellzahlen in der Dermis der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten und MyD88<sup>Mcpt5<sup>IND</sup></sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\*\*) p < 0,001)

### 3.2 Zelltyp-abhängige Funktion von MyD88 im Modell der Lichtalterung

Dies bedeutet, dass auch neben Keratinozyten und DZ MyD88-abhängige Signaltransduktion vor allem in Mastzellen einen Einfluss auf die Verdickung der Epidermis haben.

Die Untersuchungen der Mastzellanzahl ergab, dass die Expression von MyD88 allein in den Mastzellen ausreicht, um die Mastzellzahl in der Dermis nach chronischer UVB-Bestrahlung ansteigen zu lassen. Die Mastzellzahlen der MyD88<sup>Mcpt5IND</sup>-Mäuse waren auf dem gleichen Level wie die der MyD88-profizienten Mäuse nach chronischer UVB-Bestrahlung (Abb. 48). Da die Reexpression von MyD88 in Keratinozyten keinen und in Makrophagen und DZ nur einen geringen Einfluss auf die Mastzellzahl nach chronischer UVB-Bestrahlung hatte, kann hier davon ausgegangen werden, dass der Effekt ein größtenteils ein Mastzell-intrinsischer Effekt ist.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Mastzellen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Modell der Lichtalterung spielen. Die Reexpression von MyD88 exklusiv in den Mastzellen schützte die Haut vor vermehrten UVB-induzierten DNS-Schäden, so wie diese in komplett MyD88-defizienten Mäusen beobachtet wurde. Auch konnte durch die Expression von MyD88 ausschließlich in den Mastzellen die MyD88-abhängige Schutzbarriere der Epidermis fast vollständig wiederhergestellt werden. Darüber hinaus führte die exklusive Reexpression von MyD88 in den Mastzellen zur vollständigen Wiederherstellung der Mastzellanzahl in der Dermis.

**Tabelle 15.** UVB-abhängiger Einfluss von MyD88-abhängigen Signalwegen in Makrophagen (MyD88<sup>LysMIND</sup>), Keratinozyten (MyD88<sup>K5IND</sup>), DZ (MyD88<sup>CCL17IND</sup>) und Mastzellen (MyD88<sup>Mcpt5IND</sup>) auf den Schutz vor CPD-Bildung, die Verdickung der Epidermis und die Induktion der Mastozytose

	MyD88 <sup>LysMIND</sup>	MyD88 <sup>K5IND</sup>	MyD88 <sup>CCL17IND</sup>	MyD88 <sup>Mcpt5IND</sup>
Schutz vor CPD-Bildung	ja	nein	nein	partiell
Verdickung der Epidermis	nein	ja	ja	ja
Induktion der Mastozytose	partiell	nein	partiell	ja

Abschließend zeigen diese Daten, dass die Effekte der Lichtalterung durch komplexe Wechselwirkungen verschiedener Zelltypen bedingt werden und zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems führen. Eine Zusammenfassung dieser ist in Tab. 15 dargestellt. Aus dieser ist ersichtlich, dass der Schutz vor Bildung von CPDs durch MyD88-abhängige Signalwege in Makrophagen gegeben wird, wohingegen in Mastzellen dieser Schutz nur partiell und in Keratinozyten und DZ nicht gegeben ist. Gegensätzlich hierzu verhält sich die MyD88-abhängige Signaltransduktion bei der Verdickung der Epidermis. Hier zeigte sich, dass diese in Makrophagen keinen Einfluss auf die Epidermisverdickung hatte, aber diese in Keratinozyten, DZ und Mastzellen zur kompletten Wiederherstellung der Verdickung der Epidermis beitrugen. Im Unterschied dazu wurde verdeutlicht, dass MyD88-abhängige Signalwege nur in Mastzellen zu

einer vollständigen Induktion der Mastozytose führte. Die Expression in Makrophagen und DZ konnte die Mastozytose partiell wiederherstellen. Dahingegen konnte kein Einfluss spezifisch in Keratinozyten beobachtet werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der Einfluss von MyD88-abhängigen Signalwegen vom Zelltyp abhängig auf die Befunde im Modell der Lichtalterung wirken.

### 3.3 Die Rolle von MyD88 im Modell der Photokarzinogenese

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von MyD88 zu einer vermehrten Formation der UVB-induzierten DNS-Schäden (CPDs) führt. DNS-Schäden und die Suppression des Immunsystems führen zu der Entwicklung von Hauttumoren, wie dem Basalzell- und Plattenepithelkarzinom in der Haut bei. Basierend auf diesen Kenntnissen ist es interessant den Einfluss des angeborenen Immunsystems auf die UV-induzierte Tumorentstehung in der Haut zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde die MyD88-abhängige Entwicklung der UVB-induzierten Photokarzinogenese untersucht.

#### 3.3.1 Etablierung des Photokarzinogenese-Modells

Die alleinige chronische Exposition mit UVB-Strahlung führt im Mausmodell zu nicht-melanomen Tumoren in der Haut. Diese entstehen aus entarteten Zellen in der Epidermis und werden als Plattenepithel- oder Basalzellkarzinome bezeichnet.

Zur Induktion von UVB-induzierten Hauttumoren existiert in der Literatur kein einheitliches Modell. Erschwerend kommt hinzu, dass die Mehrheit der Photokarzinogenese-Versuche mit Mäusen durchgeführt werden, die einen anderen genetischen Hintergrund besitzen. Oft werden für dieses Modell haarlose Nacktmäuse (*hairless mice*) oder BALB/c Mäuse benutzt, die durch ihre helle Hautfarbe sensitiver auf UV-Strahlung reagieren. Da die in dieser Arbeit verwendeten MyD88LSL-Mäuse auf dem C57BL/6-Hintergrund gezüchtet wurden, wurde in einem Vorversuch getestet, in welchem Zeitraum in diesen Mäusen UVB-induzierte Hauttumore auftreten. Hierfür wurden die Mäuse dreimal in der Woche mit einer ansteigenden Dosis an UVB-Strahlen exponiert, die jedoch höher war wie für die Induktion der Lichtalterung. Die langsam gesteigerte Dosis sollte die Bildung von Erythemen verhindern, die zu starken Entzündungsreaktionen in der Haut führen. Die Mäuse wurden mit der folgenden Dosis an UVB-Strahlen exponiert:

Woche 1: 100 mJ/cm<sup>2</sup>

Woche 2: 125 mJ/cm<sup>2</sup>

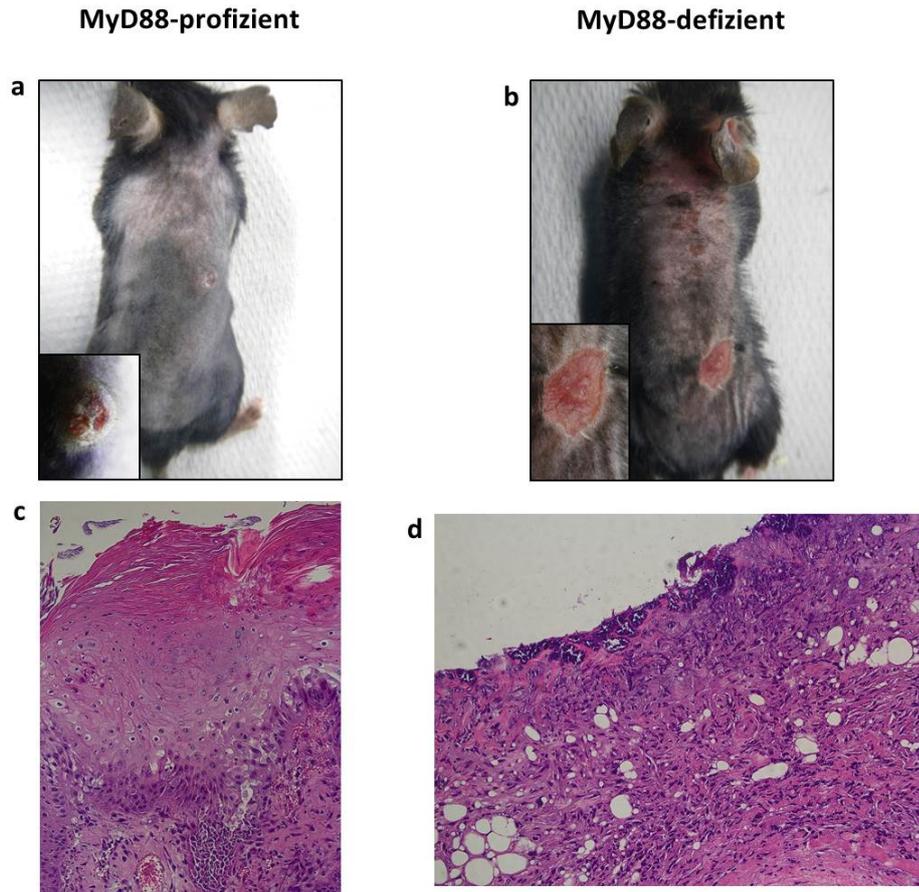
Woche 3-6: 150 mJ/cm<sup>2</sup>

Woche 7-22: 300 mJ/cm<sup>2</sup>

Woche 23: 400 mJ/cm<sup>2</sup>

Woche 24-25: 450 mJ/cm<sup>2</sup>

Es wurden MyD88-profiziente und -defiziente Mäuse bestrahlt, als auch Mäuse, die MyD88 exklusiv in Makrophagen (MyD88<sup>LysMIND</sup>) oder Keratinozyten (MyD88<sup>K5IND</sup>) exprimieren. Am Ende der 25 Wochen mit ansteigender UVB-Bestrahlung konnten tumorartige Veränderungen der Rückenhaut bei den Mäusen beobachtet werden. Diese waren makroskopisch mit dem bloßen Auge zu erkennen (Abb. 49). Es wurden zwei verschiedenartige Tumortypen beobachtet. Die Mäuse entwickelten Plattenepithelkarzinome (Abb. 49a) und Basalzellkarzinome (Abb. 49b).

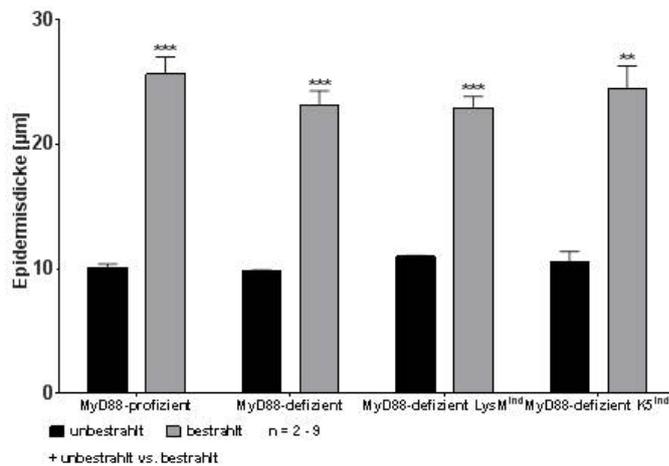


**Abbildung 49. UVB- induzierte Tumorbildung im Vorversuch zur Photokarzinogenese**

Im Vorversuch zur UVB-induzierten Photokarzinogenese bildeten die Mäuse nach 25 Wochen nach UVB-Bestrahlung (a) Plattenepithelkarzinome und (b) Basalzellkarzinome. Das Auftreten von Hauttumoren wurden mittels H&E-Färbung bestätigt. Repräsentative Bilder der H&E-Färbung sind in (c) und (d) dargestellt. 200x Vergrößerung

Wie in Abb. 49a zu sehen, zeichnen sich Plattenepithelkarzinome durch eine warzenartige Erscheinung mit Verhornungen aus. Diese Tumore entstehen aus entarteten Zellen der Stachelzellschicht (*Stratum Spinosum*). Im Gegensatz dazu ist das Erscheinungsbild von Basalzellkarzinomen flach und narbenartig mit einem Randsaum (Abb. 49b). Basalzellkarzinome werden aus entarteten Zellen der Basalschicht (*Stratum Basale*) gebildet, den basalen Keratinozyten. Histologische H&E-Färbungen der betroffenen Hautareale bestätigten, dass es sich um verändertes Tumorgewebe handelte (Abb. 49 c und d). Diese Ergebnisse zeigen, dass mit einer erhöhten Exposition an UVB-Strahlung, in den hier verwendeten Mäuse die Entwicklung von Hauttumoren induziert werden konnte.

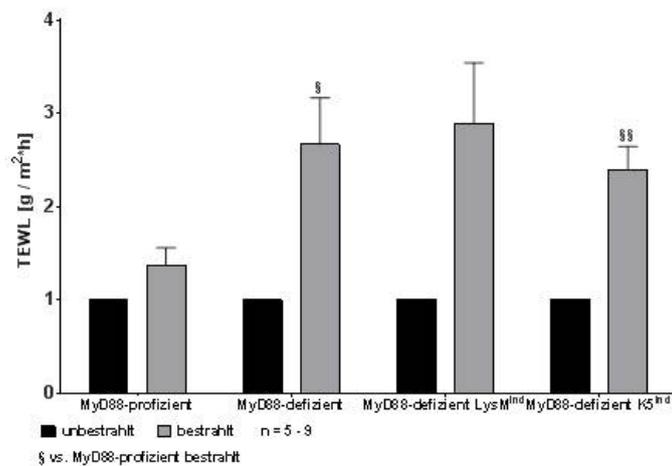
Auch wurde die Verdickung der Epidermis in diesem Vorversuch quantifiziert (Abb. 50). Es zeigte sich, dass in allen bestrahlten Versuchsgruppen im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollmäusen die Epidermis signifikant verdickt war. Jedoch konnten im Gegensatz zu dem Modell der Lichtalterung keine Genotyp-abhängigen und somit keine MyD88-abhängigen Unterschiede gefunden werden.



**Abbildung 50. Genotypen-unabhängige signifikante Epidermisverdickung im Vorversuch zur Photokarzinogenese**

Quantitative Auswertung der Epidermisverdickung der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten, -defizienten LysM<sup>ind</sup> und -defizienten K5<sup>ind</sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\* p < 0,01 / \*\*\* p < 0,001)

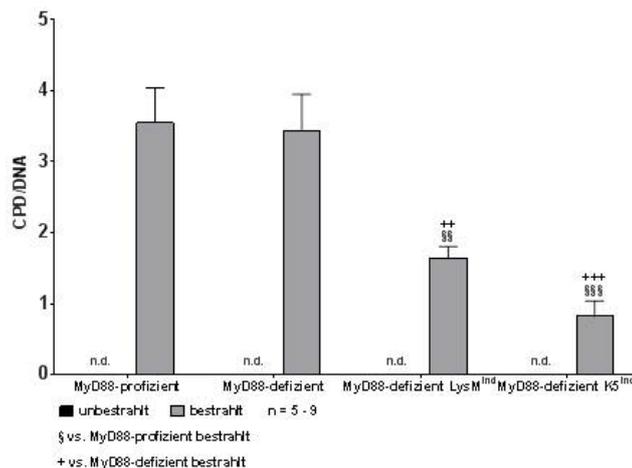
Interessanterweise konnte ein MyD88-abhängiger Effekt bei der Barrierestörung festgestellt werden (Abb. 51). Die Schädigung der Barriere wurde mittels einer TEWL-Sonde bestimmt, die den transepidermalen Wasserverlust misst. Je geschädigter die Barriere ist, desto höher ist der gemessene TEWL-Wert. Die bestrahlten MyD88-defizienten Mäuse wiesen einen signifikanten höheren TEWL-Wert im Vergleich zu den bestrahlten MyD88-profizienten Mäusen auf (Abb. 51). Dieser erhöhte TEWL-Wert lässt auf eine geschädigtere Hautbarriere in den MyD88-defizienten Mäusen schließen. Interessanterweise hatte die Reexpression von MyD88 exklusiv in Makrophagen oder Keratinozyten keine protektive Wirkung auf die Schädigung der Hautbarriere durch UVB-Strahlung.



**Abbildung 51. MyD88-unabhängige Barriesterörung im Vorversuch zur Photokarzinogenese**

Die Messwerte zeigen den transepidermalen Wasserverlust (TEWL) der unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten, -defizienten LysM<sup>ind</sup> und -defizienten K5<sup>ind</sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\* p < 0,05 / \*\* p < 0,01)

Nachfolgend wurden die DNS-Schäden in der Haut bestimmt. MyD88-profiziente und -defiziente bestrahlte Mäuse zeigten keine Unterschiede bei den CPD-Levels (Abb. 52). Diese Ergebnisse könnten mit der gleichen Epidermisverdickung in Zusammenhang stehen. Interessanterweise wurden signifikante Reduktionen in den CPD-Level detektiert, wenn MyD88 in Makrophagen oder Keratinozyten reexprimiert wird. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da die globale Abwesenheit von MyD88 keinen Unterschied zu den MyD88-profizienten Kontrollmäusen aufweist.



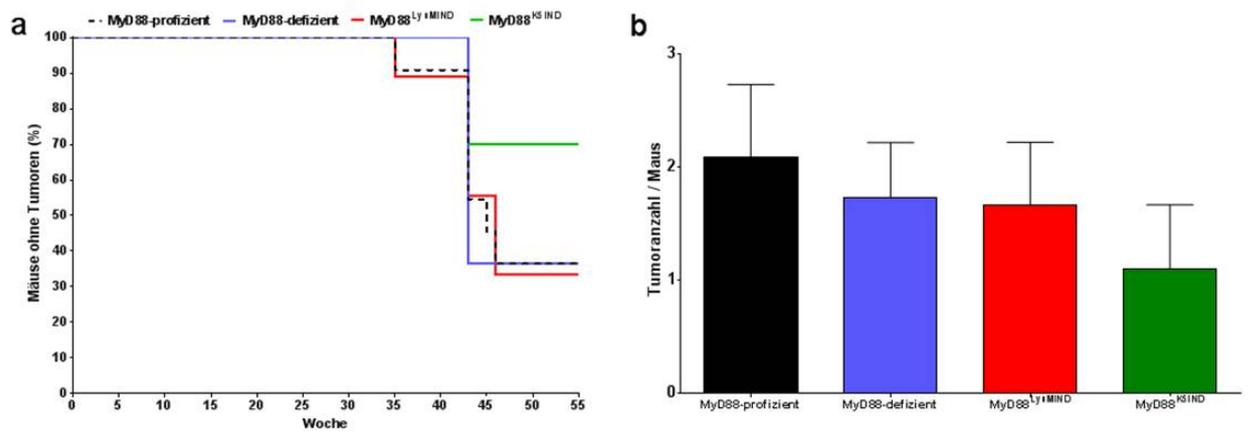
**Abbildung 52. MyD88-unabhängige CPD-Formation im Vorversuch zur Photokarzinogenese**

Relative Menge der CPDs der bestrahlten Haut-DNS von unbestrahlten und bestrahlten MyD88-profizienten, -defizienten, -defizienten LysM<sup>ind</sup> und -defizienten K5<sup>ind</sup> Mäuse. Die ermittelten Daten sind als Mittelwert+SEM dargestellt (\*\* p < 0,01 / \*\*\* p < 0,001)

Zusammenfassend konnte mit dem Vorversuch zur UVB-induzierten Entwicklung der Photokarzinogenese gezeigt werden, dass nach 25 Wochen die bestrahlten Mäuse Plattenepithel- und Basalzellkarzinome entwickeln. Auch zeigte sich eine signifikante Verdickung der Epidermis, sowie eine erhöhte Bildung von CPDs, die aber beide unabhängig von MyD88 waren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das Fehlen von MyD88 zu einer geschädigteren Hautbarriere führte. Auch hatte die Reexpression von MyD88 in Makrophagen oder Keratinozyten keinen Einfluss auf diese beiden Ergebnisse. Interessanterweise konnte die Bildung von DNS-Schäden nur reduziert werden, wenn MyD88 exklusiv in Makrophagen oder Keratinozyten reexprimiert wurde.

#### 3.3.2 Der Einfluss von MyD88 auf die Tumorbildung

In Abschnitt 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass durch eine Exposition der Mäuse mit einer hohen Dosis an UVB-Strahlung Tumoren in der Haut induziert werden konnten. Die Bildung der Tumoren setzte ab der 24. Woche im Vorversuch ein. Daraufhin wurde die MyD88-abhängige Tumorbildung der Mäuse über 55 Wochen in einem zweiten Experiment untersucht. Hier wurden die Mäuse über 55 Wochen mit einer ansteigenden UVB-Dosis bestrahlt. Während dieser Zeit wurden die Anzahl der Tumore von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen, sowie von Mäusen, die MyD88 exklusiv nur in Makrophagen ( $\text{MyD88}^{\text{LysMIND}}$ ) oder Keratinozyten ( $\text{MyD88}^{\text{K5IND}}$ ) exprimieren, wöchentlich dokumentiert. Die tumorfreien Mäuse (in %) sind in Abb. 53a dargestellt. Es zeigte sich, dass am Ende der 55 Wochen von den MyD88-profizienten, -defizienten und  $\text{MyD88}^{\text{LysMIND}}$ -Mäusen 35 % der Mäuse keine Tumoren gebildet hatten. Interessanterweise zeigten 70 % der  $\text{MyD88}^{\text{K5IND}}$ -Mäuse keine Tumorentwicklung. Auch konnte ein MyD88-abhängiger Effekt im Zeitpunkt der ersten Tumorbildungen erkannt werden. Hier bildeten sich erst in der 43. Woche bei den MyD88-defizienten Mäusen die ersten Tumoren im Gegensatz zu den MyD88-profizienten Mäusen, die die ersten Tumoren schon nach 35 Wochen aufwiesen.



**Abbildung 53. Die Expression von MyD88 in Keratinozyten führt zu einer geringeren Tumorbildung im Modell der Photokarzinogenese**

(a) Prozentualer Anteil der MyD88-profizienten, -defizienten, MyD88<sup>LysMIND</sup> und MyD88<sup>K5IND</sup> Mäuse, die zu bestimmten Zeitpunkten keine Tumoren gebildet haben. (b) Gesamtanzahl der Tumoren pro Maus der MyD88-profizienten, -defizienten, MyD88<sup>LysMIND</sup> und MyD88<sup>K5IND</sup> Mäuse

Diese Tendenzen spiegeln sich auch in der Tumoranzahl pro Maus wider (Abb. 53b). Hier zeigt sich, dass die MyD88-profizienten Mäuse in der Tendenz höhere Tumorzahlen pro Maus aufwiesen, im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. Auch zeigten die MyD88<sup>K5IND</sup> eine deutlich geringere Gesamtzahl an Tumoren pro Maus.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von MyD88 zu einer früheren Tumorbildung führen kann. Auch führte die Expression von MyD88induzierten Signalwegen zu einer leicht erhöhten Tumoranzahl. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein funktionstüchtiges Immunsystem die Tumorentstehung begünstigt. Jedoch zeigte die Reexpression von MyD88 exklusiv in den Keratinozyten eine protektive Wirkung auf die Tumorentstehung. Somit könnten Keratinozyten eine protektive Rolle bei der UV-induzierten Immunsuppression spielen.

---

## 4 Diskussion

In den letzten Jahrzehnten wird der Lichtalterung eine immer größer werdende humanmedizinische Relevanz beigemessen. Vor allem Personen, die ihren Arbeitsplatz im Freien haben, bilden mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Symptome der Lichtalterung aus. Auch begann in den 1950er Jahren der Trend zu langen, intensiven Sonnenbädern. Chronische Exposition gegenüber UV-Strahlung führt zu einer vorzeitigen UV-induzierten Hautalterung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Haut von jüngeren Individuen bereits Alterungszeichen aufweist. Diese äußern sich durch vorzeitige Faltenbildung, eine lederartige Hautstruktur und können durch die Akkumulation von DNS-Schäden zu der Bildung von Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen, sowie zu Melanomen in den Hautregionen, die der UV-Strahlung ausgesetzt wurden, führen.

Da bereits bekannt ist, dass UVB-Strahlung Entzündungsreaktionen in der Haut hervorrufen kann, die durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems vermittelt werden, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das angeborene Immunsystem zur UVB-induzierten Hautalterung beiträgt. MyD88 ist das zentrale Adapterprotein der TLR- und IL-1-vermittelten Signalwege des angeborenen Immunsystems. Um deren Einfluss untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit für die Analyse der Lichtalterung und Phozokarzinogenese MyD88-defiziente Mäuse verwendet. Das spezielle genetische Mausmodell erlaubte es weiterhin, die Zelltyp-spezifische Rolle von MyD88 in Makrophagen, dendritischen Zellen, Keratinozyten und Mastzellen weiterführend zu untersuchen.

### 4.1 Die Wechselwirkung zwischen dem angeborenen Immunsystem und der Lichtalterung

#### 4.1.1 Die Rolle des Adapterproteins MyD88 bei Entzündungsreaktionen und DNS-Schäden im Mausmodell der Lichtalterung

Chronische UVB-Strahlung führt zur vorzeitigen Lichtalterung. Diese tritt im Gegensatz zu chronologischen Alterungsprozessen der Haut schon in jungen Individuen auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Mausmodell verwendet, mithilfe dessen eine UVB-induzierte vorzeitige Hautalterung simuliert wurde. Hierbei wurden die Mäuse über 6 Wochen einer ansteigenden Dosis an UVB-Strahlung ausgesetzt. Die Behandlung begann mit  $60 \text{ mJ/cm}^2$  und wurde bis auf  $100 \text{ mJ/cm}^2$  gesteigert. Das Ziel war, die Mäuse mit einer Dosis zu bestrahlen, die Lichtalterung induziert, jedoch so gering ist, dass sie nicht zu der Bildung von Erythemen

führt. Beim Menschen ist diese Dosis als minimale erythemale Dosis (MED) angegeben. Aufgrund der verschiedenen UV-Dosen und Lampentypen, die experimentell zur Bestrahlung von Mäusen verwendet werden, ist es schwierig, die MED für die Mäuse aus Literaturdaten zu bestimmen. Diese ist abhängig vom Mausstamm, dem Alter der Tiere und dem Versuchsaufbau. Generell wird für C57BL/6 Mäuse eine MED zwischen  $36 \text{ mJ/cm}^2$  und  $350 \text{ mJ/cm}^2$  in der Literatur angegeben [131]. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass zweimalige Bestrahlungsdosis von  $178,5 \text{ mJ/cm}^2$  zu geringen Erythemen in Mäusen des Stammes C57BL/6 führt [107]. Bei den in der vorliegenden Arbeit gewählten Bestrahlungsdosen (bis  $100 \text{ mJ/cm}^2$ ) waren keine Erytheme mit nachfolgender Entzündungsreaktion in der Haut zu beobachten. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass in chronisch UVB-bestrahlter Haut die proinflammatorischen Zytokine KC und  $\text{TNF}\alpha$  nicht erhöht waren. Auch konnte keine Infiltration von Neutrophilen in die Dermis als Reaktion auf die Bestrahlung beobachtet werden. Aus einer oben erwähnten Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe [107] geht hervor, dass in dem dort angewandten akuten Bestrahlungsmodell mit einer höheren UVB-Strahlungsdosis ( $2 \times 178,5 \text{ mJ/cm}^2$ ) die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen, sowie die Infiltration von Neutrophilen in bestrahlten Hautregionen signifikant MyD88-abhängig erhöht waren. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration der Zytokine  $\text{TNF}\alpha$  und CXCL-1 (KC) nach einer einmaligen hohen Bestrahlungsdosis im Vergleich zu wiederholter niedrigerer Bestrahlungsdosis in der Haut signifikant erhöht waren [132]. Diese Studie verdeutlicht, dass die Produktion proinflammatorischer Zytokine erst nach der Überschreitung der MED aktiviert und sekretiert wurden. Dies könnte bedeuten, dass die hier in dieser Arbeit verwendete UVB-Dosis unter der MED der verwendeten Mäuse lag und so keine Entzündungsreaktion induziert war. Gegensätzlich zu den in dieser Arbeit erhobenen Daten konnte in anderen Experimenten der Lichtalterung nachgewiesen werden, dass die Neutrophilenanzahl in bestrahlter Haut deutlich anstieg [133]. Jedoch wurden dort andere Mäuse (*hairless mice*) und eine höhere Bestrahlungsdosis über einen längeren Zeitraum von 10 Wochen, als in dem in der vorliegenden Arbeit angewandten Modell, untersucht. Zusammenfassend kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass gegensätzlich zu Literaturdaten die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und die Infiltration der Neutrophilen stark abhängig von der angewandten Bestrahlungsdosis und der Dauer des Versuchs ist. Für das Protokoll, das in dieser Arbeit verwendet wurde, konnte über den Zeitraum von sechs Wochen keine lokale Entzündungsreaktion in der Haut induziert werden.

Infolge der chronischen UVB-Bestrahlung wurde ein signifikanter Anstieg der Melaninkonzentration in der Epidermis beobachtet. Jedoch gab es keinen Unterschied zwischen bestrahlten MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen. Im Gegensatz dazu konnte in einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden, dass die Melaninkonzentration nach akuter UVB-Bestrahlung abhängig von MyD88-induzierten Signalwegen war, da die Tyrosinase-

Expression in MyD88-defizienten Mäusen verringert war, was zu einer verminderten und verlangsamt Synthese des Melanins führen könnte [107]. Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass verschiedene Bestrahlungsmodelle angewendet wurden. Das akute Bestrahlungsmodell führt zu einer Entzündungsreaktion in MyD88-profizienten Tieren. Melanozyten können auch durch Entzündungsreaktionen aktiviert werden (zusammengefasst in [134]). Dies könnte bedeuten, dass die Entzündungsreaktion in MyD88-profizienten Mäusen im akuten Bestrahlungsmodell die Melanozytensynthese zusätzlich aktiviert, wohingegen diese Aktivierung aufgrund der fehlenden Entzündung im chronischen Bestrahlungsmodell fehlt. Auch konnte eine andere Studie zeigen, dass humane Melanozyten TLR4 exprimieren [135]. Diese Ergebnisse könnten somit darauf hinweisen, dass es im Modell der Lichtalterung zu einer Akkumulation des Melanins in den MyD88-defizienten Mäusen kommt, so dass sich während der sechswöchigen Bestrahlung die Melaninkonzentrationen der MyD88-defizienten denen der -profizienten angleichen.

In MyD88-defizienten, chronisch bestrahlten Mäusen konnte eine erhöhte Bildung von CPDs mit einer erhöhten Apoptoserate und einer verminderten Expression des Reparaturenzyms XPA im Vergleich zu MyD88-profizienten Mäusen nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass das angeborene Immunsystem für die Erkennung von DNS-Schäden und die Einleitung der DNS-Reparatur mitverantwortlich ist [136]. Dies wird hierdurch erklärt, dass diese Mechanismen evolutionär konserviert sind und eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Pathogenen spielen [137]. Hinzu kommt, dass eine erhöhte Reparatur von DNS-Schäden zu einer vermehrten Einlagerung des Melanins in der Epidermis führt [120]. Auch konnte in der Dissertation von B. Schadow [107] dargelegt werden, dass die CPD-Bildung nach einer einmaligen akuten hohen UVB-Bestrahlung in Abwesenheit von MyD88 stark erhöht war. Andere Studien zeigten, dass die Entzündungsreaktion und die Reparatur von DNS-Schäden induziert durch die MyD88-abhängige Aktivierung mit der Ras/Erk-Signaltransduktion in Zusammenhang gebracht werden können [138][139]. Diese Daten zeigen, dass durch die Abwesenheit von MyD88-abhängigen Signalwegen die Hemmung der Ras/Erk-Signaltransduktion nicht mehr vorhanden ist, was die Reparatur von DNS-Schäden vermindert. Gegenätzlich wurde nachgewiesen, dass TLR4-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypkontrollen eine erhöhte Reparatur von CPDs aufwiesen [140]. Diese Unterschiede zu den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten könnten durch den unterschiedlichen Aufbau der Experimente geschuldet sein, da in den Versuchen von Ahmad *et al.* deutlich geringere Bestrahlungsdosen verwendet wurden. Um abschließend mit Sicherheit sagen zu können, dass diese Ergebnisse auf einer verbesserten DNS-Reparatur unter der Anwesenheit von MyD88 abhängt, müssten die Reparaturmechanismen detaillierter analysiert werden.

Diese erhöhten DNS-Schäden bei Abwesenheit von MyD88 konnten auch in dieser Arbeit in *in vitro*-kultivierten Keratinozyten bestätigt werden, wohingegen MyD88-abhängige Signalwege keinen Einfluss auf die CPD-Bildung in *in vitro*-kultivierten Fibroblasten hatten. Es wurde nachgewiesen, dass Keratinozyten im Vergleich zu Fibroblasten nach UV-induzierten DNS-Schäden eine höhere Bindungskapazität des DNS-Bindeproteins aufwiesen, was zu einer erhöhten DNS-Reparatur führt [141]. Auch konnte gezeigt werden, dass TLR4-abhängige Signalwege über MyD88 Keratinozyten vor DNS-Schäden schützen [142], bzw. zu einer erhöhten DNS-Reparatur führen könnten. Dies lässt vermuten, dass Keratinozyten eine schnellere CPD-Reparatur aufweisen, die über MyD88-induzierte Signalwege aktiviert werden könnten. Dies könnte erklären, warum MyD88-profiziente Keratinozyten ein niedrigeres Level an CPDs aufweisen, da sie eine bessere DNS-Reparatur aufweisen im Vergleich zu Fibroblasten.

Auch konnte hier im *in vivo*-Modell der Lichtalterung dargelegt werden, dass die Expression von MyD88 in Makrophagen zu einer geringeren Bildung von DNS-Schäden führt, gegensätzlich zu der Expression von MyD88 in Keratinozyten, DZ und Mastzellen, die das gleiche Niveau an CPD-Bildung aufweisen, wie in komplett MyD88-defizienten Mäusen. Hierbei ist für Makrophagen bekannt, dass sie eine fördernde Rolle bei der Erkennung von DNS-Schäden spielen [143]. Folglich scheinen MyD88-abhängige Signalwege die DNS-Reparatur zu verstärken. Es sind Studien bekannt, die zeigen, dass das Zytokin IL-12 die Reparatur von DNS-Schäden induziert [144][145]. Da IL-12 von Makrophagen sezerniert wird, könnte dies bedeuten, dass aktivierte, in die Haut eingewanderte Makrophagen durch die Produktion von IL-12 die Reparatur von DNS-Schäden induzieren kann. Dies könnte erklären, dass die Expression von MyD88-abhängigen Signalwegen in Makrophagen zu verringerten DNS-Schäden führt. Auch können DZ IL-12 produzieren, da jedoch noch unklar ist, ob diese durch die UVB-Exposition depletiert werden oder in den Lymphknoten wandern, wird ihre Rolle in Abschnitt 4.1.2 näher diskutiert. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass diese schützende Funktion stark abhängig davon ist, in welchem Zelltyp die MyD88-abhängige Signaltransduktion abläuft.

#### **4.1.2 Der Einfluss von MyD88 auf epidermale Veränderungen im Mausmodell der Lichtalterung**

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Epidermisdicke in lichtgealterter Haut signifikant erhöht und dies auch abhängig von MyD88-induzierten Signalwegen war. Auch zeigte sich, dass in der chronisch bestrahlten Haut die Expression von K6-aktivierten proliferierenden Keratinozyten erhöht war. Dies war jedoch unabhängig von MyD88. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von K6 durch UVB-Strahlung erhöht wird und über mehrere Wochen anhält [146]. Auch zeigte K6 eine Koregulation mit Genen, die mit der epidermalen Barriere und dem angeborenen Immunsystem im Zusammenhang stehen [147]. K6 spielt auch eine Rolle während der Wundheilung [125], bei dem die erhöhte Expression

von K6 die Keratinozytenproliferation bedeutend beeinflusst. Die Verdickung der Epidermis nach chronischer UVB-Bestrahlung ist ebenfalls auf Keratinozytenproliferation zurückzuführen. Somit scheint es, dass die basalen Keratinozyten im Modell der Lichtalterung für die von MyD88-abhängigen Signalwegen verdickte Epidermis verantwortlich sein könnten. Dies wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass die Expression der MyD88-abhängigen Signaltransduktion spezifisch in Keratinozyten die Epidermisverdickung wiederherstellt. Im Gegensatz dazu spielen Keratinozyten-intrinsische Signalwege bei der Epidermisverdickung im Modell der atopischen Dermatitis keine Rolle [127]. Keratinozyten können jedoch lösliche Faktoren produzieren, die andere Immunzellen in der Haut aktivieren und möglicherweise MyD88-abhängig sind. In humanen Studien konnte dargelegt werden, dass Keratinozyten die Expression von K6 durch die Produktion von IL-1 induzieren [148][149]. IL-1 ist ein Zytokin, welches Keratinozyten in Abhängigkeit von MyD88-abhängiger Signaltransduktion sekretieren können. Ein weiteres Zytokin, welches Keratinozyten produzieren und abhängig von MyD88-induzierten Signalwegen gebildet wird ist IL-6. Es ist bekannt, dass die IL-6-Produktion durch UV-Strahlung induziert werden kann [150][151] und die die Proliferation von Keratinozyten induziert [152][153][154]. Zusätzlich zu IL-1 und IL-6 könnte das Zytokin IL-20 an Keratinozyten-intrinsischen Effekten beteiligt sein. Es wurde auch für IL-20 beschrieben, dass es von Keratinozyten gebildet werden kann und zu ihrer Proliferation beiträgt [155][156]. Somit zeigen viele Studien, dass Keratinozyten in Abhängigkeit von MyD88 Zytokine, wie IL-1 und IL-6 produzieren, die ihre eigene Proliferation induzieren. Dies könnte in dem in dieser Arbeit angewandten Modell der chronischen UVB-Bestrahlung bedeuten, dass die MyD88-abhängige Epidermisverdickung und die damit verbundene Keratinozytenproliferation durch die eigene Zytokinproduktion der Keratinozyten erklärt werden könnte.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die epidermalen DZ, die LZ, nach chronischer UVB-Bestrahlung signifikant reduziert waren. Es konnte jedoch kein Anstieg der LZ-Zahlen im drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden. Andere Studien zeigen, dass UV-Strahlung zu einer Depletion der LZ führt [157][158]. Diese könnten die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen, dass die Exposition gegenüber UVB-Strahlung eher die LZ depletiert als dass diese durch Aktivierung in den drainierenden Lymphknoten einwandern, um eine Immunantwort des erworbenen Immunsystems zu induzieren.

Interessanterweise führte die Expression MyD88-abhängiger Signalwege exklusiv in CCL17-positiven DZ ebenfalls wie in Mäusen, die MyD88 exklusiv in Keratinozyten exprimieren, zu einer verstärkten Verdickung der Epidermis, was auf eine erhöhte Proliferation der Keratinozyten hindeutet. Analysen belegen, dass LZ mit Keratinozyten und  $\gamma\delta$ T-Zellen ein Netzwerk bilden (zusammengefasst in [159]). Auch können LZ IL-1 produzieren, was zu einer Aktivierung der Keratinozyten führt [160]. Jedoch konnte auch in einer humanen Studie dargelegt werden, dass die CCL17-Produktion durch Keratinozyten zu einer erhöhten Expression von Aquaporin-3

führt und dies die Keratinozytenproliferation verstärkt [161]. Im Mausmodell wurde nachgewiesen, dass CCL17 von LZ produziert werden kann [162]. Dies könnte für die vorliegende Arbeit bedeuten, dass nach chronischer UVB-Bestrahlung die LZ MyD88-abhängig CCL17 sekretieren, was die Sekretion und nachfolgend die Keratinozytenproliferation beeinflussen könnte. Auch könnten die DZ durch die Sekretion von Zytokinen wie IL-1 zur Proliferation der Keratinozyten beitragen. Es ist noch nicht bekannt, zu welchem Zeitpunkt die LZ durch UV-Exposition depletiert werden. Somit ist unklar, ob die LZ Signalmoleküle wie Zytokine an die Keratinozyten aussenden können, bevor sie in Apoptose gehen. Sind sie dazu nicht in der Lage, würde dies bedeuten, dass in den MyD88<sup>CCL17<sup>IND</sup></sup>-Mäusen die dermalen DZ für die Signalweiterleitung an die Keratinozyten und die daraus resultierende Epidermisverdickung verantwortlich sein könnten. Im Gegensatz zu den DZ hat interessanterweise die Expression von MyD88-abhängigen Signalwegen in Makrophagen keinen Einfluss auf die Verdickung der Epidermis. Obwohl Makrophagen in der Lage sind, IL-8 zu produzieren und bekannt ist, dass Keratinozyten auf dieses Zytokin reagieren können [163], scheint dieses bei chronischer UV-Bestrahlung keinen Einfluss auf die Aktivierung der Keratinozyten zu haben.

Auch konnte hier beobachtet werden, dass MyD88-abhängige Signalwege exklusiv in Mastzellen, die oben beschriebene Epidermisverdickung und damit verbundene Keratinozytenproliferation partiell wiederherstellen können. In der Studie von Theoharides *et al.* konnte verdeutlicht werden, dass die Aktivierung von Mastzellen zur Sekretion von Zytokinen und Chemokinen führt jedoch ohne, dass sie degranulieren [164]. Auch sind Mastzellen in der Lage, TLR-abhängig das Zytokin IL-33 sezernieren [165]. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Mastzellen in Abhängigkeit von MyD88-abhängigen Signalwegen relevante Zytokine sezernieren könnten, die mit zur Proliferation der Keratinozyten beitragen.

Ähnlich wie bei den LZ wurde eine MyD88-unabhängige Reduktion der  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Epidermis festgestellt. Genauso konnte hier auch keine Erhöhung der  $\gamma\delta$ T-Zell-Population im drainierenden Lymphknoten festgestellt werden.  $\gamma\delta$ T-Zellen, die dicht vernetzt mit LZ und Keratinozyten in der Epidermis vorliegen, können wie LZ durch UV-Strahlung Zytokine freisetzen [166] oder depletiert werden (zusammengefasst in [159]). Da die  $\gamma\delta$ T-Zellen nach UV-Strahlung in der Epidermis reduziert sind, könnte dies daraufhin weisen, dass die Exposition mit UVB-Strahlung die  $\gamma\delta$ T-Zellen, ebenso wie die LZ, depletiert. Jedoch ist wie bei den LZ unklar, zu welchem Zeitpunkt die Depletion statt findet. Somit kann nicht genau herausgefunden werden, ob die  $\gamma\delta$ T-Zellen am Anfang der Bestrahlungsperiode Signale aussenden können, die zu einer Aktivierung der Keratinozyten beitragen könnten.

### 4.1.3 Der Effekt des Adapterproteins MyD88 auf dermale Veränderungen im Mausmodell der Lichtalterung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass chronische UVB-Bestrahlung zu einer verminderten Expression der Kollagenase MMP1 $\alpha$  führt. Es konnte mithilfe einer Kollagen-Übersichtsfärbung keine UVB-induzierte Veränderung des Kollagens in der Dermis detektiert werden. Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass UV-Strahlung zur Degradierung der Kollagenstruktur führt und diese für die daraus resultierende Faltenbildung verantwortlich ist [167]. Auch geht aus einer anderen Studie hervor, dass die Kollagenase MMP1 $\alpha$  für die Degradierung der Kollagenfibrillen verantwortlich ist [168]. Hieraus könnte der Schluss gezogen werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Strahlungs-dosis nicht dazu ausreicht, um Strukturänderungen der Dermis auszulösen. Andererseits könnte die angewandte Mikroskopietechnik keine ausreichende Auflösung der Kollagenfibrillen leisten, so dass Strukturveränderung nicht erkannt wurden. Hierfür spricht eine Studie, die die Kollagenstrukturen nach UV-Exposition mithilfe der Rasterkraftmikroskopie (*atomic force microscopy*) analysiert, mit der im Bereich von Nanometern die Struktur untersucht werden kann [169]. Die UV-induzierte Aktivierung und Bildung von MMP1 $\alpha$  wird durch den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in dermalen Fibroblasten gesteuert [170][171]. Aufgrund dieser Studien könnte dies für die Ergebnisse dieser Arbeit bedeuten, dass Fibroblasten nicht aktiviert werden konnten und so infolge die Bildung von MMP1 $\alpha$  nicht erhöht war, welches weiter analysiert werden müsste. Da hier gezeigt wurde, dass Fibroblasten *in vitro* durch UV-Bestrahlung eine hohe DNS-Schädigung aufwiesen, könnte ihre Funktionalität beeinträchtigt worden sein.

Nach chronischer UVB-Exposition zeigte die Hyaluronsäure-Synthase (HAS) 2 in Abwesenheit der MyD88-abhängigen Signaltransduktion eine erhöhte Expression, was jedoch bei Anwesenheit der MyD88-induzierten Signaltransduktion verringert war. In einer Veröffentlichung wurde dargelegt, dass degradierte Kollagenfragmente vor allem die HAS2 inhibieren [172]. Die verminderte Expression von HAS2 in MyD88-profizienten Mäusen als Antwort auf chronische UVB-Bestrahlung könnte somit dadurch erklärt werden, dass durch die UVB-Exposition degradierte Kollagenfragmente die Synthese von HAS2 inhibieren. Dies wurde in MyD88-defizienten Mäusen nicht beobachtet, was bedeuten könnte, dass entstandene Kollagenfragmente als DAMP über TLR4/MyD88-induzierte Signalwege erkannt werden könnten. Obwohl in dieser Arbeit lichtmikroskopisch keine Veränderung der Kollagenstruktur festgestellt werden konnte, könnte es aber sein, dass degradierte Kollagenfragmente vorliegen, die mittels der Kollagen-Übersichtsfärbung nicht detektiert werden konnten. Dies könnte somit bedeuten, dass das in dieser Arbeit angewandte Modell zu einer Degradierung der Kollagenfibrillen auf molekularer, lichtmikroskopisch nicht darstellbarer Ebene führt. Diese Hypothese müsste mit weiteren Analysen, bspw. mithilfe eines Western Blots für einzelne Kollagentypen, verifiziert werden. Die

microRNAs miR-23a inhibiert die Synthese von HAS2, was zu einer verstärkten Alterung der Haut führt [173]. Da die Synthese von HAS2 in Abwesenheit von MyD88-abhängigen Signalwegen erhöht ist, könnte dies erklären, warum MyD88-Defizienz zu verringerten Symptomen der Hautalterung führt.

Die chronische UVB-Bestrahlung führte im hier verwendeten Modell zu einer Verkürzung und Verdickung der elastischen Fasern. Dieser Effekt konnte in MyD88-profizienten Mäusen verstärkt beobachtet werden. Eine chronische Exposition gegenüber UVB-Strahlung führt zu einer diskontinuierlichen Anordnung und zu einer Verdichtung der elastischen Fasern [174][175]. Die Entwicklung der sogenannten Elastose verläuft in zwei Phasen: zuerst erhöht sich die Anzahl und die Dichte der elastischen Fasern, später folgt dann eine Degradierung der Fasern (zusammengefasst in [176]). Dies resultiert im Verlust der Zug- und Spannkraft der Haut, welches zur Faltenbildung beiträgt. Interessanterweise konnte eine vermehrte Elastindegredierung in Anwesenheit von MyD88-abhängigen Signalwegen im Vergleich zu MyD88-defizienten Tieren gezeigt werden. Dies könnte bedeuten, dass eine MyD88-abhängige Sekretion von Mediatoren den Elastinabbau begünstigen könnte. Dies bedeutet für die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass die beobachtete veränderte Struktur des Elastinnetzwerks in MyD88-profizienten Mäusen zum Verlust der Zug- und Spannkraft führen könnte. Zu dieser Theorie liefern Imokawa *et al.* eine mögliche Erklärung. In ihrer Studie verdeutlichen sie, dass UV-Strahlung die Freisetzung der Mediatoren IL-8 und GM-CSF von Keratinozyten aktiviert, die dadurch dermale Fibroblasten zu einer erhöhten Elastaseproduktion aktivieren, was in Folge zu einer erhöhten Elastindegredierung führt [177]. Auch konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass Keratinozyten Zytokine abhängig von MyD88-induzierten Signalwegen sekretieren können [127]. Somit könnte dies bedeuten, dass die Keratinozyten durch MyD88-abhängige Signalwege zur Produktion von Zytokinen aktiviert werden könnten, die infolge die Elastinproduktion der dermalen Fibroblasten fördern könnten. Dies würde darauf hinweisen, dass die Fibroblasten durch chronische UVB-Exposition doch aktiviert werden könnten. Um dieses zu bestätigen, müssten weitere Analysen durchgeführt werden, ob Fibroblasten im Modell der Lichtalterung geschädigt oder aktiviert werden.

Das in dieser Arbeit verwendete Modell der Lichtalterung führt zu einer starken Mastozytose, welche durch eine Akkumulation von Mastzellen in der Dermis gekennzeichnet ist. Interessanterweise war diese stark abhängig von MyD88-induzierten Signalwegen. Es ist bekannt, dass Mastzellen durch ihre immunsuppressive Wirkung Schutz vor übermäßigen Entzündungsreaktionen geben [178]. Auch konnte nachgewiesen werden, dass Mastzell-defiziente Mäuse keine Phototoleranz, welches eine Reduktion der Sensibilität gegenüber UV-Strahlung ist, ausbilden und anfällig für UV-induzierten Juckreiz sind [179], was ebenfalls auf eine bedeutende Rolle der Mastzellen bei chronischer UV-Exposition hinweist. Um eine Immunsuppression zu

induzieren, ist es für die Mastzellen essentiell, dass sie in den drainierenden Lymphknoten einwandern können. Für diese Migration spielt die Anwesenheit des Mastzellmediators PAF (*platelet-activating factor*) eine bedeutende Rolle [180]. Es ist jedoch nicht bekannt, welche Mechanismen oder welche anderen Zellen einen Einfluss auf die Entstehung der Mastozytose haben. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass ein Mastzell-intrinsischer Mechanismus dafür verantwortlich sein könnte. Dies wird durch Daten unterstützt, die zeigen, dass Mastzellen über TLR-abhängige Signaltransduktion zur Produktion von Zytokinen wie IL-13 [181] oder IL-33 [165] aktiviert werden. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass MyD88-defiziente Mäuse vermehrt T<sub>H</sub>2-Zytokine, wie IL-13 sekretieren (S. Didovic, F.V. Opitz, H. Weighardt, unveröffentlichte Daten). Interessanterweise konnte die Expression von MyD88-abhängigen Signalwegen in Keratinozyten die UVB-induzierte Mastozytose nicht wiederherstellen. Dies könnte bedeuten, dass Keratinozyten keinen Einfluss auf die Proliferation oder Rekrutierung der Mastzellen in die Dermis haben. Gegenätzlich wäre es jedoch möglich, dass Keratinozyten in Abhängigkeit von MyD88 Zytokine sekretieren könnten, die zu einer verstärkten Migration der Mastzellen in den drainierenden Lymphknoten führt, was folglich in einer reduzierten Mastozytose beobachtet werden könnte. Humane Keratinozyten produzieren nach UV-Bestrahlung die Zytokine IL-15 und CCL5, die die Migration der Mastzellen induzieren [182]. Dies könnte für das Bestrahlungsmodell in dieser Arbeit bedeuten, dass die UVB-Bestrahlung in Abhängigkeit von MyD88 zwei unterschiedliche Einflüsse auf die Mastzellen haben könnte. Um diese Hypothese zu testen, müssten weitere Analysen durchgeführt werden.

##### 4.1.4 UVB-induzierte Aktivierung des erworbenen Immunsystems

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels FACS-Analyse verdeutlicht, dass es keine prozentualen Veränderungen in den Zellfrequenzen von DZ und T-Zellen im Haut-drainierenden Lymphknoten nach chronischer UVB-Bestrahlung nachzuweisen waren. Jedoch konnte eine leichte Erhöhung der B-Zellfrequenzen beobachtet werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass dermale DZ nach UV-Exposition in den drainierenden Lymphknoten migrieren [183], um dort B- und T-Zellen zu aktivieren. Gegenätzlich kann jedoch auch UV-Strahlung das Immunsystem durch die Inhibierung der T- und B-Zell-Aktivierung supprimieren [184]. Diese Studien verdeutlichen, dass der Einfluss von UV-Bestrahlung sehr unterschiedlich wirken kann. Hierbei könnte die unterschiedliche UV-Expositionsdauer und -dosis eine wichtige Rolle spielen, die einen Vergleich der verschiedenen Modelle und deren Einfluss auf die Induktion des angeborenen Immunsystems erheblich erschwert. Da in dieser Arbeit eine erhöhte Zellzahl in den drainierenden Lymphknoten der bestrahlten MyD88-profizienten Mäuse nachgewiesen werden konnte, lässt dies vermuten, dass die chronische UVB-Exposition zu einer Immunantwort im Lymphknoten führt.

#### 4.1.5 Die systemische Funktion von MyD88 im Mausmodell der Lichtalterung

Es wurde beobachtet, dass MyD88-defiziente Mäuse einen signifikant höheren IgE-Spiegel im Serum aufzeigten im Vergleich zu MyD88-profizienten Tieren. Jedoch hatte die chronische UVB-Bestrahlung auf diesen keinen Einfluss. Es wurde bereits beschrieben, dass die Abwesenheit von MyD88 zu erhöhten IgE-Spiegeln im Serum führt [185], jedoch sind die Mechanismen hierfür nicht bekannt. Es konnte in MyD88-defizienten Tieren keine signifikante Erhöhung von Zellfrequenzen der B-Zellen beobachtet werden, was den erhöhten IgE-Serumspiegel erklären könnte. Jedoch ist auch eine Erkrankung bekannt, die mit erhöhten IgE-Spiegeln infolge von UV-Exposition einhergeht, die Lichturtikaria. Hierbei wird durch die UV-Bestrahlung vermehrt IgE gebildet, die durch Quervernetzung der Fc-Rezeptoren die Mastzellen aktivieren. Dies resultiert in ihrer Degranulierung und führt beim Patienten zur Erythembildung (zusammengefasst in [186]). Im Gegensatz hierzu ist im Modell der Lichtalterung keine Erhöhung des IgE-Spiegels erkennbar, was daraufhin deutet, dass keine Degranulierung der Mastzellen durch Quervernetzung der Fc-Rezeptoren stattfindet. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass unbestrahlte MyD88-defiziente Mäuse im Vergleich zu MyD88-profizienten Tieren eine höhere Konzentration des Zytokins IL-13 im Serum aufzeigten. Dieses erhöhte sich in den MyD88-defizienten Mäusen nach chronischer Exposition gegenüber UVB-Strahlung signifikant im Vergleich zu den MyD88-profizienten Tieren. Erhöhte Serumkonzentrationen des Zytokins IL-13 werden mit der Schwere von Asthma in Verbindung gebracht [187] und sind für erhöhte IgE-Konzentrationen verantwortlich [188]. Auch wurde nachgewiesen, dass IL-13 von T<sub>H</sub>2-Zellen produziert wird [189]. Dies weist daraufhin, dass es in Abwesenheit von MyD88 im Modell der Lichtalterung zu einer Verschiebung zur T<sub>H</sub>2-Immunantwort kommt. Gegensätzlich zu der Produktion von IL-13 wird das Chemokin CCL22 im Modell der Lichtalterung vermehrt in MyD88-profizienten Mäusen gebildet. Im Vergleich dazu ist die Sekretion in MyD88-defizienten Tieren nach chronischer Exposition gegenüber UVB-Strahlung signifikant vermindert. Es ist bekannt, dass T<sub>H</sub>2-Zytokine, wie IL-13, IL-4 und IL-5, Makrophagen dazu anregen, das Chemokin CCL22 zu produzieren [130][190]. Auch zeigt eine humane Studie, dass CCL22 von Keratinozyten gebildet werden kann [191]. Da schon gezeigt wurde, dass chronische UVB-Bestrahlung zu einer Reduktion der LZ führt, könnte die MyD88-abhängige Produktion von CCL22 von den Keratinozyten sezerniert werden. Dies würde zu den Ergebnissen passen, dass Keratinozyten auch andere Zytokine, wie IL-1 $\alpha$ , MyD88-abhängig nach UVB-Exposition produzieren.

## 4.2 Die Wechselwirkungen zwischen dem angeborenen Immunsystem und der Entstehung der Photokarzinogenese

Chronische UVB-Exposition über einen Zeitraum von 55 Wochen führte in den Mäusen zu der Entwicklung von nicht melanozytären Hauttumoren, wie Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen. In diesem Experiment konnte kein Unterschied in der Bildung von DNS-Schäden von MyD88-profizienten und -defizienten Mäusen festgestellt werden. Jedoch zeigten MyD88-defiziente Tiere eine verzögerte Bildung von Tumoren und eine leicht reduzierte Tumoranzahl pro Maus im Vergleich zu MyD88-profizienten Tieren. Es ist bekannt, dass vorhandene CPDs einer der Hauptgründe sind, die zur Entwicklung dieser Hauttumore führen [99]. Auch wurde gezeigt, dass die durch UVB-Strahlung entstehenden Entzündungsreaktionen zur Suppression des Immunsystems führen [108]. Diese Immunsuppression wird dadurch gefördert, dass es zu einer Induktion von regulatorischen T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und infolgedessen zu einer Inhibierung der T-Effektorzellen kommt [192]. Dies würde bedeuten, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems, welches mit Entzündungsreaktionen einhergeht, die Tumorbildung begünstigen könnte. Dies könnte mit der früheren Entwicklung von Tumoren in MyD88-profizienten Mäusen erklärt werden. Auch wurde in einem anderen Mausmodell nachgewiesen, dass die Induktion der chemisch induzierten Karzinogenese in MyD88-defizienten Mäusen stark reduziert war [193]. Gegenätzlich zeigte eine Studie, dass die Behandlung mit dem TLR7-Agonisten Imiquimod, welcher zur Behandlung von Basalzellkarzinomen verwendet wird [194], durch die Aktivierung MyD88-abhängiger Signalwege zu einer Reduktion der Tumore führt. Dies könnte jedoch einem anderen Mechanismus geschuldet sein, da die TLR7-Stimulation MyD88-abhängige Signalwege stärker aktivieren könnte. Zusammengefasst könnten diese Studien darlegen, dass die Induktion der Tumorbildung eine Aktivierung MyD88-abhängiger Signalwege und der daraus resultierenden Entzündungsreaktion und einer weitergehenden Immunsuppression benötigt. Sind jedoch Tumore bereits vorhanden, können diese durch eine erneut gezielte Aktivierung der MyD88-abhängigen Signaltransduktion bekämpft werden.

Interessanterweise zeigten MyD88<sup>K5IND</sup>- wie die MyD88-defizienten Mäuse eine stark verzögerte Tumorbildung, die jedoch im Vergleich zu den MyD88-defizienten Mäusen mit einer geringeren Tumoranzahl pro Maus einherging. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass in Plattenepithelkarzinomen eine Veränderung des *epidermal growth factor receptor* (EGFR)-SOS-RAS Signalwegs, der für die Stimulation der Zellproliferation verantwortlich ist, vorliegt [195]. Auch konnte verdeutlicht werden, dass die Überexpression dieses Signalweges in Keratinozyten zu einer Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen führt [196]. Unter Berücksichtigung, dass MyD88-abhängige Signalwege die Ras/Erk-Signaltransduktion hemmt [138][139], würde dies darauf hinweisen, dass diese Inhibierung durch MyD88 in Keratinozyten dazu ausreichen würde, die Tumorbildung zu hemmen. Diese Studien verdeutlichen, dass die Keratinozyten

eine bedeutende Rolle in der Entwicklung von nicht melanozytären Hauttumoren spielen. Gegenätzlich könnte das für in dieser Arbeit verwendeten Modell bedeuten, dass die Expression von MyD88-abhängigen Signalwegen in Keratinozyten zusammen mit der reduzierten Bildung von DNS-Schäden zu einer verminderten Tumorbildung beiträgt.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten deuten daraufhin, dass die Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit daraus möglichen resultierenden Entzündungsreaktionen die Tumorentstehung nach UVB-Bestrahlung begünstigt. Dies verdeutlicht gleichermaßen, dass die MyD88-Signaltransduktion und somit die Aktivierung des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Tumorbildung einnimmt. Andererseits führten jedoch MyD88-induzierte Signalwege in Keratinozyten zu einer reduzierten Bildung von DNS-Schäden, die für die geringeren Tumorzahlen verantwortlich sein könnte.

### **4.3 Klinische Relevanz und Ausblick**

Die chronische Exposition gegenüber UV-Strahlung über Jahrzehnte führt zu einer extrinsischen vorzeitigen Alterung der Haut. Diese ist äußerlich durch eine erhöhte Faltenbildung und eine verminderte Elastizität der Haut gekennzeichnet. Auf molekularer Ebene kommt es zu Veränderungen der Epidermis- und Dermisstrukturen. Auch werden durch die UV-Strahlung DNS-Schäden induziert, durch deren Akkumulation es zur Bildung von Plattenepithel- und Basalzellkarzinomen in UV-exponierten Hautarealen kommt. Eine Risikogruppe, die zu erhöhter Ausbildung von Symptomen der Lichtalterung und anschließender Erkrankung an Photokarzinogenese (nicht melanozytärer Hautkrebs) neigen, stellen Personenkreise dar, neben denen die sonnenbaden, vor allem Personen, die im Freien arbeiten. Die Erkrankung an nicht melanozytärem Hautkrebs ist in Europa die am häufigsten auftretende Krebserkrankung mit einer Inzidenz von 100 Fällen pro 100 000 Individuen [197]. Auch wird die Entwicklung der Lichtalterung durch Zellen des angeborenen Immunsystems beeinflusst. Das angeborene Immunsystem trägt nach akuter UV-Bestrahlung zu Entzündungsreaktionen bei. Jedoch konnte in dieser Arbeit auch eine protektive Rolle MyD88-abhängiger Signalwege nach chronischer Exposition gegenüber UVB-Bestrahlung in Bezug auf die Bildung von DNS-Schäden gezeigt werden. Gegenätzlich zeigte chronische UVB-Bestrahlung auch einen supprimierenden Effekt auf das angeborene Immunsystem, was zu einem erhöhten Risiko führt, an Hautkrebs zu erkranken. Auch könnte diese Supprimierung des Immunsystems zu einer erhöhten Infektionsanfälligkeit führen. In weiteren Versuchen gilt es herauszufinden, inwieweit die chronische UVB-Bestrahlung zu erhöhtem Infektionsrisiko führt.

---

## 5 Zusammenfassung

Die Haut ist eines der größten Barriereorgane des Körpers und schützt diesen vor Pathogenen oder Umwelteinflüssen wie UV-Strahlung. Die chronische Exposition gegenüber UVB-Strahlen induziert die Bildung von sterilen Gefahrensignalen (DAMPs) und führt zur vorzeitigen Alterung der Haut (Lichtalterung) und zu nicht melanozytären Hauttumoren (Photokarzinogenese). DAMPs führen über TLR-abhängige Signalwege zu der Aktivierung des angeborenen Immunsystems, bei denen das Adapterprotein MyD88 eine zentrale Rolle spielt. In dieser Arbeit wurde im Mausmodell untersucht, ob das angeborene Immunsystem die Entwicklung der Lichtalterung und Photokarzinogenese beeinflusst.

Im Modell der Lichtalterung wiesen MyD88-defiziente Mäuse eine erhöhte Bildung von DNS-Schäden auf, die durch die Expression von MyD88 exklusiv in Makrophagen auf das Niveau der MyD88-profizienten Mäuse reduziert werden konnte, wohingegen die MyD88-abhängige Expression in Mastzellen partiell und in Keratinozyten oder DZ keinen Einfluss hatten. Dies zeigt, dass MyD88-abhängige Signalwege besonders in Makrophagen zu verminderten DNS-Schäden in der Haut führen. Des Weiteren zeigte sich, dass die Verdickung der Epidermis und die Bildung der Mastozytose durch chronische Exposition gegenüber UVB-Strahlung abhängig von MyD88-induzierten Signalwegen waren. Während die Expression von MyD88 in Keratinozyten, DZ oder Mastzellen die Epidermisverdickung wiederherstellen konnte, wurde die Mastozytose allein durch die MyD88-Expression in Mastzellen und partiell in Makrophagen und DZ beeinflusst. Diese Arbeit zeigt, dass MyD88-abhängige Signalwege einen Einfluss auf die verschiedenen Charakteristika der Lichtalterung hatten. Jedoch wirkten sich diese stark abhängig vom Zelltyp aus.

In Abwesenheit des Adapterproteins MyD88 wurde eine verzögerte Bildung von UVB-induzierten Hauttumoren beobachtet. Interessanterweise führte die Expression von MyD88-abhängigen Signalwegen in Keratinozyten zu einer späten Bildung von Hauttumoren, die auch mit einer verringerten Tumoranzahl pro Maus einhergingen.

In weiteren Studien könnten die genauen Mechanismen, die zur UVB-induzierten Entstehung von DNS-Schäden, der Epidermisverdickung und der Mastozytose in Abhängigkeit vom angeborenen Immunsystems führen, näher untersucht werden.

---

## 6 Summary

The skin is the first line of defense against pathogens or environmental influences as UVB-irradiation. Chronic exposure of UVB-irradiation induces the formation of danger-associated molecular patterns (DAMPs) and leads to skin aging (photoaging) and tumor formation (photocarcinogenesis). DAMPs can activate TLR signaling pathways via the central adapter protein MyD88. This study aims to analyse whether the activation of MyD88-induced signaling pathways contributes to UVB-induced photoaging and photocarcinogenesis.

In the *in vivo* model of photoaging MyD88-deficiency led to enhanced DNA damage such as formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs). MyD88-signaling exclusively in macrophages attenuated CPD levels, while the expression of MyD88 in mast cells could only partially decrease the formation of CPDs. In contrast MyD88-dependent signaling pathways in keratinocytes or CCL17-positive dendritic cells had no influence of the CPD formation. Furthermore chronic UVB-irradiation led to epidermal hyperplasia and an increase of dermal mast cell numbers. In MyD88-deficient mice reduced epidermal thickening and reduced dermal mast cell numbers were detected compared to wildtype mice. Expression of MyD88 contributed to epidermal thickening in keratinocytes, CCL17-positive dendritic cells or mast cells, while the expression of MyD88 solely in mast cells could restore the effect of mastocytosis. These data indicate that MyD88 influences many hallmarks of UVB-induced photoaging, but these effects of MyD88-signaling are dependent on the different cell types.

Furthermore the deficiency of MyD88 led to delayed formation of skin tumors in an *in vivo* model of photocarcinogenesis. Interestingly the expression of MyD88 only in keratinocytes showed a later development of skin tumors and decreased numbers of tumors per mouse.

Additional studies may focus on the detailed mechanisms which are required for the MyD88-dependent and UVB-induced formation of DNA damage, epidermal thickening and mastocytosis.

## Literaturverzeichnis

1. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. J. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295–298 (1997).
2. Kumagai, Y. & Akira, S. Identification and functions of pattern-recognition receptors. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, 985–992 (2010).
3. Anderson, K. V., Bokla, L. & Nusslein-Volhard, C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* **42**, 791–798 (1985).
4. Jeong, E. & Lee, J. Y. Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Medical Journal* **52**, 379–392 (2011).
5. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. J. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
6. Brown, J., Wang, H., Hajishengallis, G. N. & Martin, M. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of Dental Research* **90**, 417–427 (2011).
7. Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology* **11**, 373–384 (2010).
8. Beutler, B., Jiang, Z., Georgel, P., Crozat, K., Croker, B., Rutschmann, S., Du, X. & Hoebe, K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annual Review of Immunology* **24**, 353–389 (2006).
9. O’Neill, L. A. J. & Bowie, A. G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology* **7**, 353–364 (2007).
10. Harvima, I. T. & Nilsson, G. Mast cells as regulators of skin inflammation and immunity. *Acta Dermato-Venereologica* **91**, 644–650 (2011).
11. Murphy, K. M., Travers, P. & Walport, M. *Janeway Immunologie 7.*, Aufl. 2009. Korrigierter Nachdruck 2014 (Springer Berlin, Berlin, 2014).
12. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A. & Kuby, J. *Kuby immunology* 6th ed. (W.H. Freeman, New York, 2007).

13. Eason, D. D., Cannon, J. P., Haire, R. N., Rast, J. P., Ostrov, D. A. & Litman, G. W. Mechanisms of antigen receptor evolution. *Seminars in Immunology* **16**, 215–226 (2004).
14. Dustin, M. L. Coordination of T cell activation and migration through formation of the immunological synapse. *Annals of the New York Academy of Sciences* **987**, 51–59 (2003).
15. Itano, A. A. & Jenkins, M. K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature Immunology* **4**, 733–739 (2003).
16. Weninger, W., Manjunath, N. & Andrian, U. H. v. Migration and differentiation of CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunological Reviews* **186**, 221–233 (2002).
17. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature Reviews. Immunology* **13**, 88–100 (2013).
18. Chodaczek, G., Papanna, V., Zal, M. A. & Zal, T. Body-barrier surveillance by epidermal gammadelta TCRs. *Nature Immunology* **13**, 272–282 (2012).
19. DeKruyff, R. H., Rizzo, L. V. & Umetsu, D. T. Induction of immunoglobulin synthesis by CD4<sup>+</sup> T cell clones. *Seminars in Immunology* **5**, 421–430 (1993).
20. Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y. & MacLennan, I. C. Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *European Journal of Immunology* **21**, 2951–2962 (1991).
21. Khavari, P. A. Modelling cancer in human skin tissue. *Nature Reviews. Cancer* **6**, 270–280 (2006).
22. Jones, P. H. & Watt, F. M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell* **73**, 713–724 (1993).
23. Jones, P. H., Harper, S. & Watt, F. M. Stem cell patterning and fate in human epidermis. *Cell* **80**, 83–93 (1995).
24. Barrandon, Y. & Green, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 2302–2306 (1987).
25. Fuchs, E. Epidermal differentiation: the bare essentials. *The Journal of Cell Biology* **111**, 2807–2814 (1990).
26. Nelson, W. G. & Sun, T. T. The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *The Journal of Cell Biology* **97**, 244–251 (1983).

27. D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. & Scott, T. UV Radiation and the Skin. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 12222–12248 (2013).
28. Fuchs, E. & Green, H. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**, 1033–1042 (1980).
29. Roop, D. R., Krieg, T. M., Mehrel, T., Cheng, C. K. & Yuspa, S. H. Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Research* **48**, 3245–3252 (1988).
30. Weiss, R. A., Eichner, R. & Sun, T. T. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *The Journal of Cell Biology* **98**, 1397–1406 (1984).
31. Jiang, C. K., Magaldo, T., Ohtsuki, M., Freedberg, I. M., Bernerd, F. & Blumenberg, M. Epidermal growth factor and transforming growth factor alpha specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins 6 and 16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 6786–6790 (1993).
32. Dale, B. A., Holbrook, K. A., Kimball, J. R., Hoff, M. & Sun, T. T. Expression of epidermal keratins and filaggrin during human fetal skin development. *The Journal of Cell Biology* **101**, 1257–1269 (1985).
33. Steven, A. C. & Steinert, P. M. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *Journal of Cell Science* **107 ( Pt 2)**, 693–700 (1994).
34. Steinert, P. M. & Marekov, L. N. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *The Journal of Biological Chemistry* **270**, 17702–17711 (1995).
35. Kalinin, A., Marekov, L. N. & Steinert, P. M. Assembly of the epidermal cornified cell envelope. *Journal of Cell Science* **114**, 3069–3070 (2001).
36. Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. & Wortsman, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiological Reviews* **84**, 1155–1228 (2004).
37. Nordlund, J. J. The melanocyte and the epidermal melanin unit: an expanded concept. *Dermatologic Clinics* **25**, 271–81, vii (2007).
38. Joshi, P. G., Nair, N., Begum, G., Joshi, N. B., Sinkar, V. P. & Vora, S. Melanocyte-keratinocyte interaction induces calcium signalling and melanin transfer to keratinocytes. *Pigment Cell Research / Sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society* **20**, 380–384 (2007).

39. Kupper, T. S. Immune and inflammatory processes in cutaneous tissues. Mechanisms and speculations. *The Journal of Clinical Investigation* **86**, 1783–1789 (1990).
40. Kuhnlein, P., Mitnacht, R., Torres-Nagel, N. E., Herrmann, T., Elbe, A. & Hunig, T. The canonical T cell receptor of dendritic epidermal gamma delta T cells is highly conserved between rats and mice. *European Journal of Immunology* **26**, 3092–3097 (1996).
41. Bangert, C., Brunner, P. M. & Stingl, G. Immune functions of the skin. *Clinics in Dermatology* **29**, 360–376 (2011).
42. Kaplan, D. H. In vivo function of Langerhans cells and dermal dendritic cells. *Trends in Immunology* **31**, 446–451 (2010).
43. Bonneville, M., O'Brien, R. L. & Born, W. K. Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature Reviews. Immunology* **10**, 467–478 (2010).
44. Bendelac, A., Bonneville, M. & Kearney, J. F. Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes. *Nature Reviews. Immunology* **1**, 177–186 (2001).
45. Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S. & Lantz, O. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* **422**, 164–169 (2003).
46. Hayday, A. C. Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. *Immunity* **31**, 184–196 (2009).
47. MacNeil, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* **445**, 874–880 (2007).
48. Bailey, A. J. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mechanisms of Ageing and Development* **122**, 735–755 (2001).
49. Gosline, J., Lillie, M., Carrington, E., Guerette, P., Ortlepp, C. & Savage, K. Elastic proteins: biological roles and mechanical properties. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **357**, 121–132 (2002).
50. Kielty, C. M., Sherratt, M. J. & Shuttleworth, C. A. Elastic fibres. *Journal of Cell Science* **115**, 2817–2828 (2002).
51. Sherratt, M. J. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Dordrecht, Netherlands)* **31**, 305–325 (2009).
52. Tammi, R., Pasonen-Seppänen, S., Kolehmainen, E. & Tammi, M. Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury. *The Journal of Investigative Dermatology* **124**, 898–905 (2005).

53. Stern, R. Complicated hyaluronan patterns in skin: enlightenment by UVB? *The Journal of Investigative Dermatology* **127**, 512–513 (2007).
54. Taylor, K. R., Yamasaki, K., Radek, K. A., Di Nardo, A., Goodarzi, H., Golenbock, D., Beutler, B. & Gallo, R. L. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 18265–18275 (2007).
55. Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* **33**, 657–670 (2010).
56. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews. Immunology* **7**, 678–689 (2007).
57. Galli, S. J., Borregaard, N. & Wynn, T. A. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology* **12**, 1035–1044 (2011).
58. Varricchi, G., Galdiero, M. R., Marone, G., Granata, F., Borriello, F. & Marone, G. Controversial role of mast cells in skin cancers. *Experimental Dermatology* (2016).
59. McKenzie, R. L., Aucamp, P. J., Bais, A. F., Bjorn, L. O., Ilyas, M. & Madronich, S. Ozone depletion and climate change: impacts on UV radiation. *Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **10**, 182–198 (2011).
60. Matsumura, Y. & Ananthaswamy, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicology and Applied Pharmacology* **195**, 298–308 (2004).
61. Diffey, B. L. Human exposure to solar ultraviolet radiation. *Journal of Cosmetic Dermatology* **1**, 124–130 (2002).
62. Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M. P., Correa, G., Ono, Y. & Goodarzi, H. Light, including ultraviolet. *Journal of Autoimmunity* **34**, J247–57 (2010).
63. Clydesdale, G. J., Dandie, G. W. & Muller, H. K. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunology and Cell Biology* **79**, 547–568 (2001).
64. Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C. & Luger, T. A. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *The Journal of Experimental Medicine* **172**, 1609–1614 (1990).

65. Chung, J. H., Youn, S. H., Koh, W. S., Eun, H. C., Cho, K. H., Park, K. C. & Youn, J. I. Ultraviolet B irradiation-enhanced interleukin (IL)-6 production and mRNA expression are mediated by IL-1 alpha in cultured human keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology* **106**, 715–720 (1996).
66. Takashima, A. & Bergstresser, P. R. Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network. *Photochemistry and Photobiology* **63**, 397–400 (1996).
67. Walsh, L. J. Ultraviolet B irradiation of skin induces mast cell degranulation and release of tumour necrosis factor-alpha. *Immunology and Cell Biology* **73**, 226–233 (1995).
68. Cadet, J., Sage, E. & Douki, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research* **571**, 3–17 (2005).
69. Ravanat, J. L., Douki, T. & Cadet, J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* **63**, 88–102 (2001).
70. Schreier, W. J., Schrader, T. E., Koller, F. O., Gilch, P., Crespo-Hernández, C. E., Swaminathan, V. N., Carell, T., Zinth, W. & Kohler, B. Thymine dimerization in DNA is an ultrafast photoreaction. *Science (New York, N.Y.)* **315**, 625–629 (2007).
71. Besaratinia, A., Synold, T. W., Chen, H.-H., Chang, C., Xi, B., Riggs, A. D. & Pfeifer, G. P. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10058–10063 (2005).
72. Gehrke, N., Mertens, C., Zillinger, T., Wenzel, J., Bald, T., Zahn, S., Tuting, T., Hartmann, G. & Barchet, W. Oxidative damage of DNA confers resistance to cytosolic nuclease TREX1 degradation and potentiates STING-dependent immune sensing. *Immunity* **39**, 482–495 (2013).
73. Borkowski, A. W. & Gallo, R. L. UVB radiation illuminates the role of TLR3 in the epidermis. *The Journal of Investigative Dermatology* **134**, 2315–2320 (2014).
74. Johnson, K. E., Wulff, B. C., Oberyszyn, T. M. & Wilgus, T. A. Ultraviolet light exposure stimulates HMGB1 release by keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* **305**, 805–815 (2013).
75. Bianchi, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology* **81**, 1–5 (2007).
76. Richa, Sinha, R. P. & Hader, D.-P. Physiological aspects of UV-excitation of DNA. *Topics in Current Chemistry* **356**, 203–248 (2015).

77. Kollias, N., Sayre, R. M., Zeise, L. & Chedekel, M. R. Photoprotection by melanin. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* **9**, 135–160 (1991).
78. Kligman, L. H. Photoaging. Manifestations, prevention, and treatment. *Dermatologic Clinics* **4**, 517–528 (1986).
79. Naylor, E. C., Watson, R. E. B. & Sherratt, M. J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* **69**, 249–256 (2011).
80. El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D. E., Gasparro, F., Ahmad, H. & Uitto, J. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Experimental Dermatology* **11**, 398–405 (2002).
81. Murakami, H., Shimbo, K., Inoue, Y., Takino, Y. & Kobayashi, H. Importance of amino acid composition to improve skin collagen protein synthesis rates in UV-irradiated mice. *Amino Acids* **42**, 2481–2489 (2012).
82. Brenneisen, P., Oh, J., Wlaschek, M., Wenk, J., Briviba, K., Hommel, C., Herrmann, G., Sies, H. & Scharffetter-Kochanek, K. Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts. *Photochemistry and Photobiology* **64**, 877–885 (1996).
83. Trautinger, F., Mazzucco, K., Knobler, R. M., Trenz, A. & Kokoschka, E. M. UVA- and UVB-induced changes in hairless mouse skin collagen. *Archives of Dermatological Research* **286**, 490–494 (1994).
84. Stern, R. Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway. *European Journal of Cell Biology* **83**, 317–325 (2004).
85. Schwartz, E. Connective tissue alterations in the skin of ultraviolet irradiated hairless mice. *The Journal of Investigative Dermatology* **91**, 158–161 (1988).
86. Südel, K. M., Venzke, K., Knusmann-Hartig, E., Moll, I., Stäb, F., Wenck, H., Wittern, K.-P., Gercken, G. & Gallinat, S. Tight control of matrix metalloproteinase-1 activity in human skin. *Photochemistry and Photobiology* **78**, 355–360 (2003).
87. Kligman, L. H. & Murphy, G. F. Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor. *Photochemistry and Photobiology* **63**, 123–127 (1996).
88. Lavker, R. M. & Kligman, A. M. Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells. *The Journal of Investigative Dermatology* **90**, 325–330 (1988).

89. Kim, M.-S., Kim, Y. K., Lee, D. H., Seo, J. E., Cho, K. H., Eun, H. C. & Chung, J. H. Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin in vivo. *The British Journal of Dermatology* **160**, 393–402 (2009).
90. Berking, C. Photocarcinogenesis. Molecular mechanisms and preventive strategies. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **58**, 398–405 (2007).
91. Leiter, U., Eigentler, T. & Garbe, C. Epidemiology of skin cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **810**, 120–140 (2014).
92. Nishigori, C., Moriwaki, S., Takebe, H., Tanaka, T. & Imamura, S. Gene alterations and clinical characteristics of xeroderma pigmentosum group A patients in Japan. *Archives of Dermatology* **130**, 191–197 (1994).
93. Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T. & Brash, D. E. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773–776 (1994).
94. Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., Winckler, W., Ardlie, K., Wagle, N., Wargo, J., Chong, K., Morton, D. L., Stemke-Hale, K., Chen, G., Noble, M., Meyerson, M., Ladbury, J. E., Davies, M. A., Gershenwald, J. E., Wagner, S. N., Hoon, D. S. B., Schadendorf, D., Lander, E. S., Gabriel, S. B., Getz, G., Garraway, L. A. & Chin, L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251–263 (2012).
95. Bald, T., Quast, T., Landsberg, J., Rogava, M., Glodde, N., Lopez-Ramos, D., Kohlmeyer, J., Riesenberger, S., van den Boorn-Konijnenberg, D., Homig-Holzel, C., Reuten, R., Schadow, B., Weighardt, H., Wenzel, D., Helfrich, I., Schadendorf, D., Bloch, W., Bianchi, M. E., Lugassy, C., Barnhill, R. L., Koch, M., Fleischmann, B. K., Forster, I., Kastenmuller, W., Kolanus, W., Holzel, M., Gaffal, E. & Tuting, T. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature* **507**, 109–113 (2014).
96. Ellison, M. J. & Childs, J. D. Pyrimidine dimers induced in Escherichia coli DNA by ultraviolet radiation present in sunlight. *Photochemistry and Photobiology* **34**, 465–469 (1981).
97. Bowden, G. T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling. *Nature Reviews. Cancer* **4**, 23–35 (2004).

98. Narayanan, D. L., Saladi, R. N. & Fox, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology* **49**, 978–986 (2010).
99. Jans, J., Schul, W., Sert, Y.-G., Rijksen, Y., Rebel, H., Eker, A. P. M., Nakajima, S., van Steeg, H., Gruijl, F. R. d., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H. J. & van der Horst, Gijsbertus T J. Powerful skin cancer protection by a CPD-photolyase transgene. *Current Biology : CB* **15**, 105–115 (2005).
100. Takebe, H., Nishigori, C. & Satoh, Y. Genetics and skin cancer of xeroderma pigmentosum in Japan. *Japanese Journal of Cancer Research : Gann* **78**, 1135–1143 (1987).
101. Cleaver, J. E. Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature* **218**, 652–656 (1968).
102. Kripke, M. L. Immunologic mechanisms in UV radiation carcinogenesis. *Advances in Cancer Research* **34**, 69–106 (1981).
103. Rana, S., Byrne, S. N., MacDonald, L. J., Chan, C. Y.-Y. & Halliday, G. M. Ultraviolet B suppresses immunity by inhibiting effector and memory T cells. *The American Journal of Pathology* **172**, 993–1004 (2008).
104. Wakita, D., Chamoto, K., Ohkuri, T., Narita, Y., Ashino, S., Sumida, K., Nishikawa, H., Shiku, H., Togashi, Y., Kitamura, H. & Nishimura, T. IFN-gamma-dependent type 1 immunity is crucial for immunosurveillance against squamous cell carcinoma in a novel mouse carcinogenesis model. *Carcinogenesis* **30**, 1408–1415 (2009).
105. Kaporis, H. G., Guttman-Yassky, E., Lowes, M. A., Haider, A. S., Fuentes-Duculan, J., Darabi, K., Whynot-Ertelt, J., Khatcherian, A., Cardinale, I., Novitskaya, I., Krueger, J. G. & Carucci, J. A. Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3<sup>+</sup> T cells in a Th2 dominant microenvironment. *The Journal of Investigative Dermatology* **127**, 2391–2398 (2007).
106. Grimaldeston, M. A., Finlay-Jones, J. J. & Hart, P. H. Mast cells in photodamaged skin: what is their role in skin cancer? *Photochemical & Photobiological Sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **5**, 177–183 (2006).
107. Schadow, B. *Rolle des Signalgebers MyD88 bei der UV-induzierten Aktivierung des Immunsystems: Dissertation* (2014).
108. Harberts, E., Zhou, H., Fischelevich, R., Liu, J. & Gaspari, A. A. Ultraviolet radiation signaling through TLR4/MyD88 constrains DNA repair and plays a role in cutaneous immunosuppression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **194**, 3127–3135 (2015).

109. Karasuyama, H. & Melchers, F. Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors. *European Journal of Immunology* **18**, 97–104 (1988).
110. Gais, P., Reim, D., Jusek, G., Rossmann-Bloeck, T., Weighardt, H., Pfeffer, K., Altmayr, F., Janssen, K.-P. & Holzmann, B. Cutting edge: Divergent cell-specific functions of MyD88 for inflammatory responses and organ injury in septic peritonitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **188**, 5833–5837 (2012).
111. Tarutani, M., Itami, S., Okabe, M., Ikawa, M., Tezuka, T., Yoshikawa, K., Kinoshita, T. & Takeda, J. Tissue-specific knockout of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 7400–7405 (1997).
112. Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R. & Förster, I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Research* **8**, 265–277 (1999).
113. Kohler, T., Reizis, B., Johnson, R. S., Weighardt, H. & Förster, I. Influence of hypoxia-inducible factor 1alpha on dendritic cell differentiation and migration. *European Journal of Immunology* **42**, 1226–1236 (2012).
114. Scholten, J., Hartmann, K., Gerbault, A., Krieg, T., Müller, W., Testa, G. & Roers, A. Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic Research* **17**, 307–315 (2008).
115. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* **34**, 637–650 (2011).
116. Piccinini, A. M. & Midwood, K. S. DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. *Mediators of Inflammation* **2010** (2010).
117. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual Review of Immunology* **12**, 991–1045 (1994).
118. Grether-Beck, S., Marini, A., Jaenicke, T. & Krutmann, J. Photoprotection of human skin beyond ultraviolet radiation. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* **30**, 167–174 (2014).
119. Gläser, R., Navid, F., Schuller, W., Jantschitsch, C., Harder, J., Schröder, J. M., Schwarz, A. & Schwarz, T. UV-B radiation induces the expression of antimicrobial peptides in human keratinocytes in vitro and in vivo. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**, 1117–1123 (2009).

120. Eller, M. S., Ostrom, K. & Gilchrest, B. A. DNA damage enhances melanogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 1087–1092 (1996).
121. Takeuchi, S., Zhang, W., Wakamatsu, K., Ito, S., Hearing, V. J., Kraemer, K. H. & Brash, D. E. Melanin acts as a potent UVB photosensitizer to cause an atypical mode of cell death in murine skin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 15076–15081 (2004).
122. Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. & Krepler, R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **31**, 11–24 (1982).
123. Porter, R. M., Lunny, D. P., Ogden, P. H., Morley, S. M., McLean, W. H., Evans, A., Harrison, D. L., Rugg, E. L. & Lane, E. B. K15 expression implies lateral differentiation within stratified epithelial basal cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **80**, 1701–1710 (2000).
124. Moll, R., Divo, M. & Langbein, L. The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology* **129**, 705–733 (2008).
125. Paladini, R. D., Takahashi, K., Bravo, N. S. & Coulombe, P. A. Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16. *The Journal of Cell Biology* **132**, 381–397 (1996).
126. Freedberg, I. M., Tomic-Canic, M., Komine, M. & Blumenberg, M. Keratins and the keratinocyte activation cycle. *The Journal of Investigative Dermatology* **116**, 633–640 (2001).
127. Didovic, S., Opitz, F. V., Holzmann, B., Förster, I. & Weighardt, H. Requirement of MyD88 signaling in keratinocytes for Langerhans cell migration and initiation of atopic dermatitis-like symptoms in mice. *European Journal of Immunology* (2015).
128. Jungersted, J. M., Scheer, H., Mempel, M., Baurecht, H., Cifuentes, L., Høgh, J. K., Hellgren, L. I., Jemec, G. B. E., Agner, T. & Weidinger, S. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy* **65**, 911–918 (2010).
129. Yaffe, M. B., Beegen, H. & Eckert, R. L. Biophysical characterization of involucrin reveals a molecule ideally suited to function as an intermolecular cross-bridge of the keratinocyte cornified envelope. *The Journal of Biological Chemistry* **267**, 12233–12238 (1992).

130. Esaki, H., Takeuchi, S., Furusyo, N., Yamamura, K., Hayashida, S., Tsuji, G., Takemura, M., Hayashi, J. & Furue, M. Levels of immunoglobulin E specific to the major food allergen and chemokine (C-C motif) ligand (CCL)17/thymus and activation regulated chemokine and CCL22/macrophage-derived chemokine in infantile atopic dermatitis on Ishigaki Island. *The Journal of Dermatology* (2016).
131. Gyongyosi, N., Lorincz, K., Keszeg, A., Haluszka, D., Banvolgyi, A., Tatrai, E., Karpati, S. & Wikonkal, N. M. Photosensitivity of murine skin greatly depends on the genetic background: clinically relevant dose as a new measure to replace minimal erythema dose in mouse studies. *Experimental Dermatology* **25**, 519–525 (2016).
132. Cela, E. M., Friedrich, A., Paz, M. L., Vanzulli, S. I., Leoni, J. & Gonzalez Maglio, D. H. Time-course study of different innate immune mediators produced by UV-irradiated skin: comparative effects of short and daily versus a single harmful UV exposure. *Immunology* **145**, 82–93 (2015).
133. Takeuchi, H., Gomi, T., Shishido, M., Watanabe, H. & Suenobu, N. Neutrophil elastase contributes to extracellular matrix damage induced by chronic low-dose UV irradiation in a hairless mouse photoaging model. *Journal of Dermatological Science* **60**, 151–158 (2010).
134. Gasque, P. & Jaffar-Bandjee, M. C. The immunology and inflammatory responses of human melanocytes in infectious diseases. *The Journal of Infection* **71**, 413–421 (2015).
135. Ahn, J. H., Park, T. J., Jin, S. H. & Kang, H. Y. Human melanocytes express functional Toll-like receptor 4. *Experimental Dermatology* **17**, 412–417 (2008).
136. Chatzinikolaou, G., Karakasilioti, I. & Garinis, G. A. DNA damage and innate immunity: links and trade-offs. *Trends in Immunology* **35**, 429–435 (2014).
137. Zgur-Bertok, D. DNA damage repair and bacterial pathogens. *PLoS Pathogens* **9**, e1003711 (2013).
138. Kfoury, A., Le Corf, K., El Sabeh, R., Journeaux, A., Badran, B., Hussein, N., Lebecque, S., Manie, S., Renno, T. & Coste, I. MyD88 in DNA repair and cancer cell resistance to genotoxic drugs. *Journal of the National Cancer Institute* **105**, 937–946 (2013).
139. Kfoury, A., Virard, F., Renno, T. & Coste, I. Dual function of MyD88 in inflammation and oncogenesis: implications for therapeutic intervention. *Current Opinion in Oncology* **26**, 86–91 (2014).
140. Ahmad, I., Simanyi, E., Guroji, P., Tamimi, I. A., delaRosa, H. J., Nagar, A., Nagar, P., Katiyar, S. K., Elmets, C. A. & Yusuf, N. Toll-like receptor-4 deficiency enhances repair of UVR-induced cutaneous DNA damage by nucleotide excision repair mechanism. *The Journal of Investigative Dermatology* **134**, 1710–1717 (2014).

141. Pines, A., Backendorf, C., Alekseev, S., Jansen, J. G., Gruijl, F. R. d., Vrieling, H. & Mullenders, L. H. F. Differential activity of UV-DDB in mouse keratinocytes and fibroblasts: impact on DNA repair and UV-induced skin cancer. *DNA Repair* **8**, 153–161 (2009).
142. Min, W., Ahmad, I., Chang, M. E., Burns, E. M., Qian, Q. & Yusuf, N. Baicalin Protects Keratinocytes from Toll-like Receptor-4 Mediated DNA Damage and Inflammation Following Ultraviolet Irradiation. *Photochemistry and Photobiology* **91**, 1435–1443 (2015).
143. Geiger-Maor, A., Guedj, A., Even-Ram, S., Smith, Y., Galun, E. & Rachmilewitz, J. Macrophages Regulate the Systemic Response to DNA Damage by a Cell Nonautonomous Mechanism. *Cancer Research* **75**, 2663–2673 (2015).
144. Schwarz, A., Maeda, A., Kernebeck, K., van Steeg, H., Beisert, S. & Schwarz, T. Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. *The Journal of Experimental Medicine* **201**, 173–179 (2005).
145. Schwarz, A., Stander, S., Berneburg, M., Bohm, M., Kulms, D., van Steeg, H., Grosse-Heitmeyer, K., Krutmann, J. & Schwarz, T. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nature Cell Biology* **4**, 26–31 (2002).
146. Sano, T., Kume, T., Fujimura, T., Kawada, H., Higuchi, K., Iwamura, M., Hotta, M., Kitahara, T. & Takema, Y. Long-term alteration in the expression of keratins 6 and 16 in the epidermis of mice after chronic UVB exposure. *Archives of Dermatological Research* **301**, 227–237 (2009).
147. Lessard, J. C., Pina-Paz, S., Rotty, J. D., Hickerson, R. P., Kaspar, R. L., Balmain, A. & Coulombe, P. A. Keratin 16 regulates innate immunity in response to epidermal barrier breach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 19537–19542 (2013).
148. Sauder, D. N., Orr, F. W., Matic, S., Stetsko, D., Parker, K. P., Chizzonite, R. & Kilian, P. L. Human interleukin-1 alpha is chemotactic for normal human keratinocytes. *Immunology Letters* **22**, 123–127 (1989).
149. Komine, M., Rao, L. S., Freedberg, I. M., Simon, M., Milisavljevic, V. & Blumenberg, M. Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes. *The Journal of Investigative Dermatology* **116**, 330–338 (2001).
150. Vos, S. d., Brach, M., Budnik, A., Grewe, M., Herrmann, F. & Krutmann, J. Post-transcriptional regulation of interleukin-6 gene expression in human keratinocytes by ultraviolet B radiation. *The Journal of Investigative Dermatology* **103**, 92–96 (1994).

151. Petit-Frere, C., Capulas, E., Lyon, D. A., Norbury, C. J., Lowe, J. E., Clingen, P. H., Riballo, E., Green, M. H. & Arlett, C. F. Apoptosis and cytokine release induced by ionizing or ultraviolet B radiation in primary and immortalized human keratinocytes. *Carcinogenesis* **21**, 1087–1095 (2000).
152. Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B. & Gottlieb, A. B. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 6367–6371 (1989).
153. Sawamura, D., Meng, X., Ina, S., Sato, M., Tamai, K., Hanada, K. & Hashimoto, I. Induction of keratinocyte proliferation and lymphocytic infiltration by in vivo introduction of the IL-6 gene into keratinocytes and possibility of keratinocyte gene therapy for inflammatory skin diseases using IL-6 mutant genes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **161**, 5633–5639 (1998).
154. Sato, M., Sawamura, D., Ina, S., Yaguchi, T., Hanada, K. & Hashimoto, I. In vivo introduction of the interleukin 6 gene into human keratinocytes: induction of epidermal proliferation by the fully spliced form of interleukin 6, but not by the alternatively spliced form. *Archives of Dermatological Research* **291**, 400–404 (1999).
155. Blumberg, H., Conklin, D., Xu, W. F., Grossmann, A., Brender, T., Carollo, S., Eagan, M., Foster, D., Haldeman, B. A., Hammond, A., Haugen, H., Jelinek, L., Kelly, J. D., Madden, K., Maurer, M. F., Parrish-Novak, J., Prunkard, D., Sexson, S., Sprecher, C., Waggle, K., West, J., Whitmore, T. E., Yao, L., Kuechle, M. K., Dale, B. A. & Chandrasekhar, Y. A. Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function. *Cell* **104**, 9–19 (2001).
156. Rich, B. E. & Kupper, T. S. Cytokines: IL-20 - a new effector in skin inflammation. *Current Biology : CB* **11**, R531–4 (2001).
157. Achachi, A., Vocanson, M., Bastien, P., Peguet-Navarro, J., Grande, S., Goujon, C., Breton, L., Castiel-Higounenc, I., Nicolas, J.-F. & Gueniche, A. UV Radiation Induces the Epidermal Recruitment of Dendritic Cells that Compensate for the Depletion of Langerhans Cells in Human Skin. *The Journal of Investigative Dermatology* **135**, 2058–2067 (2015).
158. Cooper, K. D., Oberhelman, L., Hamilton, T. A., Baadsgaard, O., Terhune, M., LeVee, G., Anderson, T. & Koren, H. UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR+ epider-

- mal macrophage induction, and Langerhans cell depletion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8497–8501 (1992).
159. Takashima, A. UVB-dependent modulation of epidermal cytokine network: roles in UVB-induced depletion of Langerhans cells and dendritic epidermal T cells. *The Journal of Dermatology* **22**, 876–887 (1995).
160. Cumberbatch, M., Dearman, R. J. & Kimber, I. Characteristics and regulation of the expression on interleukin 1 receptors by murine Langerhans cells and keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* **290**, 688–695 (1998).
161. Nakahigashi, K., Kabashima, K., Ikoma, A., Verkman, A. S., Miyachi, Y. & Hara-Chikuma, M. Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *The Journal of Investigative Dermatology* **131**, 865–873 (2011).
162. Alferink, J., Lieberam, I., Reindl, W., Behrens, A., Weiss, S., Huser, N., Gerauer, K., Ross, R., Reske-Kunz, A. B., Ahmad-Nejad, P., Wagner, H. & Forster, I. Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen. *The Journal of Experimental Medicine* **197**, 585–599 (2003).
163. Arango Duque, G. & Descoteaux, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology* **5**, 491 (2014).
164. Theoharides, T. C., Alysandratos, K.-D., Angelidou, A., Delivanis, D.-A., Sismanopoulos, N., Zhang, B., Asadi, S., Vasiadi, M., Weng, Z., Miniati, A. & Kalogeromitros, D. Mast cells and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1822**, 21–33 (2012).
165. Tung, H.-Y., Plunkett, B., Huang, S.-K. & Zhou, Y. Murine mast cells secrete and respond to interleukin-33. *Journal of Interferon & Cytokine Research : the Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* **34**, 141–147 (2014).
166. Macleod, A. S. & Havran, W. L. Functions of skin-resident gammadelta T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* **68**, 2399–2408 (2011).
167. Jariashvili, K., Madhan, B., Brodsky, B., Kuchava, A., Namicheishvili, L. & Metreveli, N. UV damage of collagen: insights from model collagen peptides. *Biopolymers* **97**, 189–198 (2012).
168. Moon, H.-I., Lee, J., Zee, O. P. & Chung, J. H. Triterpenoid from *Tiarella polyphylla*, regulation of type 1 procollagen and MMP-1 in ultraviolet irradiation of cultured old age human dermal fibroblasts. *Archives of Pharmacal Research* **27**, 1060–1064 (2004).

169. Kontomaris, S. V., Yova, D., Stylianou, A. & Balogiannis, G. The effects of UV irradiation on collagen D-band revealed by atomic force microscopy. *Scanning* **37**, 101–111 (2015).
170. Brenneisen, P., Wlaschek, M., Schwamborn, E., Schneider, L.-A., Ma, W., Sies, H. & Scharffetter-Kochanek, K. Activation of protein kinase CK2 is an early step in the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1; MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts. *The Biochemical Journal* **365**, 31–40 (2002).
171. Tanaka, K., Hasegawa, J., Asamitsu, K. & Okamoto, T. Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor kappaB inhibitor, parthenolide. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **315**, 624–630 (2005).
172. Röck, K., Grandoch, M., Majora, M., Krutmann, J. & Fischer, J. W. Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ultraviolet B (UVB): new insights into mechanisms of matrix remodeling. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 18268–18276 (2011).
173. Rock, K., Tigges, J., Sass, S., Schutze, A., Florea, A.-M., Fender, A. C., Theis, F. J., Krutmann, J., Boege, F., Fritsche, E., Reifenberger, G. & Fischer, J. W. miR-23a-3p causes cellular senescence by targeting hyaluronan synthase 2: possible implication for skin aging. *The Journal of Investigative Dermatology* **135**, 369–377 (2015).
174. Bernstein, E. F., Brown, D. B., Urbach, F., Forbes, D., Del Monaco, M., Wu, M., Katchman, S. D. & Uitto, J. Ultraviolet radiation activates the human elastin promoter in transgenic mice: a novel in vivo and in vitro model of cutaneous photoaging. *The Journal of Investigative Dermatology* **105**, 269–273 (1995).
175. Moloney, S. J., Edmonds, S. H., Giddens, L. D. & Learn, D. B. The hairless mouse model of photoaging: evaluation of the relationship between dermal elastin, collagen, skin thickness and wrinkles. *Photochemistry and Photobiology* **56**, 505–511 (1992).
176. Aziz, J., Shezali, H., Radzi, Z., Yahya, N. A., Abu Kassim, N. H., Czernuszka, J. & Rahman, M. T. Molecular Mechanisms of Stress-Responsive Changes in Collagen and Elastin Networks in Skin. *Skin Pharmacology and Physiology* **29**, 190–203 (2016).
177. Imokawa, G. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibroblast-derived elastase. *Archives of Dermatological Research* **300 Suppl 1**, S7–20 (2008).

178. Sarchio, S. N. E., Scolyer, R. A., Beaugie, C., McDonald, D., Marsh-Wakefield, F., Halliday, G. M. & Byrne, S. N. Pharmacologically antagonizing the CXCR4-CXCL12 chemokine pathway with AMD3100 inhibits sunlight-induced skin cancer. *The Journal of Investigative Dermatology* **134**, 1091–1100 (2014).
179. Schweintzger, N. A., Bambach, I., Reginato, E., Mayer, G., Limon-Flores, A. Y., Ullrich, S. E., Byrne, S. N. & Wolf, P. Mast cells are required for phototolerance induction and scratching abatement. *Experimental Dermatology* **24**, 491–496 (2015).
180. Chacon-Salinas, R., Chen, L., Chavez-Blanco, A. D., Limon-Flores, A. Y., Ma, Y. & Ullrich, S. E. An essential role for platelet-activating factor in activating mast cell migration following ultraviolet irradiation. *Journal of Leukocyte Biology* **95**, 139–148 (2014).
181. Suurmond, J., Dorjee, A. L., Knol, E. F., Huizinga, T. W. J. & Toes, R. E. M. Differential TLR-induced cytokine production by human mast cells is amplified by Fc $\epsilon$ RI triggering. *Clinical and Experimental Allergy : Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology* **45**, 788–796 (2015).
182. van Nguyen, H., Di Girolamo, N., Jackson, N., Hampartzoumian, T., Bullpitt, P., Tedla, N. & Wakefield, D. Ultraviolet radiation-induced cytokines promote mast cell accumulation and matrix metalloproteinase production: potential role in cutaneous lupus erythematosus. *Scandinavian Journal of Rheumatology* **40**, 197–204 (2011).
183. Ravindran, A., Mohammed, J., Gunderson, A. J., Cui, X. & Glick, A. B. Tumor-promoting role of TGF $\beta$ 1 signaling in ultraviolet B-induced skin carcinogenesis is associated with cutaneous inflammation and lymph node migration of dermal dendritic cells. *Carcinogenesis* **35**, 959–966 (2014).
184. Norval, M. & Halliday, G. M. The consequences of UV-induced immunosuppression for human health. *Photochemistry and Photobiology* **87**, 965–977 (2011).
185. Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S. & Medzhitov, R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunology* **2**, 947–950 (2001).
186. Schauder, S. Solar urticaria. *Der Hautarzt; Zeitschrift fur Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* **54**, 952–958 (2003).
187. Gaye, B., Sikkema, D. & Lee, T. N. Development of an ultra-sensitive single molecule counting assay for the detection of interleukin-13 as a marker for asthmatic severity. *Journal of Immunological Methods* **426**, 82–85 (2015).

188. Wang, X., Ma, C., Zhang, Y., Ning, L., Chen, H. & Zhou, F. Clinical Significance of the Dynamic Changes in Serum Eotaxin, Interleukin 13 and Total IgE in Children with Bronchial Asthma. *Iranian Journal of Pediatrics* **23**, 525–530 (2013).
189. Zhu, J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* **75**, 14–24 (2015).
190. Yamashita, U. & Kuroda, E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Critical Reviews in Immunology* **22**, 105–114 (2002).
191. Yano, C., Saeki, H., Komine, M., Kagami, S., Tsunemi, Y., Ohtsuki, M. & Nakagawa, H. Mechanism of Macrophage-Derived Chemokine/CCL22 Production by HaCaT Keratinocytes. *Annals of Dermatology* **27**, 152–156 (2015).
192. Yu, S. H., Bordeaux, J. S. & Baron, E. D. The immune system and skin cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **810**, 182–191 (2014).
193. Swann, J. B., Vesely, M. D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 652–656 (2008).
194. Stockfleth, E., Trefzer, U., Garcia-Bartels, C., Wegner, T., Schmook, T. & Sterry, W. The use of Toll-like receptor-7 agonist in the treatment of basal cell carcinoma: An overview. *British Journal of Dermatology* **149**, 53–56 (2003).
195. Hameetman, L., Commandeur, S., Bavinck, J. N. B., Wisgerhof, H. C., Gruijl, F. R. d., Willemze, R., Mullenders, L., Tensen, C. P. & Vrieling, H. Molecular profiling of cutaneous squamous cell carcinomas and actinic keratoses from organ transplant recipients. *BMC Cancer* **13**, 58 (2013).
196. Sibiliala, M., Fleischmann, A., Behrens, A., Stingl, L., Carroll, J., Watt, F. M., Schlessinger, J. & Wagner, E. F. The EGF receptor provides an essential survival signal for SOS-dependent skin tumor development. *Cell* **102**, 211–220 (2000).
197. Fartasch, M., Diepgen, T. L., Schmitt, J. & Drexler, H. The relationship between occupational sun exposure and non-melanoma skin cancer: clinical basics, epidemiology, occupational disease evaluation, and prevention. *Deutsches Arzteblatt International* **109**, 715–720 (2012).