

Ein hoher Taurinlevel in der Haut ist ein natürlicher
zellulärer Schutzmechanismus gegen Ultraviolett B-induzierte
Immunsuppression in Mäusen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nicole Schade
aus Bockum-Hövel, jetzt Hamm (Westf.)

Düsseldorf, Mai 2006

Aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF)
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Esser

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2006

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
I.1. UVB-induzierte Immunsuppression	1
I.1.1. Ultraviolett B Strahlung	1
I.1.2. Die Entdeckung der UVB-induzierten Immunsuppression	2
I.1.3. Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen als Modell für UVB-induzierte Immunsuppression	4
I.1.3.a. Die Kontaktsensibilisierung	4
I.1.3.b. Induktionsphase: Sensibilisierung durch Erstkontakt	5
I.1.3.c. Effektorphase: Auslösung durch Zweitkontakt	6
I.1.3.d. Abklingen der allergischen Entzündungsreaktion	7
I.1.4. Veränderungen des zellulären Zusammenspiels bei der UVB-induzierten Immunsuppression	8
I.1.4.a. Epidermale Keratinozyten und UVB-induzierte lösliche Mediatoren	8
I.1.4.b. Langerhans Zellen als zelluläre Mediatoren	10
I.1.4.c. Regulatorische T-Zellen als Effektorzellen in der UVB-induzierten Immunsuppression	13
I.1.5. Primäre molekulare Zellschäden durch UVB-Bestrahlung	14
I.1.5.a. DNS-Schäden	15
I.1.5.b. Reaktive Sauerstoffspezies	17
I.1.5.c. Zellmembranveränderungen und Freisetzung des Lipidmediators PAF	18
I.1.6. Zelluläre endogene Mechanismen zum Schutz vor UVB-Schädigungen – Einflüsse auf die UVB-Empfindlichkeit	20
I.1.6.a. Bekannte endogene Schutzmechanismen	20
I.1.6.b. Osmolyte als neue Schutzmechanismen	21
I.2. Taurin – Schutz vor UVB-Strahlung?	22
I.2.1. Eigenschaften von Taurin	22
I.2.2. Die Taurintransporter-defiziente Maus	25
II. Wissenschaftliche Fragestellung der Dissertationsarbeit	27
III. Material und Methoden	28
III.1a. Chemikalien	28
III.1b. Laborgeräte	29
III.2. Versuchstiere und Tierhaltung	30
III.3. Genotypisierung von Mäusen	30
III.4. Messung der Taurinkonzentration in der Rückenhaut der Mäuse	32
III.5. Zellkultur primärer Maus-Keratinozyten	33
III.6. Quelle für UVB Strahlung	35

III.7. UVB Bestrahlung	35
III.8. Auslösen einer Kontaktsensibilisierung bei Mäusen	36
III.9. Behandlung mit cPAF und PCA-4248	38
III.10. PAF-Messung mittels „High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)“	38
III.11. RNS-Isolierung	42
III.12. Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)	42
III.13. Messung von DNS-Schäden	44
III.14. Statistische Auswertung	45
IV. Ergebnisse	46
IV.1. Homozygote Taurintransporter-defiziente Tiere haben eine stark reduzierte Taurinkonzentration, jedoch eine unveränderte Gesamtkonzentration an organischen Substanzen in der Rückenhaut.	46
IV.2. Homozygote Taurintransporter-defiziente Mäuse sind signifikant empfänglicher für UVB-induzierte Immunsuppression als Wildtyp-Mäuse	49
IV.3. UVB-Bestrahlung führt in homozygoten Taurintransporter-defizienten Mäusen nicht zu vermehrten DNS-Schäden im Vergleich zu heterozygoten Taurintransporter-defizienten und Wildtyp-Mäusen.	52
IV.4. UVB-bestrahlte primäre Maus-Keratinocyten von homozygoten Taurintransporter defizienten Mäusen produzieren größere Mengen an Plättchen-aktivierendem Faktor als primäre Maus-Keratinocyten von Wildtyp-Mäusen.	54
IV.5. UVB-Bestrahlung führt bei primären Maus-Keratinocyten von homozygoten Taurintransporter-defizienten Mäusen zu stärkerer Expression des Gens für Interleukin-10 als bei primären Maus-Keratinocyten von Wildtyp-Mäusen, aber zu gleicher COX-2 Expression.	57
IV.6. UVB-induzierte Immunsuppression kann durch Blocken des PAF Rezeptors ausschließlich in homozygoten Taurintransporter-defizienten Mäusen aufgehoben werden.	60
V. Diskussion	63
V.1. Die Haut der Taurintransporter-defizienten Maus	63
V.2. Höhere Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression durch Taurinmangel	65
V.3. Suche nach der molekularen Ursache	66
V.3.1. DNS-Schäden	66
V.3.2. Membranschäden	67
V.3.3. Veränderte Genexpression	70
V.3.4. Die Rolle des PAF-Rezeptors	73
V.4. Mögliche molekulare Schutzmechanismen des Taurins	76
V.4.1. Regulation des Hydratationszustands als kompatibles organisches Osmolyt	76
V.4.2. Stabilisierung der Zellmembran	77
V.4.3. Antioxidative Eigenschaften	79

V.4.4. Modulation der Ca ²⁺ -Verfügbarkeit	79
V.5. Schlussfolgerung	81
V.6. Medizinische Relevanz der Ergebnisse	82
VI. Zusammenfassung	85
VII. Abkürzungen	86
VIII. Literaturverzeichnis	88
IX. Lebenslauf	107
X. Danksagung	110
XI. Erklärung	111

I. Einleitung

I.1. UVB-induzierte Immunsuppression

I.1.1. Ultraviolett B Strahlung

Die Sonne emittiert ein sehr breites Spektrum an elektromagnetischer Strahlung. Sie strahlt nicht nur Wellenlängen im sichtbaren Bereich aus (400 – 700 nm), sondern umfasst das gesamte elektromagnetische Spektrum wie die hoch energetische kurzwellige Gamma- (< 0,5 nm) und Röntgenstrahlung (<10 nm), Ultraviolett (UV) Strahlung (10 – 400 nm), die Infrarotstrahlung (780 nm – 100.000 nm) wie auch die Mikro- und Radiowellen (> 1 mm) (Abb. I.1.). Die Zusammensetzung der Sonnenstrahlung, die die Erdoberfläche erreicht, wird modifiziert von der Erdatmosphäre. Je längerwellig die Strahlen werden, desto leichter passieren sie die Erdatmosphäre. Die größte atmosphärische Durchlässigkeit befindet sich im sichtbaren Bereich des Sonnenspektrums. Allerdings bestehen etwa 5% der elektromagnetischen Strahlung auf der Erdoberfläche aus Wellenlängen im UV-Bereich. Dabei macht die längerwellige UVA-Strahlung (320 – 400 nm) etwa 95 – 98% des UV-Spektrums auf der Erde aus, nur 2 – 5% dieses Bereiches bestehen aus den energiereicheren UVB-Strahlen (290 – 320 nm) (1).

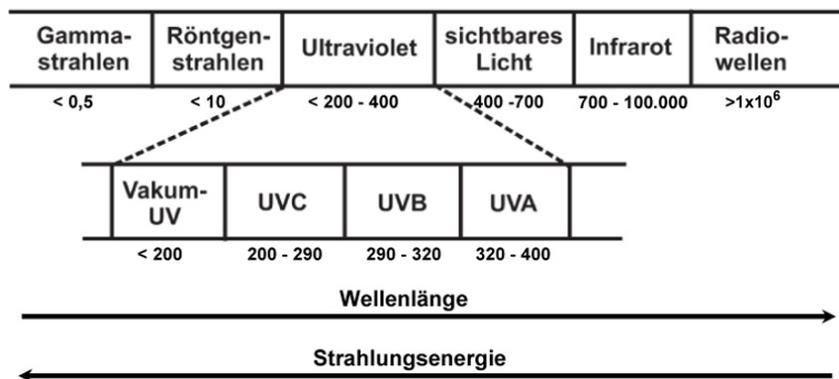


Abbildung I.1. zeigt schematisch den Wellenlängenbereich des Sonnenspektrums. Von photochemischer und biochemischer Bedeutung ist neben dem sichtbaren Bereich vor allem das Ultraviolett, das in die vier Unterbereiche Vakuum-UVC, UVC, UVB und UVA eingeteilt ist. In der vorliegenden Arbeit werden zelluläre und molekularbiologische Effekte der UVB-Strahlung untersucht. Zahlenangaben nennen die Wellenlängen in nm.

Die meisten Lebensprozesse auf der Erde sind abhängig von der Sonnenenergie. Von besonderer biologischer Bedeutung ist sowohl der sichtbare Bereich als auch der UV-Bereich. Beide spielen eine wichtige Rolle bei photochemischen und biochemischen Abläufen in lebenden Organismen wie beispielsweise der Photosynthese bei Pflanzen und der Synthese von Vitamin D beim Menschen. Das Sonnenlicht, insbesondere der energiereichere Bereich der UV-Strahlung, hat jedoch auch schädigende Wirkungen. Ausführlich beschrieben sind Zusammenhänge zwischen UV-Strahlen und Sonnenbrand und Entzündungsreaktionen (2;3),

frühzeitiger Hautalterung (4;5) und Immunsuppression und Hautkrebs (6-11). Obwohl der UVB-Anteil des Sonnenspektrums auf der Erdoberfläche kleiner ist als der UVA-Anteil, hat UVB-Strahlung ein erheblich höheres mutagenes Potential und gilt als Hauptverursacher der gesundheitsschädlichen UV-Auswirkungen (12).

I.1.2. Die Entdeckung der UVB-induzierten Immunsuppression

Die Absorption der hohen Strahlungsenergie versetzt Moleküle in einen angeregten Zustand, indem freie Elektronen auf energiereichere Schalen gehoben werden. Da solche freien Elektronen äußerst reaktiv sind, kann dieses Ereignis zu Konformationsänderungen und neuen Bindungen des Moleküls führen. Trifft UVB-Strahlung auf die Haut, wird der größte Teil der elektromagnetischen Energie von Molekülen innerhalb der Epidermis absorbiert, welche hauptsächlich aus Keratinozyten besteht, die die verschiedenen epidermalen Schichten aufbauen, und zu 2 – 4% aus Langerhans Zellen (LZ) (Abb. I.2.).

UVB-Strahlung kann das Erbmateriale Desoxyribonukleinsäure (DNS) in Hautzellen direkt schädigen und Genmutationen verursachen. Ein gut funktionierendes molekularbiologisches Reparatur- und zelluläres Immunsystem kann in der Regel geschädigte Zellen erkennen und reparieren oder irreparabel geschädigte Zellen beseitigen (13). Da das zelluläre Immunsystem jedoch durch UVB-Strahlung beeinflusst wird, indem zell-vermittelte Immunantworten unterdrückt werden (6;7;14;15), kann sich durch die Schwächung dieses zellulären Kontrollmechanismus klinisch erkennbarer Hautkrebs aus den UVB-geschädigten Hautzellen entwickeln.

Da Hauttumore bevorzugt an stark sonnenexponierten Hautstellen entstehen, erkannten Ärzte schon Anfang des letzten Jahrhunderts einen Zusammenhang zwischen Sonnenlicht und Hautkrebs. Margret Kripke und Kollegen waren die ersten Forscher, die in den 1970er Jahren eine Abhängigkeit zwischen UV-induzierter Immunsuppression und UV-induzierter Krebsentstehung beschrieben. In einer Serie von Experimenten konnten sie zeigen, dass UV-induzierte Hauttumore, die auf syngene Mäuse (syngen = genetisch übereinstimmend, z. B. bei Mäusen eines Inzuchtstammes) transplantiert wurden, von diesen abgestoßen wurden. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass UV-induzierte Hauttumore einen antigenen Phänotyp besitzen, welche durch ein intaktes Immunsystem beseitigt werden können. Wurden die syngenen Mäuse allerdings vor der Transplantation mit immunsuppressiven Medikamenten behandelt, oder – und das war die neue Erkenntnis – mit niedrigen UVB-Dosen bestrahlt, verloren diese die Fähigkeit, den Tumor abzustoßen und zu beseitigen (6-8;8;16). Diese Erkenntnisse lösten weltweite Forschungsaktivitäten aus, welche die zugrundeliegenden zellulären und molekularen Mechanismen aufklären. Hieraus entwickelte sich das Forschungsgebiet der Photoimmunologie. Es zeigte sich, dass die Mechanismen höchst komplex und noch längst nicht umfassend verstanden sind.

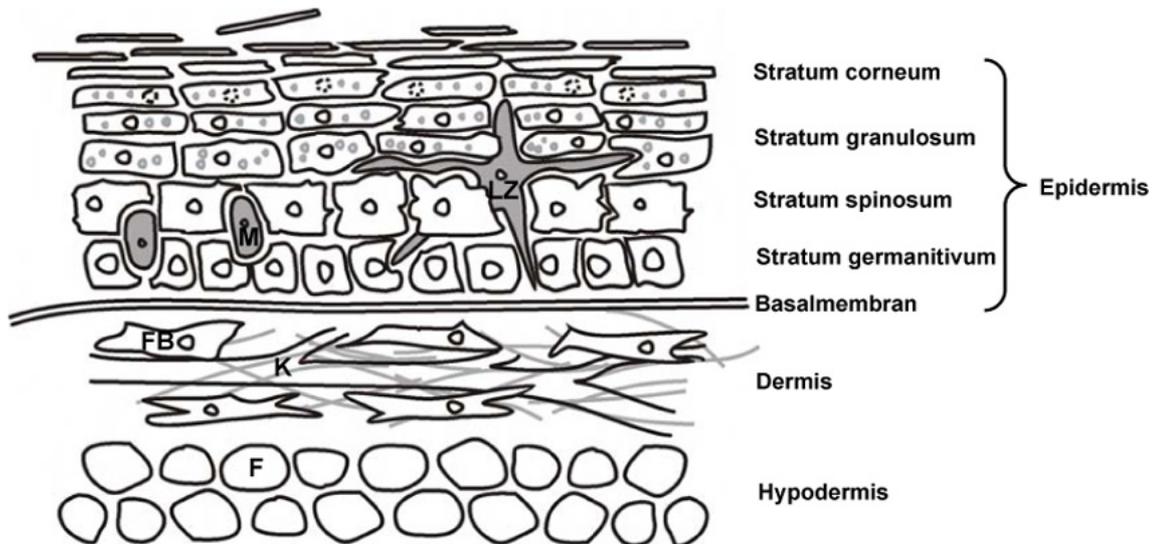


Abbildung 1.2. zeigt schematisch den schichtartigen Aufbau der Haut. Die Haut ist flächenmäßig das größte Organ, das sich aus drei funktionell unterschiedlichen Bereichen zusammensetzt, von außen nach innen 1) der Epidermis, 2) der darunterliegenden Dermis und 3) der Hypodermis. Die Dicke einer normalen Haut variiert je nach Region zwischen 1,5 und 4 mm. Die Epidermis ist ein geschichtetes, schuppenartiges Epithel, das eine durchschnittliche Dicke zwischen 0,4 bis 1,5 mm erreicht. Sie besteht aus mehreren Schichten von Keratinozyten, dem Hauptzelltyp der Epidermis, welche in distaler Richtung von mitotisch aktiven Zellen schrittweise zu abgestorbenen Hornzellen ausdifferenzieren. Ein wichtiges Merkmal von Keratinozyten sind die Keratinfilamente im Zytoplasma, welche Desmosomen oder ähnliche Verbindungen zwischen benachbarten Zellen formen. Die Epidermis selbst lässt sich in vier Schichten unterteilen. 1) Die innersten Basalzellschicht, die auch Stratum germanitivum genannt wird, besteht aus mitotisch aktiven Keratinozyten. 2) In distaler Richtung befindet sich oberhalb der Basalzellschicht das Stratum spinosum, deren Zellen als Stachelzellen bezeichnet werden (lat. spinae = Dornen). Die Stacheln sind Desmosomen und dienen dem mechanischen Halt zwischen den Zellen. 3) Die dritte Zellschicht ist das Stratum granulosum. Das hervorstechendste Merkmal sind die basophilen Keratohyalin granula. 4) Beim Übergang vom Stratum granulosum zum Stratum corneum leiten die Zellen ihren programmierten Zelltod ein. Ausdifferenzierte Hornzellen haben bis zu 86% ihres Nassgewichts verloren. In das dichte Netz aus Keratinozyten sind weitere Zelltypen eingelagert: Langerhans Zellen sind Dendritische Zellen, die aus dem Knochenmark stammen und in der Regel in normaler Haut die suprabasale Epidermalschicht besiedeln. Sie sind ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems der Haut. In der Basalzellschicht findet man außerdem Melanozyten, die das Pigment Melanin produzieren, und Merkel Zellen, die der Wahrnehmung mechanischer Reize dienen. Unterhalb der Epidermis befindet sich die Dermis, welche hauptsächlich aus Fibroblasten und von ihnen produzierten Kollagenkomplexen besteht. Sie ist durchzogen von Nervenfasern und einem fein kapillarisierten Blutgefäßsystem, das für den Gas- und Nährstoffaustausch der Haut sorgt. Über Lymphkapillaren steht die Haut außerdem mit dem peripheren Immunsystem in Kontakt. Die Dermis stellt den größten Anteil der Haut und ist verantwortlich für ihre Elastizität, Verformbarkeit und Zugfestigkeit. Die innerste Hautschicht, die Hypodermis, wird gebildet vom subkutanen Fettgewebe, das den Körper gegen Wärmeverlust isoliert, mechanische Trauma reduziert und am allgemeinen Energiestoffwechsel beteiligt ist.

Abkürzungen: F, Fettzelle; FB, Fibroblast; K, Kapillare; LZ, Langerhans Zelle; M, Melanozyt

I.1.3. Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen als Modell für UVB-induzierte Immunsuppression

Zur Untersuchung der UVB-induzierten Immunsuppression haben sich neben Tumormodellen insbesondere allergische Reaktionen vom verzögerten Typ gegen Antigene als auch Kontaktsensibilisierungen gegen Haptene, beides sogenannte Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen, als geeignete Standardmodelle erwiesen. Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen sind T-Zell-vermittelte Immunantworten, die entweder durch freie oder zell-assoziierte Antigene/Haptene hervorgerufen werden können. Da die maximale Ausprägung der Reaktion erst ein bis zwei Tage nach Antigen/Haptenkontakt erreicht wird, spricht man auch von Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ.

Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen und Tumorabstoßung haben einige immunologische Ähnlichkeiten, denn beide Formen der Immunantworten sind T-zell-vermittelte Immunreaktionen, die durch UVB-Bestrahlung unterdrückt werden können. Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen haben sich als Untersuchungsmodell weitestgehend durchgesetzt, da man es hierbei mit definierten Antigenen oder im Fall der Kontaktsensibilisierung mit Haptenen zu tun hat, während die Tumorantigene von UVB-induzierten Hauttumoren nur unzureichend charakterisiert sind. Der Einsatz von Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen bei der Analyse von UVB-induzierter Immunsuppression zeigt außerdem, dass die Immunsuppression durch UVB-Strahlung sich nicht auf antigene Tumorzellen beschränkt, sondern von allgemeinerer Natur ist. Aus praktischer Sicht ist der experimentelle Ablauf der Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen zudem weniger zeit- und arbeitsaufwändig als das Tumormodell.

Da in dieser Arbeit das Modell der Kontaktsensibilisierung eingesetzt wurde, um die Empfindlichkeit von Taurintransporter-defizienten Mäusen gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zu studieren, werden im Folgenden die immunologischen Mechanismen dieser Typ IV Überempfindlichkeitsreaktion näher beschrieben.

I.1.3.a. Die Kontaktsensibilisierung

Die Kontaktsensibilisierung ist eine spezielle Form der Typ IV Überempfindlichkeitsreaktion. Im Gegensatz zu klassischen Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen, bei denen eine intradermale Injektion eines Antigens erfolgen muss, wird die Kontaktsensibilisierung durch eine topische Applikation der sensibilisierenden Substanz auf die Epidermis hervorgerufen. Bei den sensibilisierenden Substanzen handelt es sich zumeist um Haptene.

Sensibilisierende Haptene sind chemisch reaktive Moleküle wie beispielsweise Nickel-Ionen, Oxazolone oder Dinitrofluorbenzol (DNFB), die zu klein für immunogene Wirkungen sind. Sie sind aber in der Lage, die Haut zu penetrieren und mit epidermalen oder dermalen Proteinen zu reagieren, sodass immunogene Konjugate entstehen. Diese werden dann von dendritischen Zellen (DZ) der Haut, hauptsächlich den Langerhans Zellen (LZ), aufgenommen und prozessiert. Manche Haptene reagieren auch direkt mit Proteinen, die bereits an den Haupthistokompatibilitätskomplexen MHC I oder MHC II-Molekülen gebunden sind (17). Bei der

Kontaktsensibilisierung können sowohl CD8⁺ (zytotoxische T-Zellen) als auch CD4⁺ T-Zellen (Helfer-T-Zellen oder inflammatorische T-Zellen) aktiviert werden (18-20).

I.1.3.b. Induktionsphase: Sensibilisierung durch Erstkontakt

Die Ausprägung einer Kontaktsensibilisierung erfolgt über zwei zeitlich getrennte Phasen: die Induktionsphase (afferente Phase) oder Sensibilisierung durch Erstkontakt und die Effektorphase (efferente Phase) oder Auslösung durch Zweitkontakt. In der Induktions/Sensibilisierungsphase erfolgt der erste Hautkontakt mit dem Hapten und die Ausbreitung von hapten-spezifischen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten. Die immunogenen Konjugate des Haptens werden zunächst von den DZ der Haut, zum Großteil von den LZ, aufgenommen. Die sogenannten starken Haptene wie DNFB besitzen zudem proinflammatorische Eigenschaften und lösen aufgrund ihrer Toxizität nach nur einmaliger Applikation eine Sensibilisierung aus (21). Dem Haptenkontakt folgt unter anderem die Freisetzung von Interleukin (IL)-1 β durch LZ und TNF- α und „Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)“ durch Keratinozyten (22), sogenannter Gefahrensignale, in der Haut, welche das Immunsystem in Alarmbereitschaft versetzen. Dieser Zytokincocktail stimuliert sowohl die Reifung der LZ zu Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) als auch die LZ-Migration über Chemokine und deren Rezeptoren (23-26). In den T-Zell-Bereichen der Lymphknoten präsentieren die zu APZ gereiften LZ ihre Hapten-Konjugat-beladenen MHC-Antigene den naiven T-Zellen, deren T-Zellrezeptor spezifisch für das jeweilige Hapten-Konjugat ist. Durch gleichzeitige kostimulatorische Signale der APZ durch die Bindung der Oberflächenmoleküle Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), CD40 und B7.1/B7.2 (CD80/CD86) an die entsprechenden Liganden „Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1)“, CD40 Ligand und CD28 der T-Zelle, setzt die T-Zelle den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 frei, sodass Proliferation und Differenzierung von der naiven T-Zelle zur hapten-spezifischen Effektorzelle beginnen (27). In diesem Prozess durchläuft die T-Zelle phänotypische Veränderungen zur Gedächtnis- bzw. Effektor-T-Zelle, die ihr eine Migration durch die lymphatischen Gefäße erleichtern und bevorzugt in die Haut leiten (28;29). Das immunologische Umgebungsmilieu, das für die Polarisierung der T-Zellen zur Th1 (inflammatorische T-Zellen, die Makrophagen aktivieren), Th2 (T-Helfer-Zellen, die B-Zellen aktivieren) oder regulatorischen T-Zelle (Tr1) verantwortlich ist, ist noch immer nicht vollständig aufgeklärt und häufig nicht eindeutig abzugrenzen. Allerdings scheinen Region und Zytokine beim ersten Allergenkontakt von entscheidender Bedeutung zu sein. Nach vorherrschender Meinung löst die CD40-abhängige IL-12 Produktion eine Differenzierung zur Th1-Zelle aus (30), welche die klassische Effektorzelle bei der zellvermittelten Immunantwort in der Kontaktsensibilisierung ist. Aktivierte Th1-Zellen aktivieren durch Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) in erster Linie Makrophagen und lösen in „FAS-associated cell surface antigen (FAS)“-exprimierenden Zellen über FAS-Liganden Apoptose aus (31). Neben den Th1-Zellen können abhängig vom Haptentyp, seiner Konzentration und dem induzierten Zytokinemilieu weitere T-Zellsubtypen zur klonalen Expansion aktiviert werden, wie Typ 1 CD8⁺ T-Zellen (Tc1) und regulatorische T-Zellen (Tr1), die unter IL-10-Einfluss gebildet werden (32;33). IL-10 führt außerdem eher zur Aktivierung von Th2-Zellen, die IL-4, IL-5 und IL-

10 produzieren und als B-Zellaktivatoren die Synthese von Immunglobulinen regulieren und in anderen Hauterkrankungen wie der atopischen Dermatitis eine Rolle spielen. Th2-Zellen scheinen aber auch vorherrschend bei verlängertem Allergenkontakt zu sein, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist (34). Die Sensibilisierungsphase der Kontaktsensibilisierung ist demnach gekennzeichnet durch eine Vielzahl verschiedener Zelltypen und löslicher Faktoren, die in einem komplexen Zusammenspiel die Ausprägung der Immunreaktion beeinflussen. Dabei muss erwähnt werden, dass diese Beschreibung der Kontaktsensibilisierung eine vereinfachte Darstellungsweise ist. In der Realität ist die Ausprägung wesentlich komplexer und wird durch weitere Faktoren beeinflusst. So spielt beispielsweise die Konzentration des Haptens eine entscheidende Rolle, welche APZ aktiviert werden und wie effektiv die Sensibilisierung verläuft oder ob sogar haptenspezifische Toleranz ausgelöst wird (35).

Zusammengefasst wird das Hapten oder immunogene Konjugat von den LZ in der Epidermis aufgenommen, zu den Lymphknoten transportiert und dort in immunologisch relevanter Weise den naiven T-Zellen präsentiert. Diese wandeln sich vom naiven Zustand zu haptenspezifischen Gedächtnis/Effektorzellen und patrouillieren in der Peripherie, was bei erneutem Haptenkontakt eine schnelle und ausgeprägte entzündliche Immunreaktion im Gewebe am Ort des Kontaktes zur Folge hat.

I.1.3.c. Effektorphase: Auslösung durch Zweitkontakt

Im Unterschied zur Sensibilisierungsphase, die klinisch meist symptomlos verläuft, zeigt sich bei wiederholtem Haptenkontakt eine Rötung und Schwellung des Gewebes und eine Akkumulation von haptenspezifischen T-Effektorzellen am Ort des Haptenkontaktes. Der exakte Mechanismus der Rekrutierung der Effektorzellen und deren Aktivierung im Gewebe ist noch immer nicht in vollem Umfang verstanden. Nach gängiger Ansicht wird eine Kontaktsensibilisierung nur dann in Gang gesetzt, wenn die Konzentration des Haptens beim wiederholten Hautkontakt ausreichend ist, um eine irritative Wirkung auf die Haut zu erzielen. Versuche an Mäusen haben gezeigt, dass sehr geringe Haptenkonzentrationen ohne Irritation keine Kontaktsensibilisierung hervorrufen, wohingegen dieselben Haptenkonzentrationen zur allergischen Dermatose führten, wenn gleichzeitig eine irrelevante Substanz appliziert wird, welche dann die irritativen Effekte in der Haut bewirkt (36). Als primäre Quellen für inflammatorische Zytokine dienen höchstwahrscheinlich die epidermalen Keratinozyten (37). Durch die Irritation werden innerhalb weniger Minuten nach Haptenkontakt TNF- α und IL-1 von Keratinozyten und LZ in den betroffenen Hautarealen freigesetzt (22). Diese Zytokine führen zur Lockerung des Zellverbundes und erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Zellmembran der Endothelzellen (38;39). Hierdurch wird die Infiltration von einer Reihe von Leukozyten, insbesondere von Gedächtnis-T-Zellen erleichtert. Aufgrund der Irritation sezernieren epidermale Zellen reaktive Produkte, welche zum lokalen Ödem und zur Vasodilatation führen. Die Keratinozyten sezernieren außerdem Chemokine, die Immunzellen wie Neutrophile, Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und weitere T-Zellen ins gereizte Gewebe rekrutieren (36;40;41). Zusätzlich sind auch dermale Mastzellen, die die vasoaktive Substanz

Serotonin freisetzen, an der Kontaktsensibilisierung beteiligt, was sowohl im humanen (42) wie auch im Maus-Modell (43) beobachtet wurde. Unklar ist dennoch, welcher Zelltyp oder welche Zelltypen tatsächlich die T-Effektorzellen aktivieren. Da T-Effektorzellen im Gegensatz zu naiven T-Zellen auch ohne Kostimulation zu aktivieren sind, ist es denkbar, dass neben professionellen APZ auch nicht-professionelle Zellen wie die Keratinozyten das Hapten präsentieren und die T-Effektorzellen aktivieren, zumindest bei MHC I-restringierten Immunreaktionen. Aktivierung der Effektorzellen führt zur Amplifikation der entzündlichen Immunreaktion. Im Fall der DNFB-vermittelten Kontaktsensibilisierung sind die vorherrschenden Effektorzellen Tc1-Zellen, welche IL-2 und IFN- γ freisetzen und in Keratinozyten Perforin-induzierte Apoptose auslösen, die zu mehr oder weniger ausgeprägten Hautschäden führt (44). IFN- γ induziert die Expression von ICAM-1 sowohl auf den Endothelzellen als auch auf den Keratinozyten (45-47), wodurch eine Kontaktaufnahme zu den T-Zellen ermöglicht und stabilisiert wird. Hervorgerufen durch IFN- γ und TNF- α erscheinen neben Adhäsionsmolekülen vermehrt MHC-Moleküle, darunter auch MHC II-Moleküle, auf der Zelloberfläche von LZ und Keratinozyten (22;48;49), so dass auch eine Aktivierung von eingewanderten CD4⁺ T-Zellen möglich ist.

1.1.3.d. Abklingen der allergischen Entzündungsreaktion

Nachdem das Maximum der allergischen Reaktion erreicht ist, klingt sie circa 24 – 48 Stunden nach Haptenkontakt allmählich ab, zum Einen durch das langsame Verschwinden des Haptens und hapten-beladener Zellen, zum Anderen aufgrund von regulatorischen Mechanismen. Ein entscheidender Faktor, der zum Rückgang der entzündlichen Th1-Antwort beiträgt, ist das Zytokin IL-10, welches die Freisetzung von Th1-Zytokinen inhibiert und die Reifung von DZ und deren IL-12-Freisetzung unterdrückt (50). Keratinozyten gelten mehr und mehr als Quelle für epidermales IL-10, welches in späteren Phasen der allergischen Kontaktdermatose vermehrt auftaucht (51-53).

Als IL-10-Produzenten dienen nach neueren Erkenntnissen aber auch sogenannte regulatorische T-Zellen (50;54). Unter dem Begriff „regulatorische T-Zelle“ sind allerdings verschiedene CD4⁺ T-Zell-Subtypen zusammengefasst, die man im Zusammenhang mit unterschiedlichen Immunantworten oder Erkrankungen beschrieben hat und deren regulatorische Eigenschaften entweder durch lösliche Faktoren (32;55;56) oder Zell-Zellkontakt erreicht werden (57;58).

Am Rückgang der allergischen Entzündung sind jedoch noch weitere Zellen und Mechanismen beteiligt. TGF- β unterdrückt die MHC II-Induktion bei LZ (59) und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen (60). In späteren Phasen der Reaktion spielt wohl auch die Degranulation von epidermalen Mastzellen eine Rolle, deren Histamin die Aktivität von CD8⁺ T-Zellen hemmt (61;62). Ebenfalls hemmend auf die Ausprägung einer Kontaktsensibilisierung wirken Prostaglandine, die von Makrophagen aber auch von IL1-aktivierten Keratinozyten ausgeschüttet werden (63;64). So ist bekannt, dass Prostaglandin E₁ (PGE₁) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) die Produktion von IL-2 und die Expression des IL-2-Rezeptors in T-Zellen hemmen können (65). Das bedeutet, dass auch den Rückgang einer allergischen Kontaktdermatose eine

Reihe von Zelltypen und Faktoren steuert, welche zusammen die Effektivität des Prozesses beeinflussen. Es erscheint demnach verständlich, dass sowohl die Stärke des Haptenreizes als auch das Zusammenspiel der aktivierenden und regulatorischen Mechanismen die Geschwindigkeit des Abklingens der allergischen Reaktion steuern.

I.1.4. Veränderungen des zellulären Zusammenspiels bei der UVB-induzierten Immunsuppression

UVB-induzierte Immunsuppression wird in zwei Arten unterschieden: 1) Von lokaler Immunsuppression spricht man, wenn eine Immunreaktion unterdrückt ist, bei der das Antigen oder Hapten auf UVB-exponierten Hautarealen aufgetragen wurde. 2) Von systemischer Immunsuppression ist die Rede, wenn eine Immunreaktion unterdrückt ist, bei der das Antigen oder Hapten auf Hautareale appliziert wurde, die dem UVB nicht ausgesetzt waren (66). Man geht davon aus, dass die UVB-Effekte auf die LZ die wichtigsten Faktoren in der lokalen Immunsuppression sind (67;68), während lösliche Faktoren für die Verbreitung systemischer Immunsuppression verantwortlich sind (69-71). Die Initiierung der lokalen und systemischen Immunsuppression kann demnach auf die gleichen Mechanismen zurückzuführen sein, wobei sich Ausprägung und Verbreitung beider Arten jedoch in nachgeschalteten Effekten unterscheiden müssen.

An der Entstehung eines immunsupprimierten Status initiiert durch UVB sind verschiedene Zelltypen der Haut und des Immunsystems inklusive ihrer löslichen Produkte beteiligt, die zunächst lokal an UVB-exponierten Hautarealen gebildet werden, um dann möglicherweise in die Peripherie zu wandern, und auf diese Weise für systemische Effekte verantwortlich sind.

I.1.4.a. Epidermale Keratinozyten und UVB-induzierte lösliche Mediatoren

Obwohl die epidermalen Keratinozyten aus klassischer Sicht nicht zu den Zellen des Immunsystems gezählt werden, sind sie dennoch nach neueren Erkenntnissen in umfangreicher Weise am Immunstatus der Haut beteiligt. Denn sie sind in der Lage, als Reaktion auf verschiedene Stimuli Adhäsionsmoleküle auszubilden und eine Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren freizusetzen (Abb. I.3.), was auf die Entwicklung einer Immunreaktionen auf vielfältiger Ebene Konsequenzen nach sich zieht. In vielen entzündlichen Hautreaktionen zeigen Keratinozyten hohe Expressionen an MHC II Molekülen (72) und ICAM-1 (73), die für die Kontaktaufnahme mit T-Zellen von entscheidender Bedeutung sind. Keratinozyten von Psoriasis-Patienten zum Beispiel synthetisieren zusätzlich die Zytokine IL-6 und IL-8 (74;75). Stimulierung von Keratinozyten mit Interferon γ (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) *in vitro*, führt ebenfalls zur Aufregulierung von MHC II Antigenen (48), ICAM-1 (45), IL-1 (76), IL-6 (77) und IL-8 (47). Derartige Veränderungen beeinflussen zum Einen auf autokrine Art die Keratinozyten selbst, zum Anderen haben sie Reaktionen bei anderen Zelltypen in der Haut zur Folge. So stimuliert die IL-1 Freisetzung die Synthese von Prostaglandinen in den Keratinozyten (64), während gleichzeitig IL-1 und TNF- α die Endothelzellen in der Dermis aktivieren. Diese exprimieren daraufhin vermehrt Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, E-Selektin und „Vascular cell adhesion

molecule-1 (VCAM-1)“ (38;39) auf ihrer Oberfläche, was das Anheften von zirkulierenden Lymphozyten erleichtert, die dann die Gefäßwand passieren können und durch Chemoattraktion angeleitet in die entzündlichen Hautareale einwandern. IL-10 und PGE₂ polarisieren die epidermalen LZ zu effektiven Stimulatoren für Th2-Zellen, eine Proliferation von Th1-Zellen können diese jedoch nicht auslösen, sondern rufen in ihnen vorzugsweise klonale Anergie (stark abgeschwächte oder vollständig ausbleibende Reaktionen) hervor (62;78).

Erste Hinweise für immunsuppressive lösliche Faktoren von Keratinozyten im Zusammenhang mit UVB-induzierter Immunsuppression stammen von Experimenten, die zeigten, dass Serumfaktoren von UVB-bestrahlten Mäusen oder Überstände aus UVB-exponierten epidermalen Zellen von Mäusen Überempfindlichkeitsreaktionen in Mäusen unterdrücken konnten (14;69;79). In darauffolgenden Studien stellte sich heraus, dass neben der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α und PGE₂ (80;81), die durch Chemotaxis Neutrophile und Makrophagen in die betroffenen Hautstellen locken, UVB Bestrahlung auch die durch Zytokine induzierbare Expression des ICAM-1 Moleküls, ein wichtiges kostimulatorisches Signal für naive T-Zellen, beeinflusst (82). Das von UVB-bestrahlten humanen Keratinozyten produzierte IL-1 (83;84) steigert zudem die Synthese von PGE₂ (64), für welches gezeigt wurde, dass es die Ausprägung von Kontaktsensibilisierungen reduziert (63;85).

Eine zentrale Rolle in der UVB-induzierten Immunsuppression spielen insbesondere die beiden immunsuppressiven Zytokine TNF- α (86) und IL-10 (87), die beide von Keratinozyten nach UVB-Stimulierung freigesetzt werden. Die morphologischen Veränderungen nach UVB-Exposition an murinen LZ, die man für die Suppression von Kontaktsensibilisierungen verantwortlich macht, ließen sich durch TNF- α -Injektionen nachahmen (88). Der Einsatz von neutralisierenden TNF- α -Antikörpern vor der UVB-Bestrahlung reduziert zumindest teilweise die Akkumulation von DZ in den Lymphknoten und die Suppression von Kontaktsensibilisierungen (89). Die Freisetzung von TNF- α ist insbesondere für die lokale Immunsuppression von Bedeutung. Allerdings fand man eine Suppression von Kontaktsensibilisierungen durch UVB-Bestrahlung auch bei TNF- α -Rezeptor-defizienten Mäusen (90), was darauf hindeutet, dass bei diesem Prozess zusätzlich noch andere Mechanismen beteiligt sein müssen.

Ein weiteres wichtiges Zytokin ist das IL-10. Es steuert offenbar sowohl die systemische als auch die lokale Immunsuppression entscheidend. So ließen sich die hemmenden Eigenschaften der Überstände von UVB-bestrahlten Keratinozyten auf Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ in Mäusen durch Anti-IL-10-Antikörper neutralisieren (87). Agatha Schwarz und Kollegen beobachteten, dass IL-10 *in vivo* die Induktionsphase nur von klassischen Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen blockiert, während die Effektorphase auch in Kontaktsensibilisierungen gehemmt wird (52). Unter Diskussion steht allerdings noch immer, dass der Hauptproduzent des epidermalen IL10 nicht die Keratinozyten sind, sondern CD11b⁺ Makrophagen, die nach UVB-Bestrahlung in die humane Haut wandern (91).

Neuere Forschungsberichte zeigen, dass neben der Sekretion von Zytokinen durch Keratinozyten nach UVB-Exposition UVB-bestrahlte Keratinozyten auch einen immunologisch

relevanten Lipidmediator, den Plättchenaktivierenden Faktor (PAF), freisetzen (92). Von diesem wird vermutet, dass er am Anfang einer Zytokinkaskade mit PGE₂, IL-4 und IL-10 steht, welche am Ende zu einer Hemmung von Th1-Antworten und zur UVB-induzierten Immunsuppression führt. Da PAF für die vorliegende Arbeit von zentraler Bedeutung ist, wird hierauf in der Einleitung unter *I.1.5.c. Zellmembranveränderungen und Freisetzung des Lipidmediators PAF* detaillierter eingegangen.

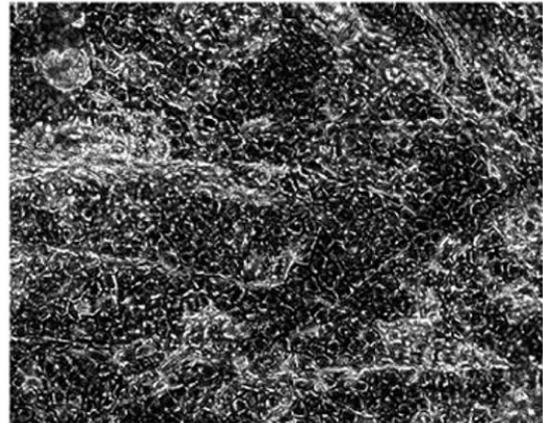
Die Zusammenhänge des zellulären Zusammenspiels, die zur UVB-induzierten Immunsuppression führen, sind in Abbildung I.4. (93) dargestellt.

I.1.4.b. Langerhans Zellen als zelluläre Mediatoren

LZ sind DZ, die aus dem Knochenmark stammen und in der Regel in normaler Haut die suprabasale Epidermalschicht besiedeln. Der Name stammt von ihrem Entdecker Paul Langerhans, der diese DZ erstmalig 1868 beschrieb und sie irrtümlich als intraepidermale Rezeptoren mit Verbindung zum Nervensystem auffasste (94). Spezielle tennisschlägerförmige Organellen im Zytoplasma, die Birbeck-Partikel, und die starke Ausprägung des Oberflächenmoleküls CD1a beim Menschen gelten als spezifisches Kennzeichen dieses Zelltyps. Die LZ sind in regelmäßigen Abständen zwischen den Keratinozyten lokalisiert und machen etwa 2 – 4% der gesamten epidermalen Zellpopulation aus (95). Die Dichte der LZ variiert jedoch sowohl zwischen den Spezies als auch innerhalb einer Spezies. Beispielsweise sind die Ohren und das Abdomen von Mäusen dichter von LZ besiedelt als etwa der Mausschwanz (96). Inzwischen gelten LZ als professionelle APZ der Epidermis (97). Sie sind in der Lage, sowohl primäre als auch sekundäre T-Zellantworten gegen Alloantigene, Haptene, lösliche Antigene und Tumorantigene zu induzieren. Der Befund, dass eine Kontaktsensibilisierung bei Mäusen gegen das Hapten DNFB nur über LZ-reiche Hautareale wie die dorsale und ventrale Haut, nicht aber über LZ-defiziente Hautareale wie dem Mausschwanz erreicht wird (67), zeigt die entscheidende Rolle der LZ bei der Auslösung von Immunreaktionen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei allogenen (allogen = genetisch unterschiedlich, beispielsweise Individuen unterschiedlicher Mausstämme) Transplantationsversuchen gemacht. LZ-freie Gewebeproben unterschiedlicher Mausstämme, die transplantiert wurden, überlebten ebenso lange wie Gewebeproben von syngenen Tieren, während es bei LZ-besiedelter Haut zu einer frühzeitigen Abstoßung kam (98). Untersuchungen zum Phänotyp der LZ zeigten, dass die Menge und Qualität der Ausprägung bestimmter Markerproteine vom umgebenden Milieu abhängig ist. (99).



Immunhistochemische Färbung von Langerhans Zellen (LZ) eines Epidermishäutchens eines Mausohrs mit einem I-A/I-E-Primärantikörper (MHC II).
Vergrößerung 1:400.



Mikroskopische Durchlichtaufnahme eines Epidermishäutchens eines Mausohrs. Man erkennt deutlich, dass die Keratinozyten ein enges Netzwerk bilden.
Vergrößerung 1:400.

Hautständige LZ:

- ATPase-Aktivität
- MHC I + II Antigene
- Fc IgG Rezeptoren II
- Fc IgE Rezeptoren I
- C3bi Rezeptoren
- E-Cadherine
- CD45 (hämatopoetischer Zellmarker)

Aktivierte LZ nach Antigenkontakt:

- ATPase-Aktivität ↓
 - Fc IgG Rezeptoren II ↓
 - E-Cadherine ↓
 - MHC I + II Antigene ↑
 - CD40 ↑
 - ICAM-1 ↑
 - B7 (CD80/CD86) ↑
 - IL-10 oder IL-12 ↑
- } Kostimulatorische Moleküle

Keratinozyten bei entzündlichen

Hautreaktionen:

- MHC II
- ICAM-1
- IL-1
- IL-6
- IL-8
- IL-10
- TNF- α
- PGE₂

Abbildung 1.3. Hautständige und aktivierte Langerhans Zellen zeigen einen unterschiedlichen Phänotyp, den man anhand der Menge und Qualität bestimmter Markerproteine erkennen kann. Epidermale Keratinozyten prägen bei entzündlichen Reaktionen vermehrt kostimulatorische Moleküle aus und sezernieren eine Reihe von löslichen Entzündungsmediatoren.

Inzwischen geht man davon aus, dass die epidermalen LZ dem klassischen Reifungsprozess von DZ zu APZ folgen: Gewebeständige DZ, wie die LZ werden als unreife DZ betrachtet und besitzen die Eigenschaft, fremde Antigene über Pinozytose, Phagozytose, Endozytose oder mittels Oberflächenrezeptoren aufzunehmen. Nach Aufnahme des Antigens beginnt die Reifung und Wanderung der DZ vom peripheren Gewebe zu den lymphatischen Organen, die über Cytokine und Chemokine aktiviert und gesteuert wird (100;101). Im Laufe ihrer Wanderung durch lymphatische Gefäße verlieren die DZ ihre Eigenschaft zur Antigenaufnahme und reifen

im Gegenzug zu professionellen APZ. Sie erlangen die Fähigkeit, das aufgenommene Antigen zu prozessieren und in Verbindung mit MHC Molekülen zur Zelloberfläche zu transportieren (102). MHC Moleküle werden vermehrt ausgeprägt, ebenso wie kostimulatorische Moleküle (103;104) (Abb. I.3.). Da DZ in der Lage sind, sowohl endogenes Antigen beispielsweise von Viren auf MHC I Molekülen als auch exogenes Antigen beispielsweise bakteriellen Ursprungs auf MHC II Molekülen auf ihrer Zelloberfläche auf immunologisch relevante Weise zu präsentieren, können sie entsprechend mit naiven $CD4^+$, $CD8^+$ und auch Gedächtnis-T-Zellen in den lymphatischen Organen in Kontakt treten und diese aktivieren. Neben konstitutiv produzierten Zytokinen setzen DZ bei Reifung eine Vielzahl an löslichen Zytokinen frei. Welches Zytokinmuster sezerniert wird, ist abhängig vom Stimulus, vom Reifegrad der DZ und wird beeinflusst vom Milieu und den bereits vorhandenen Zytokinen der Umgebung. Das Zytokinmuster der DZ entscheidet, ob die Immunantwort in Richtung einer Th1- oder einer Th2-Reaktion erfolgt (105). IL-12 begünstigt Th1-Antworten (106), IL-10 und PGE_2 dagegen Th2-Reaktionen (107;108).

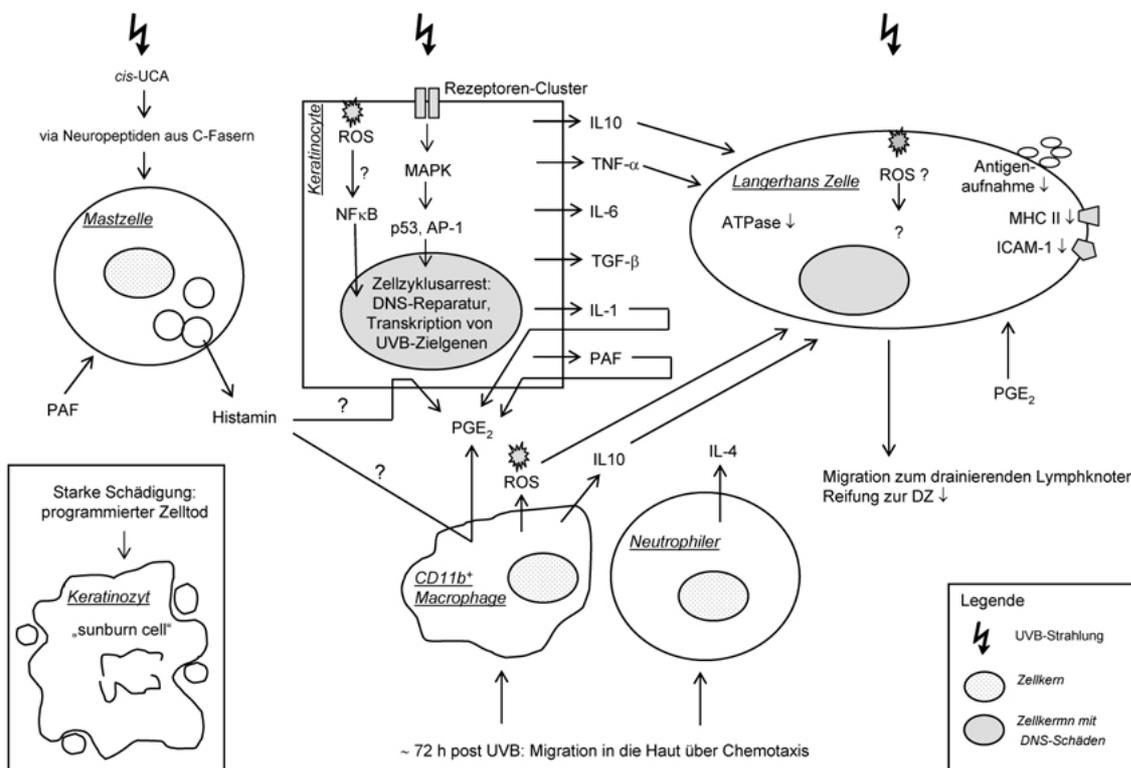


Abbildung I.4. zeigt schematisch vereinfacht den Einfluss von UVB-Strahlung auf die verschiedenen Zelltypen der Haut sowie auf die Kommunikation der Zellen untereinander (modifiziert nach (93)).

LZ in bestrahlten Hautarealen temporär zu reduzieren (67), scheint eine entscheidende Eigenschaft der UVB-Strahlung zu sein. Während die Anzahl der LZ in der Haut abnimmt, wächst die Zahl der DZ in den drainierenden Lymphknoten. So wurde beschrieben, dass UVB-

Bestrahlung allein schon die Migration von LZ zu den drainierenden Lymphknoten in Mäusen induziert, was durch Antigenapplikation nach der Bestrahlung weiter gesteigert werden kann (109). UVB-induzierte Migration von LZ wurden auch beim Menschen *in vivo* beobachtet (110). Neben dem UVB-induzierten Verlust an LZ in der bestrahlten Haut, beeinflusst UVB auch die Funktion der LZ: So ist seit langem bekannt, dass UVB die Expression von MHC II Molekülen bei der Maus und beim Menschen unterdrückt (68). Zusätzlich reduzieren niedrige UVB-Dosen die ICAM-1 Expression auf kultivierten APZ (111) und murinen LZ *in vitro* (112). Man vermutet, dass die UVB-verursachte Hemmung der ICAM-1-Expression bei humanen APZ aufgrund geschädigter DNS hervorgerufen wird, da die ICAM-1 Expression mit Hilfe von DNS-Reparaturenzymen wieder hergestellt werden kann (113). Außerdem verschiebt sich das Zytokinprofil von UVB-behandelten LZ/DZ durch eine gehemmte IL-12-Freisetzung zugunsten von Th2-Antworten und unterdrückt Th1-Antworten (114), zu denen sowohl klassische Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen, Kontaktsensibilisierungen und auch die Tumorabstoßung zählen. Vor Kurzem beobachtete eine japanische Forschergruppe außerdem, dass UVB-Bestrahlung die Endozytoseaktivität von LZ-ähnlichen DZ mindert, woraufhin Reifung und Migrationsfähigkeit verschlechtert waren (115).

1.1.4.c. Regulatorische T-Zellen als Effektorzellen in der UVB-induzierten Immunsuppression

Zusätzlich zur UVB-induzierten Suppression einer Kontaktsensibilisierung, wird auch eine sogenannte immunologische Toleranz durch UVB induziert. Diese Feststellung stützt sich auf der Beobachtung, dass eine erneute Sensibilisierung mit demselben Hapten wie bei der Erstsensibilisierung über nicht UVB-exponierte Hautareale zu keiner oder einer nur geringen Ausprägung der Kontaktsensibilisierung führt (116). Überträgt man Zellsuspensionen der Milz oder Lymphknoten von UVB-bestrahlten und anschließend mit DNFB sensibilisierten Mäusen adoptiv auf naive syngene Mäuse, zeigen diese Rezipienten nach Sensibilisierung mit demselben Hapten eine deutlich verschlechterte Reaktion bei der allergischen Kontaktdermatose als Kontrollmäuse, die Zellsuspensionen von unbehandelten Tieren erhalten hatten (117). Die Schlussfolgerung hieraus war, dass sich in der Zellsuspension der Tiere, die mit UVB und DNFB behandelt waren, antigen-spezifische T-Suppressorzellen befinden. Diese Annahme konnten viele verschiedene Arbeitsgruppen bestätigen. Phänotypische Charakterisierungen ergaben jedoch auch hier wieder abhängig vom Untersuchungsmodell ein heterogenes Bild der UVB-induzierten T-Suppressorzellen (58;118-120), die man heute zu den regulatorischen T-Zellen zählt.

Aus den verschiedenen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen an der UVB-induzierten Immunsuppression beteiligt sind, wobei die CD4⁺ T-Zellen wahrscheinlich eine regulatorische Funktion auf die CD8⁺ Effektorzellen ausüben. Die wichtigsten Mechanismen scheinen dabei die Hemmung der IL-2-Freisetzung über eine Bindung an das kostimulatorische Oberflächenmolekül „Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4“ (CTLA-4) zu sein, sowie die Produktion großer Mengen an IL-10, welches die

Funktion der APZ beeinflusst. Ob es sich dabei um einen einzigen T-Zelltyp handelt oder um unterschiedliche, ist zurzeit noch unbekannt.

Neben den CD4⁺ regulatorischen T-Zellen wurden in der UVB-induzierten systemischen Immunsuppression auch sogenannte „Natural killer T-cells“ (NKT-Zellen) mit regulatorischer Kapazität beschrieben. Moodycliffe und Kollegen fanden CD3⁺ CD4⁺ DX5⁺ und CD1-restringierte NKT Zellen, die hauptsächlich IL-4 freisetzen und über adoptiven Transfer sowohl eine Abstoßung von UVB-induzierten Tumoren als auch klassische Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Antigene verhindern (56).

Insgesamt lässt sich resümieren, dass eine UVB-induzierte Immunsuppression durch eine komplexe Summe aus einem immunregulatorischen Zytokincocktail, dem Ungleichgewicht von Th1/Th2-Antworten, der Induktion regulatorischer T-Zellen und verschlechterter Antigenpräsentation bei LZ entsteht.

I.1.5. Primäre molekulare Zellschäden durch UVB-Bestrahlung

Wie aber verursacht UVB die zuvor beschriebenen phänotypischen Veränderungen der Zellen und deren veränderte Interaktion? Trifft UV-Strahlung auf die Haut, wird ein großer Teil der Strahlung durch Reflektion und Streuung zurück emittiert. Ein kleinerer Teil der Strahlung jedoch dringt in die Haut ein und wird dort aufgenommen von Molekülen, die man aufgrund ihrer Eigenschaft, UV-Strahlung bzw. Licht zu absorbieren, als Chromophore bezeichnet. Bei diesem Ereignis überträgt sich die Energie der elektromagnetischen Strahlung des UVB auf die Chromophoren innerhalb des Gewebes, wobei die elektromagnetische Strahlung in chemische Energie umgewandelt wird. Diese Umwandlung ist der zentrale photobiologische Schritt, denn das Chromophor gelangt in einen angeregten und reaktiven chemischen Zustand, der Konformationsänderungen und sogar Änderungen kovalenter Bindungen des Moleküls zu Folge hat. Solche Änderungen beeinflussen die Funktionalität der entsprechenden Moleküle. Moleküle, die nach UV- oder Lichtabsorption ihre Struktur verändert haben, nennt man Photoprodukte.

UVB-Strahlung, die in die Haut eindringt, wird zum größten Teil von Chromophoren innerhalb der Epidermis absorbiert, während die längeren Wellenlängen der UVA-Strahlung noch zu weiten Teilen tiefere Schichten der Haut penetriert und somit neben der Epidermis auch viele Schäden in der Dermis verursacht. Zu den primären UVB-verursachten Schäden, die mit UVB-induzierter Immunsuppression in Verbindung stehen, zählen die Isomerisierung von *trans*-Urokaninsäure zur *cis*-Form innerhalb des Stratum corneums (121-125), nukleäre DNS-Schädigungen (126), die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (127) und Zellmembranveränderungen (92). Da in der vorliegenden Arbeit UVB-induzierte DNS- und Zellmembranschäden eingehender untersucht wurden, sollen diese im Folgenden genauer beschrieben werden. Da UVB-induzierte ROS mit Zellmembranschäden in engem Zusammenhang stehen, wird auch diesen untenstehend ein eigenes Unterkapitel gewidmet.

I.1.5.a. DNS-Schäden

Die nukleäre DNS enthält Purin- und Pyrimidinbasen, deren Absorptionsmaxima zwischen 230 und 300 nm liegen (128). Daher dient die nukleäre DNS als Chromophor für UVC- aber auch für UVB-Strahlung und ist ein direktes Angriffsziel. Bei der Absorption der elektromagnetischen Energie des UVB-Lichts entstehen eine Reihe verschiedener Photoprodukte innerhalb des DNS-Moleküls. Die häufigsten sind die sogenannten (6-4)-Photoprodukte, bei denen sich eine Pyrimidinbase mit einer benachbarten Cytosinbase kovalent verbindet, und Cyclobutanpyrimidindimere (CPD), die aufgrund einer kovalenten Bindung zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen desselben DNS-Stranges entstehen (129;130) (Abb. I.5.). Man hat CPD in menschlicher Haut (131) als auch in der Haut von Mäusen (132) nach UVB-Bestrahlung nachgewiesen. UVB-induzierte DNS-Schäden findet man im Grunde in allen hautansässigen Zelltypen, die der UVB-Strahlung exponiert sind, was bedeutet, dass sowohl die Keratinozyten (133) als auch die LZ (134) betroffen sind.

Die Bildung von CPD in den Hautzellen ist eine unmittelbare Ursache für die UVB-induzierte Immunsuppression, wie 1989 erstmals nachgewiesen wurde. Dieser Zusammenhang konnte in einer UV-Studie am Opossum *Monodelphis domestica* gezeigt werden (126). Die Zellen dieses Tieres verfügen über endogene Reparaturenzyme, die mit Hilfe von photoreaktivierendem Licht (sichtbarer Bereich) aktiviert werden und spezifisch CPD abbauen. So fand man heraus, dass UVB-induzierte Immunsuppression in den Opossums vermieden werden konnte, wenn diese unmittelbar nach UVB-Exposition mit photoreaktivierendem Licht behandelt wurden. Einen Zusammenhang zwischen CPD und UVB-induzierter Immunsuppression konnte man auch in Mäusen feststellen (135). Die Applikation von Liposomen, die das DNS-Reparaturenzym T4 Endonuklease V enthielten, auf UVB-exponierte Hautareale reduzierte zum Einen die Anzahl der Hautzellen mit nachweisbaren DNS-Schäden und verhinderte zum Anderen die UVB-induzierte Suppression von sowohl klassischen Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen als auch Kontaktsensibilisierungen. Auf der Suche nach den verantwortlichen Zellen, fand man kurze Zeit später heraus, dass UVB-Bestrahlung die Bildung von CPD in den APZ verursacht, die daraufhin vermutlich ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation verlieren (134). Die DNS-Schäden waren noch einige Tage nach der UVB-Behandlung nachweisbar, und man fand nach Sensibilisierung mit „Fluorescein isothiocyanate (FITC)“ UVB-geschädigte Zellen vermehrt in den drainierenden Lymphknoten. Applizierte man den Mäusen direkt nach der UVB-Bestrahlung Liposomen mit T4 Endonuklease V auf die UVB-exponierten Hautstellen, waren weniger DNS-geschädigte APZ in den Lymphknoten zu finden und die verschlechterte Antigenpräsentation konnte vermieden werden. Vergleichbare Schlussfolgerungen konnte man nach *in vitro* Inkubation von APZ aus UVB-bestrahlten und haptent-behandelten Mäusen mit Photolyase-haltigen Liposomen machen (136). Photolyase ist ein Reparaturenzym der Alge *Anacystis nidulans*, das ähnlich dem Enzym von *Monodelphis domestica* durch photoreaktivierendes Licht aktiviert wird und spezifisch CPD beseitigt. Diese Behandlung reduzierte die DNS-Schäden, stellte *in vivo* die Fähigkeit der APZ zur Antigenpräsentation wieder her und hemmte die Induktion von supprimierenden T-Zellen.

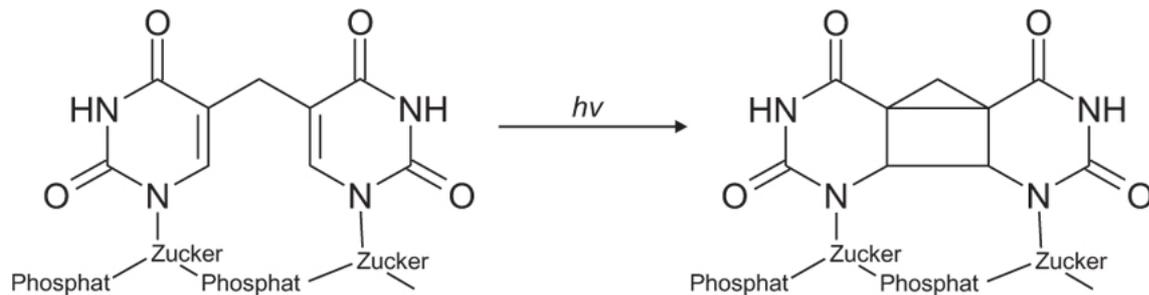


Abbildung 1.5. UVB Strahlung führt zu Photoprodukten in der DNS. Eine der häufigsten UVB-induzierten DNS-Schädigung ist die Bildung von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPD) zweier benachbarter Pyrimidinbasen.

So verfolgt man heute folgende Theorie: UVB-bestrahlte APZ, deren Stärke der DNS-Schädigung unterhalb eines Apoptose-induzierenden Schwellenwertes liegt, leiden unter einer Transkriptionsreduktion von Genen, die zur Antigenpräsentation benötigt werden. Dabei darf man jedoch nicht außer Acht lassen, dass auch die DNS-geschädigten Keratinozyten die Antigenpräsentation von APZ beeinflussen können, indem sie nach UVB-Bestrahlung einen veränderten Zytokincocktail produzieren (siehe 1.1.4.a *Epidermale Keratinozyten und UVB-induzierte lösliche Faktoren*). Studien an Patienten mit einem Defekt in der DNS-Reparatur unterstützen die Rolle der Gentranskription in der UVB-induzierten Immunsuppression (137). Der Vergleich zweier solcher Erkrankungen, nämlich Xeroderma pigmentosum D und Trichothiodystrophy, zeigte, dass das Hautkrebsrisiko dieser Patienten mit der zellulären Empfänglichkeit von UVB-induzierter Hemmung der ICAM-1-Ausprägung korreliert und nicht mit einem Defekt in der DNS-Reparatur. Obwohl bei beiden Erkrankungen eine Mutation in dem selben DNS-Reparaturgen vorliegt, haben nur Patienten mit Xeroderma pigmentosum D ein erhöhtes Hautkrebsrisiko. Und lediglich in den Zellen dieser Patienten konnte eine UVB-abhängige Reduktion in der ICAM-1-Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Modulation der Transkription immunologisch relevanter Gene durch UVB Einfluss hat auf das Risiko, Hautkrebs zu entwickeln. Eine weitere Studie an gesunden Probanden unterstützt die Rolle der DNS-Schäden in der UVB-induzierten Immunsuppression (138). Hier zeigte sich, dass eine topische Applikation von Photolyase-haltigen Liposomen auf UVB-exponierte Hautareale eine UVB-induzierte Hemmung der ICAM-1-Expression in der Epidermis und eine UVB-induzierte Suppression der Effektorphase bei einer Kontaktsensibilisierung gegen Nickel bei Nickel-Allergikern aufhebt.

Obwohl die UVB-induzierten DNS-Schäden im Nukleus neben der Isomerisierung von *trans*-Urokaninsäure zur *cis*-Form lange als einzige molekulare Ursache für die UVB-induzierte Immunsuppression galt, mehrten sich im Laufe der letzten Jahre Hinweise, dass auch andere molekulare Strukturen und Zellkompartimente wie das Zytoplasma und die Zellmembran an diesem Phänomen ihren Anteil tragen.

I.1.5.b. Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species, ROS“) entstehen kontinuierlich als Nebenprodukte bei aeroben Stoffwechselprozessen, hauptsächlich in den Mitochondrien bei der oxidativen Phosphorylierung. Zu den ROS zählt man beispielsweise Singulett-Sauerstoff, organische Peroxide und Wasserstoffperoxide als auch Radikale wie das Superoxidanion und Hydroxylradikale. ROS sind äußerst instabil und aggressiv und reagieren extrem schnell mit anderen Molekülen, die sich in ihrer unmittelbaren Umgebung befinden. Daher ist das Vorhandensein von ROS eine Quelle für eine ganze Reihe von Zellschäden wie etwa der Lipidperoxidierung, DNS-Strangbrüche, DNS-Protein-Verbindungen und den Verlust von Sulfhydrylgruppen in Proteinen, was zur Inaktivierung der Enzyme führt. Um einen übermäßigen oxidativen Stress aufgrund von ROS unter Kontrolle zu halten, haben Zellen ein antioxidatives Verteidigungssystem aufgebaut, das sich zum einen aus nichtenzymatischen Radikalfängern wie α -Tocopherol (Vitamin E) und Vitamin A, zum anderen aus sogenannten Scavengerenzymen wie der Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalasen zusammensetzt (139).

Bei der Absorption der hohen Strahlungsenergie von UVB entstehen in Hautzellen ROS (140;141), vorwiegend in oder nahe der Zellmembran wie Lipidperoxiden (142). Eine Zunahme der Synthese und Enzymaktivität von ROS-Beseitigern wurde in kultivierten humanen Keratinozyten nach UVB-Behandlung festgestellt (143). Das bedeutet, dass die Zellen mit einer Steigerung ihres antioxidativen Verteidigungssystem nach ROS-Bildung reagieren. Aber auch eine UVB-induzierte Katalase-Aktivität von Keratinozyten scheint die Bildung von ROS nach UVB noch weiter verstärken zu können (144).

Die Folgen der ROS-Bildung sind vielfältig. So wurde beispielsweise gezeigt, dass Wasserstoffperoxid für die UVB-induzierte Apoptose in Keratinozyten verantwortlich ist (145). UVB-induzierte ROS beeinflussen außerdem die Transkription in Hautzellen, wie die Aktivität des Transkriptionsfaktors „Activator protein-1 (AP-1)“ in humanen Keratinozyten (146) und die Induktion von Matrixmetalloproteinasen in humanen Fibroblasten (147). Neben den Keratinozyten sind aber auch die LZ von ROS-Einflüssen betroffen. So vermutet man, dass ROS das Verschwinden von LZ aus der Haut und aufgrund der Lipidperoxidationen in der Plasmamembran deren reduzierte Antigenpräsentation verursachen (127). Damit haben ROS auch eine Bedeutung in der UVB-induzierten Immunsuppression. Dies zeigte sich insbesondere in einer Reihe von Studien, bei denen topische Applikationen von Antioxidantien, speziell von sekundären Pflanzenstoffen die UVB-induzierte Immunsuppression in Mäusen hemmten (148-150). Bei der Interpretation der schützenden Eigenschaften der sekundären Pflanzenstoffe ist allerdings zu berücksichtigen, dass deren Schutz nicht einzig auf der Reduktion des oxidativen Stresses beruht, sondern sich möglicherweise auch auf ihre Fähigkeit stützt, in zelluläre Signalwege einzugreifen. So wurde auch festgestellt, dass die polyphenolische Fraktion aus Grünem Tee die UVB-induzierte Aktivierung von AP-1 und eine gesteigerte Prostaglandinsynthese hemmt (151). Silymarin reduziert möglicherweise über den Transkriptionsfaktor „nuclear factor kappa B, (NF κ B)“ eine UV-induzierte Cyclooxygenase-Induktion (152).

I.1.5.c. Zellmembranveränderungen und Freisetzung des Lipidmediators PAF
Nachdem die nukleären DNS-Schädigungen lange Zeit zum Großteil als molekulare Ursache der UVB-induzierten Immunsuppression betrachtet worden sind, da die DNS als direktes Chromophor für UVB-Strahlung dient, rückt seit Neuerem auch die Zellmembran als Ziel für UVB-induzierte Schädigungen ins Zentrum wissenschaftlicher Forschung, obwohl hier kein direktes Chromophor für UVB identifiziert wurde.

Die Zellmembran besteht aus einer dünnen Lipiddoppelschicht, in die verschiedene Proteine eingelagert sind, und dient der Zelle zur Kommunikation mit ihrem Umgebungsmilieu sowie den benachbarten Zellen. In den meisten tierischen Zellen haben die Lipide einen Anteil von 50%, welcher sich neben Cholesterol und Glykolipiden aus den vier Phospholipiden Sphingomyelin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin zusammensetzt. Die Zellmembran wird vor allem durch nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten, und man kann sie als ein dynamisches, flüssiges Kompartiment betrachten, in dem sich die einzelnen Bestandteile bewegen und ihre Position verändern können. Darüberhinaus kann die Zelle die Lipidzusammensetzung ihrer Plasmamembran variieren in Abhängigkeit von äußeren Faktoren, wie beispielsweise der Temperatur.

Da die Zellmembran die Grenze zwischen Zellinnerem und der äußeren Umgebung bildet, ist sie das erste Zellkompartiment, das mit UVB-Strahlung in Kontakt kommt, und es hat sich gezeigt, dass sie ein wichtiges Ziel für UVB-induzierte Veränderungen ist. Membranproteine, die ihr Absorptionsmaximum um ca. 280 nm haben, könnten von UVB-Strahlung direkt attackiert werden. Das kann Konformations- und damit Funktionsänderungen zur Folge haben. In der Tat wurden Veränderungen von Zellmembranrezeptoren nach UVB-Exposition gefunden. In HeLa-Zellen (eine maligne Epithelzelllinie der Gebärmutter Schleimhaut) führte UVB-Bestrahlung zu „Clustern“ von Oberflächenrezeptoren wie den „Epidermal growth factor receptor (EGFR)“, TNF- α - und IL-1-Rezeptor ohne die entsprechenden Liganden. Die Clusterbildung führte zur Aktivierung der stress-induzierten „cJun-NH2-terminal kinase (JNK)“, ein Mitglied der „Mitogen-activated protein kinase (MAPK)“-Familie (153). Das bedeutet, dass UVB direkt zur Aktivierung von Signalwegen mit Einfluss auf immunologische Antworten führen kann, die normalerweise nur von den entsprechenden Liganden induziert werden. Ligandenunabhängige Aktivierung durch UVB wurde auch für FAS gefunden, was zur UVB-induzierten Apoptose führt (154). Es wurde aber auch gezeigt, dass UVB nicht unmittelbar, sondern über ROS-Bildung die Aktivierung von Rezeptoren wie dem „Keratinocyte growth factor receptor, (KGFR)“ hervorruft (155).

UVB-induzierte ROS können auch in der Freisetzung von Lipidmediatoren involviert sein. Im Zusammenhang mit UVB-induzierter Immunsuppression wurde kürzlich gezeigt, dass Keratinozyten unter UVB-Bestrahlung aus dem Membranlipid Phosphatidylcholin den Lipidmediator PAF bzw. PAF-ähnliche Lipide vermehrt freisetzen, die durch Lipidoxidationen entstehen können und ursächlich an der UVB-induzierten Unterdrückung von Th1-Antworten beteiligt sind (92). PAF bezeichnet eine Familie von Membranlipiden mit der chemischen Grundformel 1-O-Alkyl-2-Acetyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin, bei denen sich der Alkylrest unterscheiden kann. Der Name PAF stammt von der Entdeckung einer Substanz, die von IgE-

stimulierten Basophilen freigesetzt wird und zur Aggregation von Blutplättchen führt (156). Später stellte sich heraus, dass dieses bioaktive Phospholipid an einer Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt ist, wie etwa Wundheilung, allergischen Reaktionen, Entzündungen, endotoxischem Schock, Zellproliferation, in der Reproduktion oder der Entwicklung des zentralen Nervensystems (siehe Review Ref. (157)). Entsprechend lang ist die Liste an Zelltypen, die auf exogene Reize mit der Freisetzung von PAF reagieren, ebenso wie die Liste an Zellen, die durch PAF stimuliert werden können (Abb. I.6.).

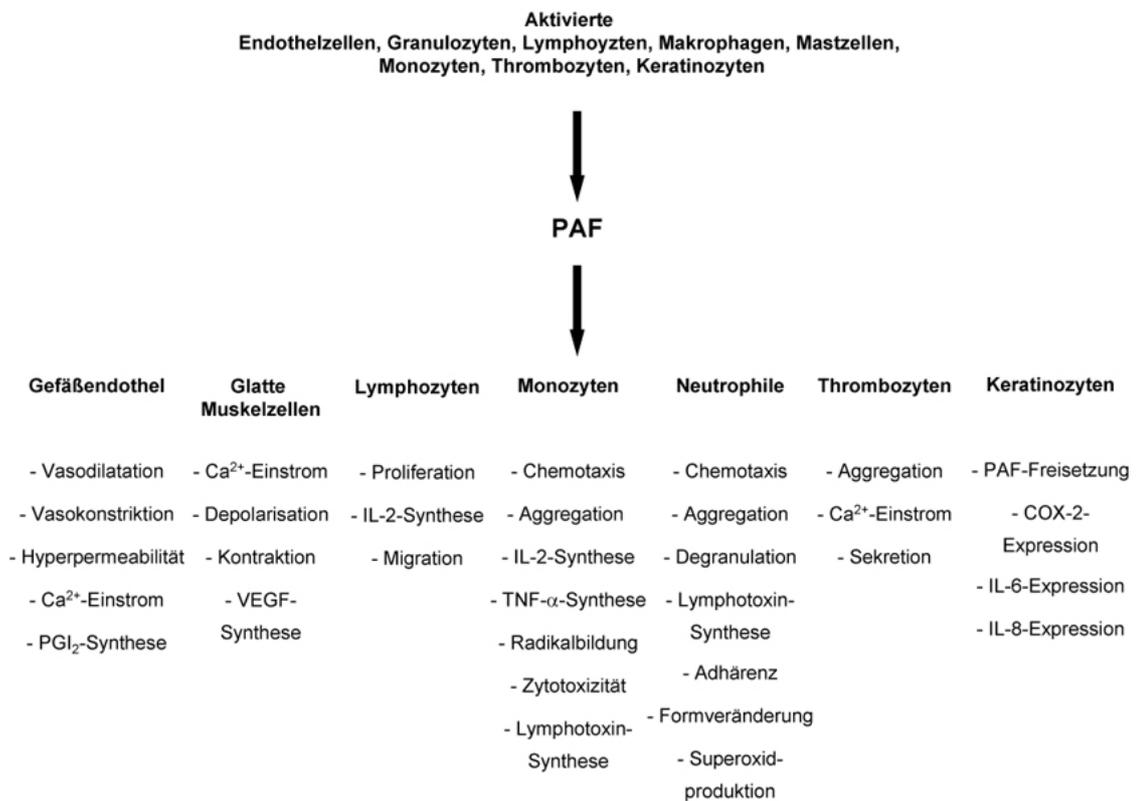


Abbildung I.6. Einige biologische Wirkungen des Lipidmediators Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) auf verschiedene Zelltypen bei entzündlichen und immunologischen Reaktionen (modifiziert nach K. Dröbler und D. Gemsa, Wörterbuch der Immunologie, Spektrum Akadem. Verlag Heidelberg, 3. Aufl., 2000). Für einen weiteren Überblick siehe S. Ishii und T. Shimizu, Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice, Progress in Lipid Research, 2000, 39: 42 – 82.

PAF ist ein extrem potenter Mediator, der biologische Antworten bereits in nano- und pikomolaren Konzentrationen hervorruft (158;159). Die Stimulierung erfolgt über einen spezifischen Transmembranrezeptor, dessen Expression unter anderem über den Bindungspartner PAF reguliert werden kann (160). Die Inaktivierung von PAF und auch von

PAF-ähnlichen Lipiden erfolgt durch Hydrolyse mittels PAF-Acetylhydrolasen (PAF-AH), von denen zwei intrazelluläre Typen (Typ I und II) und ein extrazellulärer Typ beschrieben sind. Diese Enzyme entfernen die Acetylgruppe an der *sn*-2-Position, so dass Lyso-PAF und Acetat entstehen. PAF-AH spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Krankheiten und haben anti-inflammatorische Eigenschaften (161). Insbesondere für die PAF-AH II fand man heraus, dass sie bei oxidativem Stress zur Zellmembran transloziert und dort als ROS-Fänger von oxidierten Phospholipiden ROS-induzierte Apoptose verhindern kann (162). Interessanterweise wurde dieser PAF-AH-Typ auch in humaner Haut gefunden (163). Neben der Hydrolyse von PAF, führt die liganden-stimulierte Degradation des PAF-Rezeptors sowohl über das Proteasom als auch über lysosomalen Abbau zur Desensibilisierung der Zellen gegenüber PAF (164).

I.1.6. Zelluläre endogene Mechanismen zum Schutz vor UVB-Schädigungen – Einflüsse auf die UVB-Empfindlichkeit

Da die Evolution des Lebens und der Zellen von Anfang an unter dem Einfluss eines gewissen Anteils an UVB-Strahlung stand, haben sich parallel auch endogene Mechanismen ausgebildet, die der Zelle helfen, UVB-Schädigungen zu beseitigen oder zumindest zu reduzieren. Da, wie zuvor beschrieben, die Schäden durch UVB-Strahlung auf verschiedenen zellulären Ebenen zu finden sind, ist es leicht nachvollziehbar, dass sich ebenfalls unterschiedliche zelluläre Schutzmechanismen vor UVB-Schädigungen finden lassen müssten. Im Folgenden sollen zum Einen bekannte Schutzmechanismen erläutert werden, zum Anderen werden untenstehend neueste Entdeckungen zur Stressreduktion von Hautzellen beschrieben. Letztere lieferten die Grundlage und Basis der Fragestellung der vorliegenden Dissertation zur Untersuchung von neuen endogenen zellulären Schutzmechanismen der Haut vor der UVB-induzierten Immunsuppression.

I.1.6.a. Bekannte endogene Schutzmechanismen

Am umfangreichsten untersucht sind die Mechanismen der UVB-induzierten Immunsuppression am Menschen und an der Maus. Dabei zeigte sich, dass der genetische Hintergrund starken Einfluss auf die UVB-Empfindlichkeit des Organismus nimmt. Beim Menschen gibt es individuelle und bei Mäusen Stamm-spezifische Unterschiede: einige sind sehr empfindlich gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression, andere weniger empfindlich und manche sogar resistent (165-167). Die unterschiedliche UVB-Empfindlichkeit von Mäusen wird bei der lokalen Immunsuppression durch die Polymorphismen des Gens für TNF- α bestimmt (168). Die relevante genetische Region befindet sich auf dem Chromosom 17 innerhalb des MHC-Segments (169).

Eine weitere genetische Komponente, die die Empfindlichkeit gegenüber UVB-Strahlung beeinflusst und ein endogener Schutzmechanismus ist, ist die DNS-Reparaturkapazität. UVB-induzierte DNS-Schäden werden über einen streng kontrollierten und hoch konservierten Mechanismus aus dem Genom entfernt, der sogenannten „Nucleotide excision repair (NER)“ (170). Dieser Prozess ist aus einer Folge von Schritten aufgebaut, an dem mehr als 20 Proteine beteiligt sind (13). Menschen, die unter einem NER-Defekt leiden, wie beispielsweise bei der

Erkrankung Xeroderma pigmentosum oder dem Cockayne Syndrom, haben eine extreme UVB-Empfindlichkeit, akkumulieren UV-induzierte DNS-Schäden und entwickeln zum Teil früher maligne Hauttumore als gesunde Menschen (171). Ähnliche Zusammenhänge wurden auch in transgenen Mäusen gefunden, die NER-Defekte besitzen (172). Eine Schlüsselfunktion bei UVB-induzierten DNS-Schäden besitzt das Tumorsuppressor-Gen p53. Um die Integrität einer UVB-geschädigten Zelle zu bewahren, werden verschiedene, teils ineinandergreifende zelluläre Prozesse in Gang gesetzt, wie die Beseitigung von DNS-Schäden, Zellzyklusarrest und Apoptose, die über p53-regulierte Proteine gesteuert werden (173;174). So führt UVB zur Stabilisierung und Aktivierung des p53-Proteins (175). Ein erhöhter Level an p53 wird mit erhöhter Apoptose in Verbindung gesetzt, insbesondere in Zellen, deren Summe an DNS-Schäden die Reparaturkapazität übersteigt (176). Damit wird ein unkontrolliertes Wachstum von geschädigten Zellen vermieden und in Konsequenz die Ausbildung von Hauttumoren unterdrückt. Tatsächlich findet man in etwa der Hälfte aller UV-bedingten Krebsarten eine Mutation im p53-Gen (177). Da, wie zuvor im Kapitel *1.1.5.b. DNS-Schäden* ausgeführt, DNS-Schäden Ursache für UVB-induzierte Immunsuppression sind, hat die zelluläre DNS-Reparaturkapazität direkten Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber UVB-verursachte Effekte.

Neben den genetischen Komponenten beeinflussen noch andere Faktoren, die mit der zellulären Stressantwort in Verbindung stehen, die allgemeine UVB-Empfindlichkeit. Hierzu zählen zum Beispiel die Pigmentierung aufgrund der Melaninproduktion der Melanozyten, was auch die DNS der Keratinozyten vor UVB-Schädigungen schützen kann (178;179), sowie eine ausreichende Verfügbarkeit von Antioxidantien (siehe *1.1.5.c. Reaktive Sauerstoffspezies*).

1.1.6.b. Osmolyte als neue Schutzmechanismen

Neuere Arbeiten zur Integrität von Hautzellen und UVB betonen die Bedeutung von kompatiblen organischen Osmolyten. Als kompatiblen organischen Osmolyten bezeichnet man kleine organische Moleküle, die osmotisch aktiv sind, jedoch selbst bei hohen Konzentrationen Proteinfunktionen nicht beeinflussen, im Gegensatz zu Ionen wie Natrium- oder Kaliumionen. Zu den kompatiblen organischen Osmolyten zählen Polyole wie Myo-Inositol, Methylamine wie Betain oder Aminosäurederivate wie Taurin (180). Eine hypoosmotische Umgebung führt zum Schwellen der Zelle durch vermehrten Wassereinstrom. Innerhalb weniger Minuten erlangt die Zelle aber ihr normales Zellvolumen zurück, indem sie Ionen und je nach Zelltyp spezifische Osmolyte über Ionenkanäle ausschleust. Diesen Mechanismus nennt man „Regulatory volume decrease“. Unter hyperosmotischen Bedingungen droht der Zelle ein zu starkes Schrumpfen durch Wasserverlust. In diesem Fall führt vermehrter Ioneneinstrom als auch die Aufregulierung spezifischer Osmolyttransporter, über die entsprechende Osmolyte dann intrazellulär angereichert werden, zur Regulierung des osmolytischen Gleichgewichts, so dass Wasser in die Zelle strömt und sie ihr normales Zellvolumen zurück erlangt. Diesen Mechanismus nennt man „Regulatory volume increase“ (180).

Osmolyte scheinen auch in epidermalen Zellen eine bedeutende Rolle im Erhalt des Hydratationsgleichgewichts zu besitzen. So wurde in unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass

primäre humane Keratinozyten *in vitro* sowohl nach hyperosmotischem Stress als auch UV-Bestrahlung mit einer Aufregulierung von spezifischen Osmolyttransportern reagierten (181). Diese sind auch funktionell aktiv, was sich daran zeigte, dass sich die entsprechenden Osmolyte nach den Behandlungen intrazellulär anreicherten.

1.2. Taurin – Schutz vor UVB-Strahlung?

Bei den *in vitro* Untersuchungen zur Rolle von Osmolyten in Hautzellen stellte sich insbesondere für Taurin eine wichtige Rolle heraus, da die höchste Induzierbarkeit nach hyperosmotischem Stress und UVB-Bestrahlung beim Transporter für Taurin (TAUT) und die höchste Akkumulation für Taurin in den humanen Keratinozyten festgestellt wurde (181). Regulierende Eigenschaften von Taurin in epidermalen Zellen bei osmotischem Stress und UVB-Exposition bestätigte eine weitere Studie (182). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass eine Vorinkubation von primären humanen Keratinozyten mit Taurin die Zellen *in vitro* vor hyperosmotisch- als auch UVB-induzierter Apoptose schützte.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass die Aufnahme von Taurin ein zentraler Teil einer Osmolytstrategie von epidermalen Zellen ist. Dieser Prozess hilft den Hautzellen möglicherweise, das Hydrationsgleichgewicht zu erhalten. Da der Erhalt des normalen Hydratationszustandes einer Zelle dessen Funktionen beeinflusst, ist es denkbar, dass in Folge der Taurinaufnahme die zelluläre Widerstandskraft gegenüber exogenen Stressoren wie UVB erhöht werden kann. Allerdings ist an dieser Stelle anzumerken, dass eine Änderung des Hydratationszustandes der epidermalen Zellen weder nach hyperosmotischem Stress noch nach UVB-Bestrahlung noch nach Taurinbehandlungen jemals direkt gemessen worden sind. Die Vermutung, dass UVB einen Einfluss auf die Hydratation bei epidermalen Keratinozyten ausübt, stützt sich lediglich auf experimentelle Vergleiche zur Behandlung mit hyperosmotischem Stress, von dem eine Hydratationsbeeinflussung zu erwarten ist. Somit bleibt ein direkter Einfluss von UVB auf das Hydratationsgleichgewicht bei Keratinozyten zum jetzigen Zeitpunkt Spekulation.

Aufgrund der beschriebenen Erkenntnisse ist dennoch ein Zusammenhang zwischen einer Taurinaufnahme bei epidermalen Keratinozyten und exogenen Stressoren deutlich gemacht worden. Die Frage, ob Taurin tatsächlich *in vivo* die Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression beeinflusst und damit einen möglichen neuen endogenen Schutzmechanismus darstellen könnte, ist allerdings noch immer offen. Dieser Fragestellung nachzugehen und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu klären, ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Im Folgenden soll daher das Molekül Taurin und seine Eigenschaften näher beschrieben werden.

1.2.1. Eigenschaften von Taurin

Taurin (CAS-Nr.: 107-35-7) ist chemisch betrachtet eine 2-Aminoethansulfonsäure. Die chemische Summenformel lautet $C_2H_7NO_3S$, sodass Taurin eine relative Molekülmasse von 125,15 g/mol besitzt. Beide funktionellen Gruppen von Taurin, die Sulfonyl- und die Aminogruppe, haben saurere Eigenschaften als die Carboxyl- und die Aminogruppe in

biologischen Aminosäuren. Die Sulfonylgruppe und die Aminogruppe des Taurins hängen an jeweils einem der beiden Kohlenstoffatome, im Unterschied zu biologischen Aminosäuren, deren funktionellen Gruppen beide am α -Kohlenstoffatom gebunden sind. Wie Aminosäuren ist Taurin ein amphoterisches Elektrolyt, liegt aber im Vergleich zu Aminosäuren in wässriger Lösung bei physiologischem pH-Wert nahezu vollständig als Zwitterion vor, ist demnach stark lipophob und hat eine sehr gute Wasserlöslichkeit (circa 90 g/l bei 20°C) (183).

Taurin ist eine organische Substanz, die in der Biosphäre weit verbreitet ist. Algen und das gesamte Tierreich verfügen über hohe zelluläre Taurinkonzentrationen, während in Bakterien und höheren Pflanzen Taurin gar nicht oder nur in Spuren zu finden ist. In Säugetieren kann es bis zu 0,1% des Körpergewichts ausmachen und ist damit eines der häufigsten niedermolekularen organischen Moleküle (183). 1838 wurde die Substanz erstmalig aus der Galle des Rindes *Bos taurus* isoliert, woher der Name Taurin abgeleitet wurde (184).

Die Leber ist das Organ mit der höchsten Syntheserate für Taurin, welches in einem Seitenweg des Katabolismus von schwefelhaltigen Aminosäuren entsteht. Schwefelhaltige Aminosäuren wie Methionin und Cystein werden hier zu Cysteinsulfinat oxidiert. Der Großteil des Cysteinsulfinats wird durch Transamination zu β -Sulfinylpyruvat weiter metabolisiert, wobei unter Pyruvatabspaltung am Ende Sulfat entsteht, das ausgeschieden wird. Ein kleinerer Teil des Cysteinsulfinats kann durch das Enzym Cysteinsulfinatdecarboxylase unter CO_2 -Abspaltung zu Hypotaurin umgewandelt werden, welches weiter zu Taurin oxidiert wird (183) (Abb. I.7.). Neben dem hepatischen Syntheseweg wurden noch alternative Wege in anderen Geweben wie dem Gehirn, dem Herzen oder der Niere vorgeschlagen, die allerdings alle die Aminosäure Cystein als Ausgangssubstanz haben (185). Über die effektive Höhe der Syntheserate bei Säugetieren und dem Menschen liegen leider keine verlässlichen Angaben vor. Die Kapazität zur Taurinsynthese variiert stark, nicht nur gewebespezifisch, sondern auch zwischen Spezies. Ratten und Mäuse scheinen eine größere Synthesekapazität für Taurin zu besitzen als der Mensch (186). Dagegen können beispielsweise Katzen Taurin gar nicht selbst synthetisieren. Sie müssen ihren Taurinbedarf zu 100% über die Nahrung decken (183). Aber auch bei Spezies wie Ratten und Mäuse, die in der Lage sind, Taurin zu synthetisieren, wird der Großteil des Taurinbedarfs über die Nahrungsaufnahme gedeckt. Bei Taurinmangeldiät wird offenbar nicht die Syntheserate erhöht (187;188), sondern die Resorption in den Nieren und der Austausch zwischen den Organen gesteigert und die Ausscheidung über den Urin gedrosselt (189). Beim Menschen, insbesondere Kindern ist die Synthesekapazität für Taurin sehr niedrig, was vermutlich an der geringen Aktivität der Cysteinsulfinatdecarboxylase in der Leber liegt (190). Sie decken ihren Taurinbedarf ebenfalls hauptsächlich über exogene Quellen. Der Fetus erhält Taurin von der Mutter über die Plazenta, und als Neugeborener über die Muttermilch, in der die Taurinkonzentration vergleichsweise hoch ist. So hat sich gezeigt, dass Kinder, die von ihren Müttern gestillt wurden, über einen höheren Gesamttaurinlevel verfügen und vor Taurinmangel besser geschützt sind als Kinder, die mit Ersatzmilch gefüttert wurden (191).

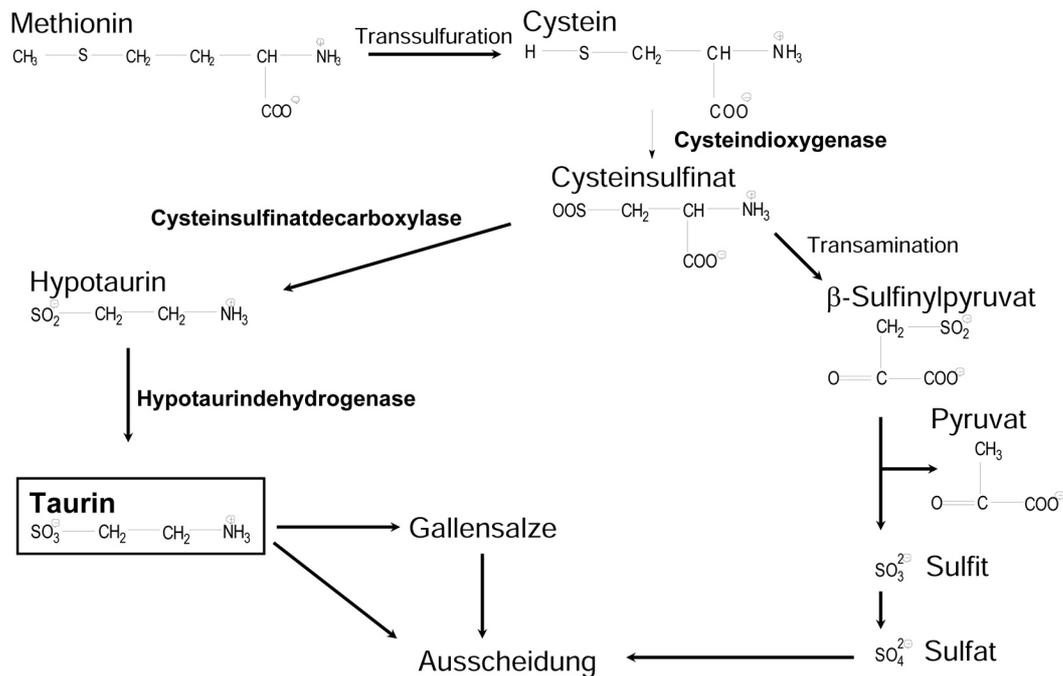


Abbildung 1.7. zeigt schematisch die Synthese von Taurin als Abbauprodukt des Metabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren in der Leber. Das Schema ist abgeleitet nach einer Vorlage aus R. J. Huxtable, Physiological Actions of Taurine, Physiological Reviews, 72 (1): 101 – 163, 1992.

Die Abhängigkeit von taurinreicher Nahrung beim Erwachsenen ist unklar aufgrund des hohen Gesamttauringehaltes im Körper, der unter normalen Bedingungen relativ konstant gehalten werden kann. Verminderter Tauringehalt im Plasma wurde beispielsweise vorübergehend nach operativen Eingriffen (192), anderen Traumata (193) sowie Sepsis und Stress (194) festgestellt. Dagegen kann Taurinmangel während der Entwicklung schwerwiegendere Folgen haben. Kinder, die mit taurindefizienter Nahrung versorgt wurden, zeigten anormale Elektroretinogramme und hatten eine erhöhte Gefahr für eine Retinadegeneration (195). Starker Taurinmangel während der Entwicklung führte bei Katzenjungen zu Kardiomyopathy, vermindertem Körperwachstum und gehemmter Entwicklung des Gehirns mit extremen Funktionsstörungen verschiedener Organe (196;197). Taurinhaltige Nahrungsmittel sind entsprechend der Verbreitung des Taurins in der Natur Seefisch, Muskelfleisch von Rind, Schwein, Lamm und Geflügel sowie Käse.

Die Taurinkonzentration in extrazellulären Flüssigkeiten und im Plasma beträgt beim Menschen etwa 20 – 100 µmol/l (183;198;199), bei Mäusen 600 – 800 µmol/l (200;201). Dagegen sind die intrazellulären Konzentrationen deutlich höher. So findet man Taurinkonzentrationen zwischen

10 und 70 mmol/l im Herzen, in der Skelettmuskulatur, im Gehirn, in der Retina und Leber, in Blutplättchen, Neutrophilen und Lymphozyten (183;185;202). Das bedeutet, dass für Taurin ein starker Konzentrationsgradient zwischen Zellinnerem und -äußerem besteht, der in der Osmoregulation der Zelle eine wichtige Rolle spielt.

Entsprechend der weiten Verbreitung und der hohen Konzentrationen des Taurins in einer Vielzahl von Organen und Zellen, ist Taurin an einer Reihe von physiologischen Prozessen beteiligt, zumeist mit protektiven Eigenschaften. Die phylogenetisch älteste nachgewiesene Funktion von Taurin ist die Regulation des Zellvolumens und Hydratationsgleichgewichts als organisches Osmolyt insbesondere bei marinen Organismen (183). Osmoregulatorische Eigenschaften des Taurins konnten zudem auch in Zellen von Säugetieren nachgewiesen werden (203). Die oben beschriebene erste Isolation aus der Galle von Säugetieren zeigt nicht nur, dass Taurin auch in großen Mengen bei Säugetieren vorkommt, sondern auch an der Konjugation von Gallensäuren und der Synthese von Gallensalzen beteiligt ist. Daneben wurde eine Vielzahl weiterer Funktionen beschrieben wie beispielsweise Antioxidation (204), Detoxifikation von endogen produzierten und exogenen Toxinen (183;205), Regulation der freien Ca^{2+} -Verfügbarkeit (183), Zellmembranstabilisierung (206) und Modulation der Funktion von Immunzellen (203;207). Ob die vielen Funktionen des Taurins indirekte Effekte der Osmoregulation sind oder ob Taurin die unterschiedlichen Funktionen auch auf direkten oder anderen Wegen ausüben kann, wird noch immer diskutiert. Auf mögliche molekulare/biochemische Mechanismen wird im Kapitel V *Diskussion* näher eingegangen.

1.2.2. Die Taurintransporter-defiziente Maus

Dass Taurin in wässriger Lösung nahezu vollständig als Zwitterion vorliegt, verhindert eine unkontrollierte Passage durch die Lipidschicht der Zellmembran, so dass die Zelle den starken Konzentrationsgradienten ohne großen Energieaufwand aufrecht erhalten kann. Die intrazelluläre Aufnahme von Taurin erfolgt über den Na^+ - und Cl^- -abhängigen Zellmembrantransporter TAUT. Er ist in vielen Geweben und Zelltypen mit hoher Sequenzhomologie vorhanden (208-210), unter anderem auch in epidermalen Keratinozyten (211). Die Ausprägung des TAUT kann osmotisch (212) und in Keratinozyten, wie kürzlich gezeigt wurde, auch in Folge von UVB-Exposition (181) reguliert werden.

Um die Effekte von Taurin bzw. die Auswirkungen von Taurinmangel auch *in vivo* in einem komplexen Organismus studieren zu können, entwickelte die Arbeitsgruppe von Professor Häussinger am Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Düsseldorf durch homologe Rekombination eine Taurintransporter-defiziente Maus mit einem gemischten genetischen Hintergrund aus den Mausstämmen C57Bl/6 und 129/SvJ (201). In den Zellen dieser Maus wurde das Exon 1 des *taut*-Gens mithilfe eines Zielvektors deletiert. Deletion des Exon 1 führt zu einer Verkürzung des Proteins von 621 auf 450 Aminosäuren und zum Verlust der Transmembrandomänen 1 – 3 und einem Teil der extrazellulären Region des Taurintransporterproteins. Damit verbunden ist ein funktioneller Verlust, so dass der Transporter kein Taurin mehr in die Zelle transportieren kann. Das Mausmodell besteht aus heterozygoten *taut*-defizienten Tieren, bei denen nur ein *taut*-Allel

deletiert ist, homozygoten *taut*-defizienten Tieren, bei denen beide *taut*-Allele deletiert sind, und *taut* Wildtyp-Mäusen, die zwei unveränderte *taut*-Allele tragen.

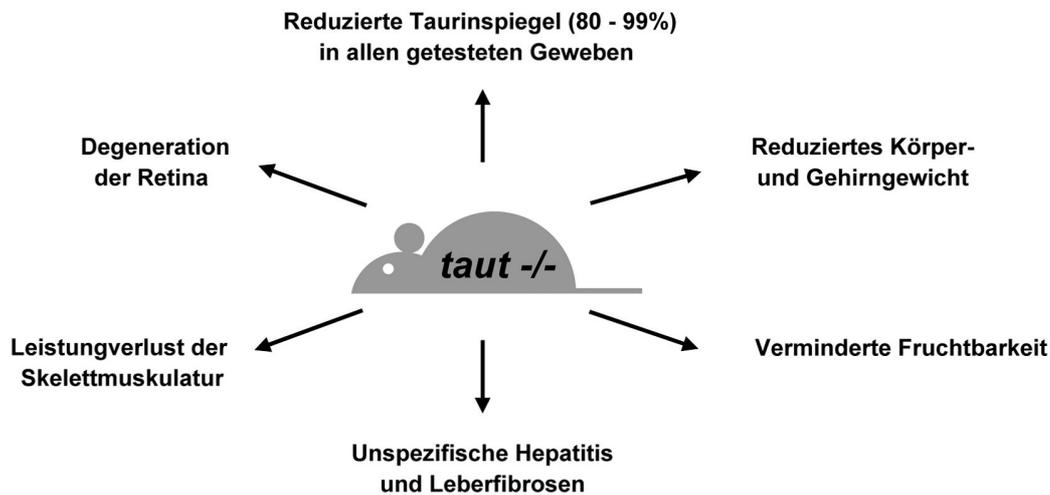


Abbildung 1.8. Phänotypische Merkmale der homozygoten Taurintransporter-defizienten (*taut*^{-/-}) Maus.

¹H-NMR-Spektroskopie-Messungen zeigten, dass eine homozygote Deletion des Exon 1 zu extremen Hypotaurinämien im Plasma und allen untersuchten Geweben in der Maus führt. Die Taurinkonzentration im Plasma sank von durchschnittlich 673 µM in Wildtyp-Mäusen auf durchschnittlich 112 µM. Der Tauringehalt von homozygoten *taut*-defizienten Tieren war im Herzen und der Skelettmuskulatur um 98 – 99%, in der Leber und der Niere um 70 – 80% reduziert (201). Das bedeutet offenbar, dass ein niedriger Taurinspiegel aufgrund des Funktionsverlustes des TAUT nicht durch andere Transportsysteme wie etwa das Aminosäuretransportsystem A ausgeglichen werden kann.

Bislang beobachtete phänotypische Veränderungen der homozygoten *taut*-defizienten Maus sind ein reduziertes Körper- und Gehirngewicht bei 17 – 18 Monate alten Tieren, verminderte Fertilität insbesondere bei den Weibchen, schwere Funktionsstörungen und progressive Degeneration der Retina bereits bei erst vier Wochen alten Mäusen vermutlich durch eine gesteigerte Apoptose der Photorezeptorzellen (201), sowie starker Leistungsverlust der Skelettmuskulatur bei jungen und alten Tieren (213). Neueste Untersuchungen ergänzen zudem, dass der moderate Taurinmangel in der Leber von heterozygoten *taut*-defizienten Mäusen unspezifische Hepatitis und Leberfibrosen verursacht, während der starke Taurinmangel in der Leber von homozygoten *taut*-defizienten Tieren zu einer chronischen Lebererkrankung führt, die charakterisiert ist durch Apoptose von Hepatozyten, einen erhöhten TNF- α -Spiegel und schwere mitochondriale Fehlfunktionen in Leberparenchymzellen (214). Außerdem leiden die homozygoten *taut*-defizienten Tiere unter vermehrtem Taurinverlust über die Nieren, können die Osmolalität ihres Urins schlechter senken und haben eine verminderte Fähigkeit, Wasserüberschuss über den Urin auszuschcheiden (215) (Abb. 1.8.).

II. Wissenschaftliche Fragestellung der Dissertationsarbeit

Die Beobachtungen, dass Taurin sowohl nach hyperosmotischem Stress als auch nach UVB-Exposition von epidermalen Keratinozyten *in vitro* aufgenommen und angereichert wird, sowie vor UVB-induzierter Apoptose schützen kann, zeigen deutlich, dass Taurin in Hautzellen eine wichtige Rolle bei zellulären Stressantworten spielt. Unbeantwortet ist allerdings, ob und inwieweit der Schutz von Taurin vor UVB-induzierten Zellschäden in der Haut auch *in vivo* relevant ist.

Da UVB-Strahlung für die Haut eine natürliche und häufige Noxe ist, die zur Immunsuppression führen kann, stellte sich die Frage, ob der Tauringehalt in der Haut möglicherweise einen Einfluss auf die Empfindlichkeit eines Organismus auf UVB-induzierte Zellschädigungen und damit die UVB-induzierte Immunsuppression ausübt. Mögliche Schutzfunktionen von Taurin vor UVB-Effekten in Hautzellen könnten sich im Bereich der Zellmembran möglicherweise durch oxidativen Stress finden, da zum einen protektive Eigenschaften von Taurin in anderen Zelltypen auf diesen Ebenen beschrieben wurden, zum anderen UVB-Strahlung derartige Schäden verursacht, die für die Ausbildung des immunsuppressiven Status mit verantwortlich sind.

Sollte Taurin tatsächlich protektive Einflüsse auf die UVB-induzierte Immunsuppression ausüben, könnte die zelluläre Aufnahme von Taurin neben der DNS-Reparatur, Pigmentierung und Antioxidation als ein weiterer natürlicher endogener Schutzmechanismus ergänzt werden, da Taurin in der Haut, insbesondere in der Epidermis, eine in hohen Konzentrationen natürlich vorkommende organische Substanz ist.

Hieraus stellte sich folgende Fragestellung dieser Dissertationsarbeit:

1. Hat die Taurinkonzentration in der Haut Einfluss auf die Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression in Mäusen.
2. Wenn ja, auf welcher molekularbiologischen Ebene mit Einfluss auf die UVB-induzierte Immunsuppression lassen sich möglich protektive Eigenschaften von Taurin vor UVB-induzierten Zellschäden finden.

Um Taurineffekte *in vivo* untersuchen zu können, standen die unter Abschnitt 1.3.2. *Die Taurintransporter-defiziente Maus* beschriebenen Mäuse des Taurintransporter-defizienten Modells sowohl für *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung.

III. Material und Methoden

III.1a. Chemikalien

Chemikalie	bezogen von
Aceton pro analysis	Merck-Schuchardt (Hohenbrunn, Deutschland)
Ampuwa®-Wasser	Fresenius (Bad Homburg, Deutschland)
Aqua bidest.	Hauseigene Reinstwasser-Anlage (siehe unter III.1b Laborgeräte)
BIO-RAD Protein Assay	BIO-RAD Laboratories (München, Deutschland)
BIO-RAD Dc Protein Assay	BIO-RAD Laboratories (München, Deutschland)
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Chloroform pro analysis	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
cPAF (Carbaryl-Plättchenaktivierender Faktor)	Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA)
Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Dichlormethan AMD Chromasolv	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
DNFB (2,4-Dinitrofluorbenzol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Eisessig	Mallinckrodt Baker B.V. (Deventer, Holland)
Ethanol pro analysis	Carl-Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
n-Hexan LiChrosolv	Merck (Darmstadt, Deutschland)
sterile isotonische Kochsalzlösung 0,9 %	Serumwerk Bernburg AG (Bernburg, Deutschland)
KCl (Kaliumchlorid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol pro analysis	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methanol AMD Chromasolv	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

	Deutschland)
MnCl ₂ x 4H ₂ O (Manganchloridtetrahydrat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
NaCl (Natriumchlorid)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nonidet P40 Substitute	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
hoch veredeltes Olivenöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Lyso-PAF-16: Lyso-Platelet Activating Factor-16	Calbiochem® (Darmstadt, Deutschland)
PAF-18: Platelet Activating Factor-18	Calbiochem® (Darmstadt, Deutschland)
PCA-4248 (Methyl-2-(phenylthio)-ethyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridine-3,5-dicarboxylate)	Biomol Research Laboratories (Plymouth Meeting, PA, USA)
Propanol-2	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Protease Inhibitor Tabletten „Complete“	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄) 25% pro analysis	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris HCl	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

III.1b. Laborgeräte

Zellbiologie:

- Sterilbank: LaminAi HBB 2448, Heraeus Instruments
- Zentrifuge: Megafuge 3.0 R, Heraeus Sepatech
- Mikroskop: Olympus Mikroskop
- Zellinkubator: Hera cell, Heraeus Sepatech

Molekularbiologie:

- Reinstwasser-Anlage zur Herstellung von Aqua bidest: TKA-LAB Reinstwassersystem Typ HP 4, TKA
- Zentrifugen: Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Centrifuge 5417 C, Eppendorf, Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech
- Thermocycler für PCR: Biometra TRIO-Thermoblock, Biometra
- Wasserbad: Julabo F10, Julabo
- Vortexer: Heidolph

- Photometer: Spectrophotometer Ultrospec II (für Proteinbestimmung), Pharmacia; MRX, Dynex Technologies (für Proteinbestimmung und ELISA); BioPhotometer, Eppendorf (für DNS- und RNS-Konzentrationsmessung)
- Stickstoffeindampfer: Sample Concentrator Techno Dri-Block DB 3, Techne
- Glaskammer für Kieselgelplatten: Desaga, Heidelberg
- Trockenschrank: Heraeus Instruments
- Ultraschallbad: Transsonic T310, Elma

III.2. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienten Mäuse des Stammes B6TgHTAUT. Dieser Mausstamm besteht aus homozygoten Taurintransporter(*taut*)-defizienten Tieren (*taut* $-/-$), heterozygoten Taurintransporter-defizienten Tieren (*taut* $+/-$) und Wildtyp-Tieren (*taut* $+/+$). Der Stamm wurde in der Arbeitsgruppe von Professor Häussinger der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universitätsklinik Düsseldorf generiert (201). Die Taurintransporter-defizienten Tiere zeichnen sich durch einen Defekt im spezifischen Taurintransport aus. Ihnen fehlt das Exon 1 des Taurintransportergens, sodass das hieraus generierte Protein nicht mehr funktionsfähig ist. Die Tiere haben einen gemischt-genetischen Hintergrund (C57Bl/6 \times 129/SvJ). Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden in der institutseigenen Versuchstierhaltung des IUF gezüchtet und in spezifisch-pathogenfreier Umgebung unter einem 12-Stunden-Hell-12-Stunden-Dunkel-Turnus gehalten. Sie erhielten Standardfutter für Nager (Sniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser nach Belieben. In der Zucht der *taut*-defizienten Tiere wurden *taut* $-/-$ Männchen mit *taut* $+/-$ Weibchen verpaart, da aus vorangegangenen Zuchten bekannt war, dass die reduzierte Fertilität in *taut* $-/-$ Weibchen stärker ausgeprägt ist als bei den *taut* $-/-$ Männchen. Bei dieser Verpaarungsart ergaben sich gute Zuchterfolge. Die Nachkommen hatten dabei entweder den *taut* $-/-$ oder *taut* $+/-$ Genotyp.

III.3. Genotypisierung von Mäusen

Zur Genotypisierung wurden 7 – 8 Wochen alten Tieren elektronische Markierungschips (Transponder 972, ISO 11784, Planet ID GmbH, Essen) mithilfe eines Injektors (Injektor nach Hüther, Planet ID GmbH, Essen) subkutan injiziert, sodass jedes Tier über ein Lesegerät (Breeder Reader, Planet ID GmbH, Essen) anschließend für einen längeren Zeitraum zu identifiziert war. Unter kurzer CO₂-Narkose wurde den Tieren eine Gewebeprobe der Schwanzspitze entnommen. Die genomische DNA der Gewebeprobe wurde mithilfe des DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) extrahiert. Die DNA wurde anschließend mittels Standard-PCR analysiert. Das Primerpaar *taut*-Ex1.2 und *taut*-Ex1r amplifiziert das Exon 1 des Taurintransportergens (*taut*) mit einer Fragmentgröße von 109 bp und diente zur Unterscheidung von heterozygoten (*taut* $+/-$) und homozygoten *taut* ($-/-$) Tieren. Zur internen PCR Kontrolle wurde zusätzlich in allen PCR Reaktionen das Exon 2 des *taut*-Gens durch Einsatz des Primerpaars TEx25/2 und *taut*-Ex2r mit amplifiziert. Die Fragmentgröße dieses Produkts beträgt 196 bp. Proben von Tieren, bei denen beide Fragmente in der PCR amplifiziert

wurden, stammten demnach von *taut* +/- Tieren, da diese sowohl das Exon-2 als auch das Exon-1 ausprägten. Proben von Tieren, bei denen nur das größere Fragment in der PCR amplifiziert wurde, stammten demnach von *taut* -/- Tieren, da diese das Exon-1 nicht ausprägten. Anhand des Bandenmusters der DNS-haltigen Ansätze wurde der Genotyp bestimmt (-/- oder +/-) und dem zuvor markierten Tier zugeordnet (siehe beispielhaftes Bild eines Agarosegels unten). Hiernach wurden die Tiere für die Experimente in *taut* -/- und *taut* +/- Gruppen einsortiert.

TAE-Puffer 50 x: 242 g Tris, 57,1 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8 ad 1 l

Primer: *taut*-Ex1.2: 5`-CAG GGT ATA CCT GGA CTG GG-3`

taut-Ex1r: 5`-CCA CAG ACA GCA CAA AGT C-3`

 TEx25/2: 5`-CGT CAT TGT GTC CCT CCT G-3`

taut-Ex2r: 5`-TGA GGT GAA GTT GGC AGT GCT-3`

1-facher PCR Ansatz (Qiagen, Hilden, Deutschland)
1 µl DNA (≅ 100 ng)
5 µl Reaktionspuffer
- MgCl ₂
1 µl dNTP-Mix (Stock: 10 mM je Nukleotid)
5 µl Primer TEx25/2 (Stock: 10 µM)
5 µl Primer <i>taut</i> -Ex2r (Stock: 10 µM)
7,5 µl Primer <i>taut</i> -Ex1.2 (Stock: 10 µM)
7,5 µl Primer <i>taut</i> -Ex1r (Stock: 10 µM)
0,3 µl Taq Polymerase
10 µl Q-Solution
7,7 µl Ampuwa-Wasser
50 µl Gesamtvolumen

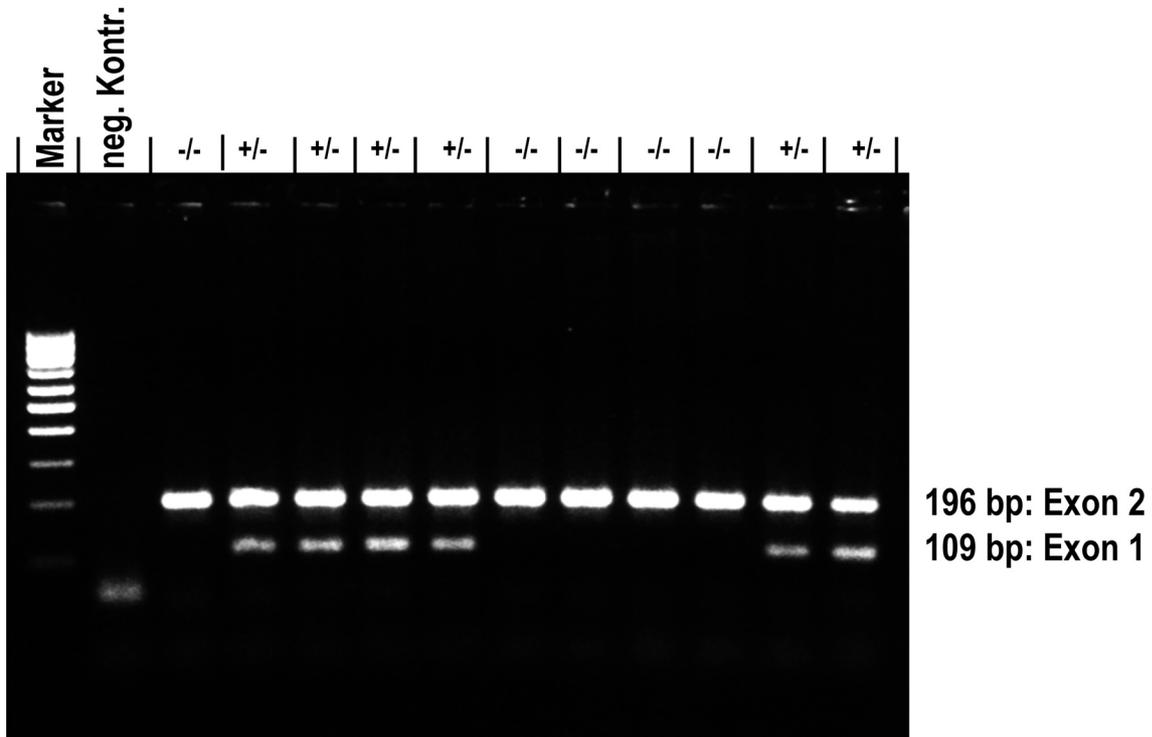
Standard-PCR Bedingungen
<u>Denaturierung</u>
1 Zyklus:
94°C 5 min.
<u>Amplifikation</u>
45 Zyklen:
94°C 1 min.
57°C 1 min.
72°C 1 min.
1 Zyklus:
72°C 8 min.

Auftrennung der PCR-Produkte über einem Agarose-Gel:

2% Agarose in 1 x TAE-Puffer + $4,4 \times 10^{-4}$ mg/ml Ethidiumbromid

Auftrennung bei 80 Volt für ca. 2 h

Marker zum Größenvergleich: SmartLadder SF (Eurogentec, Seraing, Belgien) mit 100 – 1000 bp in Abständen von 100 bp.



Typisches Foto eines Agarose-Gels unter UV-Licht mit den entsprechenden PCR-Produkten zur Genotypisierung der *taut* Mäuse. Zum Größenvergleich der Banden wurde ein Marker (Marker) eingesetzt, der Bandengrößen von 100 – 1000 Basenpaaren in Abständen von 100 Basenpaaren enthält. In der negativen Kontrolle (neg. Kontr.) wurde überprüft, ob die PCR-Ansätze mit Fremd-DNS kontaminiert waren. Hier wurde zum sogenannten Mastermix statt einer DNS-Probe RNase-freies Wasser zugefügt, so dass sich in diesem Ansatz kein PCR-Produkt zeigen durfte. Proben von Tieren, bei denen beide Fragmente (Exon 1 + 2) amplifiziert wurden, stammten von *taut* +/- Mäusen (+/-). Proben, bei denen nur das Exon 2 amplifiziert wurde, stammten von *taut* -/- Tieren (-/-).

III.4. Messung der Taurinkonzentration in der Rückenhaut der Mäuse

Jeweils vier Mäusen pro Genotyp im Alter von 16 Wochen wurde nach Tötung durch CO₂-Überdosierung eine circa 3 cm² große Gewebeprobe der Rückenhaut entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die anschließende Aufarbeitung der Proben wurde von Dr. Ulrich Warskulat vom Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Das gefrorene Gewebe wurde mechanisch pulverisiert, mit Perchlorsäure extrahiert und anschließend lyophilisiert. Die lyophilisierten Perchlorsäureextrakte wurden in 0,5 ml D₂O gelöst und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie („proton

nuclear magnetic resonance spectroscopy“; Protonenkernelmagnetresonanzspektroskopie) analysiert. Die Analyse der Proben mithilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie wurde von Dr. Ulrich Flögel vom Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die Magnetresonanzdaten wurden von einem Bruker DRX 400 WB NMR-Spektrometer mit Frequenzen von 400,1 MHz für ^1H und 161,97 MHz für ^{31}P aufgenommen. Als Referenz für die chemischen Verschiebungen der organischen Substanzen diente (Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3d4-Säure (TSP) bei 0 ppm. Die NMR-Signale wurden mit Literaturdaten (216) verglichen und durch Abgleich mit reinen Substanzen bestätigt. Die quantitative Analyse der Spektren erfolgte mithilfe einer Lorentz/Gauss-Deconvolution unter Verwendung von X-WinNMR 2.6 (Bruker). Die integrierten Werte wurden übertragen auf zuvor beschriebene Konzentrationen (217).

III.5. Zellkultur primärer Maus-Keratinocyten

Material für die Zellkultur:

- PBS

8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ + 0,2 g KH_2PO_4
ad 1 l Aqua bidest., pH 7,4, steril filtriert

- Gentamicin

Gentamicin, Flüssig (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

- Trypsin ohne EDTA

Trypsin (10x), Flüssig (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

- Trypsin mit EDTA

Trypsin-EDTA (1x), Flüssig (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

- Keratinocyten-Medium

Basal MCDB 153 (1x) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

Zusätze:

500 ng/ml Hydrocortison (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

6,11 $\mu\text{g/ml}$ Ethanolamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

14,11 $\mu\text{g/ml}$ Phosphoethanolamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

5 $\mu\text{g/ml}$ Insulin (bovine) Zn-salt (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)

50 $\mu\text{g/ml}$ Rinderhypophysenextrakt (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

10 ng/ml Muriner epidermaler Wachstumsfaktor (PeproTech, London, England)

2% Fötale Kälberserum, dialysiert (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

1% Antibiotika-Antimykotika 100x (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

1% L-Glutamin 200 MM 100x (Gibco, Karlsruhe, Deutschland)

Isolierung primärer Maus-Keratinocyten:

Die Mäuse (im Alter zwischen 12 – 16 Wochen) wurden durch CO_2 -Überdosierung getötet. Die Ohren der Tiere wurden abgeschnitten, in 70%igem Alkohol für 2 sec. desinfiziert, in sterilem PBS gewaschen und mit 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin in sterilem PBS 5 min. bei RT inkubiert. Die

Isolierung primärer Maus-Keratinozyten erfolgte anhand modifizierter Protokolle aus der Literatur (218;219). Die Ohren wurden auf einen sterilen Tupfer gelegt, so dass sie etwas antrocknen konnten. Dann wurden die Ohren in dorsale und ventrale Hälften gesplittet und mit ihrer jeweiligen Dermis-Seite auf steriles PBS mit 0,25% Trypsin gelegt und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Hierbei löst sich die Epidermis als Häutchen von der Dermis ab. Das Epidermishäutchen wurde anschließend mit einer Pinzette von der Dermis abgezogen und mit Keratinozyten-Medium durch ein Gazefilter passiert, sodass sich die Zellen vereinzeln. Die Zellen wurden 1 x in Keratinozyten-Medium gewaschen und 9 min. bei 900 rpm (172 x g) und RT zentrifugiert, in Keratinozyten-Medium resuspendiert und in Gewebekulturflaschen (175 cm²) ausplattiert (durchschnittlich 3 × 10⁶ Zellen pro Flasche). Die Ausbeute epidermaler Maus-Zellen pro Epidermishäutchen betrug durchschnittlich 5 × 10⁵ Zellen.

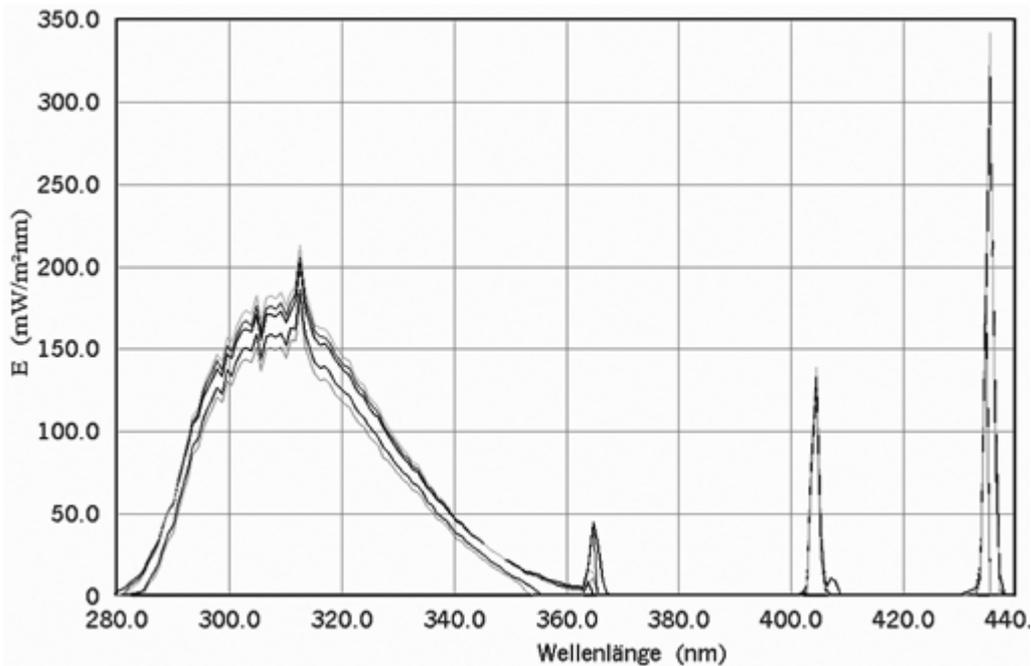
Kultivierung primärer Maus-Keratinozyten:

Die Zellen wurden 2 x pro Woche mit frischem Keratinozyten-Medium gefüttert. Bei 90% Konfluenz wurden die adherenten epidermalen Zellen mit 2,5%iger Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Lösung vom Boden der Gewebekulturflasche gelöst, in Keratinozyten-Medium gewaschen, 9 min. bei 900 rpm (172 x g) und RT zentrifugiert und 1:2 gesplittet. Die durchgeführten Versuche erfolgten in den Passagen 3 bis 5. 90% Konfluenz wurde bei den frisch isolierten Zellen in Passage 0 bereits nach etwa 7 – 10 Tagen Wachstum erreicht, von Passage 0 auf Passage 1 erfolgte ein starke Verlangsamung des Wachstums bis zu 30 Tagen. Ab Passage 2 war eine 90%ige Konfluenz dann wieder nach etwa 7 – 10 Tagen erreicht.

III.6. Quelle für UVB Strahlung

In der UVB-Bestrahlung wurden TL 20W/12 RS UV-B Fluoreszenz-Lampen von Philips (Eindhoven, Niederlande) verwendet. Diese Lampen emittieren den überwiegenden Teil ihrer Energie im UVB-Bereich (290 – 320 nm) und haben ihr Emissionsmaximum bei 313 nm.

Spektrum der Philips Ultraviolett-B TL 20W/12 RS Lampe



III.7. UVB Bestrahlung

in vivo:

Den Mäusen wurde zwei Tage vor der UVB Bestrahlung die Rückenhaut großflächig mit der Haarschneidemaschine Contura der Firma Wella AG (Darmstadt, Deutschland) rasiert. Um die Ohren der Mäuse vor der UVB Strahlung zu schützen, wurden sie unmittelbar vor der Bestrahlung mit einer weichen Zinkpaste aus der Apotheke eingepinselt. 10 – 20 Wochen alte Tiere wurden dann in einem streufreien Käfig ohne Gitterabdeckung in eine UVB-Box mit vier UVB-Lampen gesetzt. Der Abstand der Mäuse zu den Lampen betrug 35 cm (siehe Foto der UVB-Box unten). Die Leistung (mW/cm^2) in diesem Abstand wurde mithilfe eines UV-Meters der Firma Waldmann Medizintechnik (Villingen-Schwenningen, Deutschland) bestimmt. Die jeweilige UVB-Dosis wurde durch die Bestrahlungsdauer festgelegt, die anhand folgender Formel errechnet wurde:

$$1 \text{ sec.} \times \text{gewünschte UVB Dosis in } \text{mJ}/\text{cm}^2 / \text{Messwert in } \text{mJ}/\text{cm}^2 = \text{Bestrahlungsdauer in sec.}$$

Die *in vivo* Bestrahlung mit UVB-Dosen von 100 mJ/cm^2 ($= 1 \text{ kJ/m}^2$), 200 mJ/cm^2 ($= 2 \text{ kJ/m}^2$) oder 400 mJ/cm^2 ($= 4 \text{ kJ/m}^2$) erfolgte für den Mausohrschwellungstest (siehe unter III.8) an vier aufeinander folgenden Tagen in einem Abstand von jeweils 24 Stunden.

Die *in vivo* Bestrahlung für die Bestimmung der DNS-Schäden erfolgte einmalig.



Mäuse in UVB-Bestrahlungsbox

in vitro:

Die Maus-Keratinocyten wurden auf Gewebekulturplatten in Keratinocyten-Medium ausplattiert und bis zu 95% Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde vollständig abgesaugt und die Zellen mit 3 ml 37°C warmen PBS bedeckt. Dann wurden die Petrischalen ohne Deckel unter vier hintereinandergeschaltete UVB-Lampen gestellt und in einem Abstand von 27 cm bestrahlt. Die gewünschte UVB-Dosis wurde durch die Bestrahlungsdauer bestimmt und unter oben angegebener Formel berechnet.

Die *in vitro* Bestrahlung mit UVB-Dosen von 10 mJ/cm^2 ($=100 \text{ J/m}^2$), oder 20 mJ/cm^2 ($= 200 \text{ J/m}^2$) erfolgte im Gegensatz zur *in vivo* Bestrahlung nur ein Mal.

III.8. Auslösen einer Kontaktsensibilisierung bei Mäusen

Mausohrschwellungstest:

Das Auslösen einer Kontaktsensibilisierung erfolgte anhand modifizierter Protokolle aus der Literatur (67;117;118).

Sensibilisierung durch Erstkontakt (Tag 0):

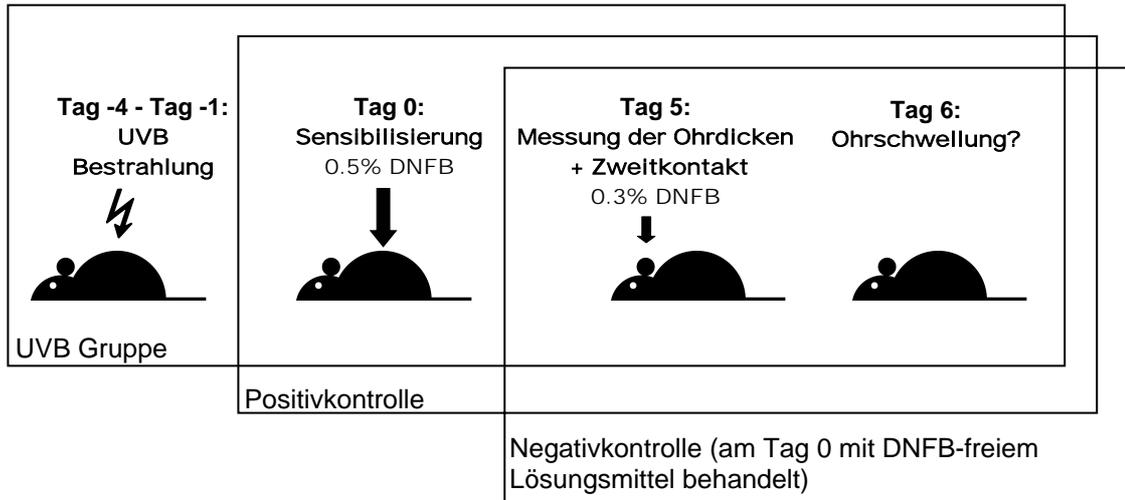
Zur Sensibilisierung (= 1. Haptenkontakt) am Tag 0 wurde Mäusen $60 \mu\text{l}$ 0,5% DNFB (w/v) auf die rasierte Rückenhaut appliziert. DNFB wurde gelöst in einem 4:1 (v/v) Mix aus Aceton und Olivenöl. Als Negativkontrolle dienten Tiere, denen dasselbe Volumen reines Lösungsmittel ohne DNFB auf den Rücken appliziert wurde.

Auslösung durch Zweitkontakt (Tag 5):

Am Tag 5 nach der Sensibilisierung wurden die Ohrdicken beider Ohren mit einem Dickenschnellmesser (Mitutoyo Messgeräte GmbH, Neuss, Deutschland) unter CO_2 Narkose bestimmt. Anschließend wurde auf beide Ohren der Tiere jeweils $20 \mu\text{l}$ 0,3% DNFB appliziert (= 2. Haptenkontakt).

Messung der Ohrschwellung (Tag 6):

24 Stunden nach dem Zweitkontakt wurde die Ohrschwellung mit dem Mitutoyo Dickenschnellmesser unter kurzer CO₂ Narkose gemessen. Die Ohrschwellung wurde ermittelt als Differenz zwischen der Ohrdicke 24 h nach dem Auslösen der Kontaktsensibilisierung nach Zweitkontakt (Tag 6) und der Ohrdicke am Tag 5 unmittelbar vor der DNFB-Behandlung. Die Ohrschwellung ist das Maß für die Stärke der Kontaktsensibilisierung.

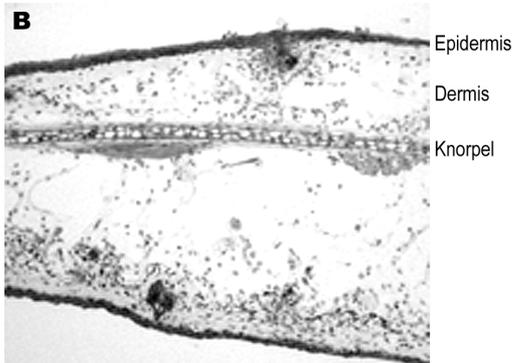


Vereinfachtes kombiniertes Schema aus *in vivo* UVB-Bestrahlung und Auslösen einer Kontaktsensibilisierung

A



B



Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Querschnitte durch ein A) Mausohr einer nichtsensibilisierten Maus (entspricht einer Negativkontrolle im obigen Schema) und B) ein Mausohr nach DNFB-Zweitkontakt nachdem die Maus fünf Tage zuvor mit DNFB sensibilisiert wurde (entspricht einer Positivkontrolle im obigen Schema). Man erkennt deutlich die starke dermale Schwellung des Mausohrs der DNFB-sensibilisierten Maus. Vergrößerung 1:100.

III.9. Behandlung mit cPAF und PCA-4248

Um zu überprüfen, ob PAF bei den drei Maus-Genotypen in der Lage ist, eine Kontaktsensibilisierung zu beeinflussen, wurden die Tiere vor der Kontaktsensibilisierung mit einer cPAF-Lösung behandelt. Die Behandlung mit dem PAF-Rezeptor-Antagonisten PCA-4248 diente zur Überprüfung, ob eine Aktivierung des PAF-Rezeptors an der Ausprägung der UVB-induzierten Immunsuppression bei den drei *taut* Maus-Genotypen beteiligt ist.

Aus cPAF und PCA-4248 wurden jeweils 5 mM Stammlösungen hergestellt. Als Lösungsmittel diente ein 1:1 Gemisch aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und steriler isotonischer Kochsalzlösung 0,9 %.

Aus der 5 mM cPAF-Stammlösung wurde durch 1:1000 Verdünnung mit steriler isotonischer Kochsalzlösung eine 5 µM cPAF-Injektionslösung angesetzt. Aus dieser wurden den Mäusen 100 µl i.p. injiziert, so dass jedes Tier pro Injektion eine cPAF-Dosis von 500 pmol erhielt. Die Tiere wurden 1 x täglich an vier aufeinander folgenden Tagen im Abstand von 24 h mit cPAF behandelt. 24 h nach der letzten cPAF-Injektion erfolgte das Auslösen der Kontaktsensibilisierung.

Aus der 5 mM PCA-4248-Stammlösung wurde durch 1:4 Verdünnung mit steriler isotonischer Kochsalzlösung eine 1,25 mM Injektionslösung hergestellt. Aus dieser wurden den Mäusen 100 µl i.p. injiziert, so dass jedes Tier pro Injektion eine PCA-4248-Dosis von 125 nmol erhielt. Die Tiere wurden 1 x täglich an vier aufeinander folgenden Tagen 1 h vor der UVB-Behandlung im Abstand von 24 h mit PCA-4248 behandelt. 25 h nach der letzten PCA-4248-Injektion bzw. 24 h nach der letzten UVB-Bestrahlung erfolgte das Auslösen der Kontaktsensibilisierung.

Kontrolltieren wurde 1 x täglich an vier aufeinander folgenden Tagen und Kontrolltieren mit UVB-Behandlung jeweils 1 h vor der Bestrahlung 100 µl 12,5%iges DMSO in steriler isotonischer Kochsalzlösung i.p. verabreicht.

III.10. PAF-Messung mittels „High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC)“

UVB Behandlung:

Die Maus-Keratinocyten wurden mit den angegebenen UVB-Dosen bestrahlt (siehe unter UVB Bestrahlung *in vitro*).

Das PBS wurde abgesaugt, und die Zellen wurden auf Eis mit 10 ml eiskaltem PBS/2% HCl (pH 3) (um die Aktivität der PAF-Acetylhydrolase (PAF-AH) zu blockieren) bedeckt und mit einem Zellscraper abgelöst. Die Zellen wurden bei 1500 rpm (477 x g), 4°C 10 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 500 µl abgesaugt, die Zellen wurden resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut bei 1500 rpm (477 x g), 4°C 10 min. zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 600 µl Aqua bidest. resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Proteinbestimmung mittels BIO-RAD Protein Assay:

Standard-Eichkurve:

Die BIO-Rad Protein Assay-Reagenz wurde mit Aqua bidest. 1:5 verdünnt. Zur Herstellung einer Standard-Eichkurve wurden aus einer BSA-Stammlösung mit einer Konzentration von 0,15 mg/ml folgende Verdünnungen hergestellt:

BSA-Standards:

Stammlösung: 15 mg/ml BSA, 1:100 verdünnt auf 0,15 mg/ml

Volumen BSA in µl	Volumen H ₂ O in µl	Konzentration in µg/ml
5	495	1,5
10	490	3
15	485	4,5
20	480	6
25	475	7,5
30	470	9
35	465	10,5
40	460	12
45	455	13,5

Die Standardproben wurden 1:100 mit Bradford-Reagenz verdünnt und bei 595 nm in einem Photometer (Ultrospec II, der Firma Pharmacia) gemessen.

Aus der Standard-Eichkurve wurde mittels linearer Regression und Trendlinie (über Microsoft Excel) die Geradengleichung berechnet:

$$\text{Geradengleichung: } y = m \cdot x + b$$

m = Steigung der Geraden

Probenaufarbeitung:

Die Proben wurden 30 sec. im Ultraschallbad homogenisiert. Wie der Standard wurden die Proben 1:100 mit BIO-Rad Protein Assay-Reagenz vermischt und im Dunkeln bei RT 5 –10 min. inkubiert. Anschließend wurden die Proben (Doppelbestimmung) in einem Photometer (Ultrospec II, der Firma Pharmacia) bei 595 nm gemessen. Über den Mittelwert der Doppelbestimmung wurde die Proteinkonzentration anhand folgender Gleichung berechnet:

$$x = y / m - b$$

Lipidextraktion:

Für die Extraktion der Lipide nach Folch (220) wurden genormte Mengen an Proben durch festgesetzte Proteinmengen eingesetzt, die mit Aqua bidest. auf 500 µl aufgefüllt wurden. Durch Zugabe von 2,5 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) und 2% HCl wurden die Lipide extrahiert und bei 2500 rpm (978 x g) bei 14°C 15 min. lang zentrifugiert. Die obere Phase und die mittlere feste Schicht wurden verworfen, die untere Phase wurde unter Stickstoff bei 37°C eingedampft. Das eingedampfte Lipidmaterial wurde in 250 µl Chloroform/Methanol (2:1, v/v) aufgenommen.

HPTLC („High Performance Thin Layer Chromatography“):

Die Durchführung der HPTLC erfolgte in Kooperation mit Dr. Susanne Grether-Beck der Abteilung Zellbiologie des Instituts für umweltmedizinische Forschung (IUF) an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH mithilfe von technischer Assistenz. 20 cm x 10 cm große Kieselgelplatten (Merck 60F 254s) wurden 1 h in Propanol-2 vorgewaschen und 30 min. bei 120°C getrocknet. Proben und PAF-Standardgemisch (siehe unten) wurden unter Stickstoff mithilfe des CAMAG Linomat IV auf die Kieselgelplatten mit einer Bandbreite von 0,8 cm als dünne Linie aufgetragen. Mit einem modifizierten Universalgradienten (siehe unten) wurden die Proben in der CAMAG AMD 2-Kammer unter Stickstoff getrennt. Nach der Separation wurden die Kieselgelplatten mithilfe einer CAMAG Tauchkammer in eine Manganchloridlösung (siehe unten) 1 sec. gefärbt und anschließend bei 120°C 20 min. lang getrocknet. Die Kieselgelplatten wurden im CAMAG TLC Scanner 3 gescannt und mithilfe des CAMAG Analyseprogramms CATS bei einer Absorption von 550 nm gemessen und mit der Michaelis-Menten-2 Kalibration wurden die Flächen quantifiziert.

Die Konzentration der Lipide errechnet sich anhand folgender Formel:

Fläche der Probe * Standardmenge [ng] / Fläche des Standards * eingesetzte Menge der Probe [µl]

• Manganchloridlösung:

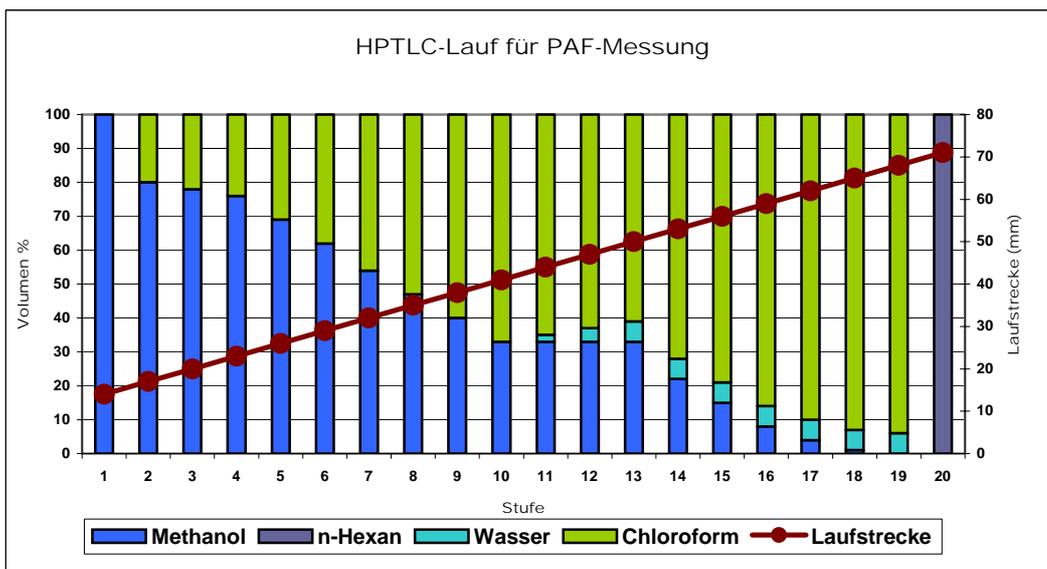
1,6 g Manganchlorid ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$) wurden in 240 ml Aqua bidest. gelöst. Anschließend wurden 240 ml Methanol und 16 ml konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt und bei RT abgekühlt.

• PAF-Standardgemisch:

- Lyso-PAF-16: 2,5 mg/ml 1:10 verdünnt in Chloroform/Methanol (2:1) (100 µl Lyso-PAF-16 auf 1 ml Chloroform/Methanol (2:1))
- PAF-18: 2,5 mg/ml 1:10 verdünnt in Chloroform/Methanol (2:1) (100 µl PAF-18 auf 1 ml Chloroform/Methanol (2:1))

Modifizierter Universalgradient zur Separation der Lipide

Stufen	Methanol Vol%	n-Hexan Vol%	Wasser Vol%	Chloroform Vol%	Laufstrecke mm	Trocknungszeit t min
1	100	0	0	0	14	2
2	80	0	0	20	17	2
3	78	0	0	22	20	2
4	76	0	0	24	23	2
5	69	0	0	31	26	2
6	62	0	0	38	29	2
7	54	0	0	46	32	2
8	47	0	0	53	35	2
9	40	0	0	60	38	2
10	33	0	0	67	41	2
11	33	0	2	65	44	2
12	33	0	4	63	47	2
13	33	0	6	61	50	2
14	22	0	6	72	53	2
15	15	0	6	79	56	2
16	8	0	6	86	59	2
17	4	0	6	90	62	2
18	1	0	6	93	65	2
19	0	0	6	94	68	2
20	0	100	0	0	71	2



III.11. RNS-Isolierung

Nach Absaugen des Mediums und 1 × Waschen in sterilem PBS wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Die Isolierung der totalen RNS erfolgte mithilfe des NucleoSpin® RNA II-Kits (Macherery-Nagel, Düren, Deutschland) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNS Konzentration wurde anschließend in RNase-freiem Aqua bidest. photometrisch bestimmt. Die RNS wurde bei –20°C für kurze Zeit, bei –80°C für längere Zeiträume gelagert.

III.12. Real-Time Polymerasekettenreaktion (PCR)

Semiquantitative Real-Time PCR:

Mittels einer viralen Reversen Transkriptase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde die RNS in cDNS (komplementäre, einzelsträngige DNS) nach Angaben des Herstellers umgeschrieben.

1-facher Ansatz cDNS-Synthese (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
1 µl Random Primer (250 ng/µl)
0,5 µl dNTP-Mix (Stock: 10 mM je Nukleotid)
100 ng totale RNS
ad 10 µl RNase-freies Aqua bidest.
4 µl 5× First-Strand Buffer
2 µl 0,1 M DTT
1 µl RNaseOUT® Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 units/µl)
1 µl M-MLV Reverse Transcriptase (200 units/µl)
ad 10 µl RNase-freies Aqua bidest.
20 µl Gesamtvolumen

Für die Real-Time PCR wurden das DNS Engine Opticon™ System von MJ Research (Incline Village, Nevada, USA) und die nötigen 96-well Platten mit Klebefolie eingesetzt. Als PCR-Mix diente das QuantiTectSybr®GreenPCR-Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Primer:

Die intronüberspannenden murinen Primerpaare wurden mithilfe der Primer3 Software (Freeware, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA, USA und Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, MD, USA) ausgewählt und anhand der NCBI Map Viewer Gendatenbank (www.ncbi.nih.gov/mapview/map-search.cgi?taxid=10090) kontrolliert.

• Cyclooxygenase-2 (Cox-2)

Cox-2 Fwd.: 5`-AAA GAA GTG CTG GAA AAG GT-3`

Cox-2 Rev.: 5`-GCG CAGT TTA TGT TGT CTG T-3`

• Interleukin-10 (IL-10)

IL-10 Fwd.: 5`-GAC CAG CTG GAC AAC ATA CT-3`

IL-10 Rev.: 5`-TCA AAT GCT CCT TGA TTT CT-3`

Haushaltsgene:

• Ribosomale Proteinuntereinheit 6 (rPs6)

rPs6 Fwd.: 5`-ATT CCT GGA CTG ACA GAC AC-3`

rPs6 Rev.: 5`-GTT CTT CTT AGT GCG TTG CT-3`

• Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

GAPDH Fwd.: 5`-TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA-3`

GAPDH Rev.: 5`-CCT GCT TCA CCA CCT TCT TGA-3`

1-facher Ansatz Real-Time-PCR (Qiagen, Hilden, Deutschland)
10 µl QuantiTectSybr®GreenPCR-Mix
1 µl Fwd.-Primer (10 µM)
1 µl Rev.-Primer (10 µM)
7 µl RNase-freies Aqua bidest.
1 µl cDNS
20 µl Gesamtvolumen

Real-Time-PCR Bedingungen
<u>Denaturierung</u> 1 Zyklus: 95°C 15 min.
<u>Amplifikation</u> 45 Zyklen: 94°C 20 sec. 53°C 30 sec. 72°C 30 sec. 1 Zyklus: 72°C 8 min.
<u>Schmelzkurve</u> Temperaturerhöhung von 60°C auf 90°C, Messung alle 3°C 10 sec.

Die Ergebnisse aus der Real-Time-PCR wurde nach folgender Methode ausgewertet: Aus der Real-Time-PCR ergaben sich sogenannte „Crossing Points“ (CP) für jedes einzelne getestete Gen. Die jeweiligen Differenzen (D) zwischen den CP der Zielgene IL-10 bzw. COX-2 und den CP der Haushaltsgene RPS6 und GAPDH (Differenz als Basis-DCP bezeichnet) von

unbestrahlten Kontrollzellen dienten als Basiswerte für die unbeeinflusste Ausprägung des IL-10- bzw. COX-2-Gens in den untersuchten Zellen. Ebenso wurden die Differenzen der CP zwischen Zielgenen und Haushaltsgenen von UVB-bestrahlten Proben berechnet (Differenz als DCP bezeichnet). Aus der Differenz zwischen dem DCP der UVB-bestrahlten Zellen zum Zeitpunkt X und dem Basis-DCP-Wert der unbestrahlten Zellen wurde dann der Faktor der Induktion durch die UVB-Behandlung zum Zeitpunkt X als Potenz zur Basis 2 errechnet.

III.13. Messung von DNS-Schäden

Material:

- λ -DNS (New England BioLabs Inc., Ipswich, MA, USA)
- Tween-20 (Sigma, St. Louis, MO, USA,)
- NaCl (Sigma)
- Tris-Base (Trizma) (Sigma)
- NaOH (Sigma)
- Maleinsäure (Sigma)
- 5X TBE-Puffer (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Ethidiumbromid (Sigma)
- MgSO₄ (Sigma)
- KCl J.T. Baker, (Phillipsburg, NJ, USA)
- Blocking Reagenz (Roche, Nutley, NJ, USA)
- Positiv geladene Nylonmembran (Roche)
- Whatman Filterpapier (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA)
- Glycerol (Fisher)
- Primärantikörper, Anti-Thymin Dimer (Kamiya Biomedical, Seattle, WA, USA)
- Sekundärantikörper, Anti-Maus HRP (Amersham, Princeton, NJ, USA)
- ECL Blotting Detectionsreagenz (Amersham)
- Agarose (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)
- Bromophenol Blau (Serva, Hauppauge, NY, USA)

Nach der *in vivo* UVB-Bestrahlung wurden die Tiere zu den angegebenen Zeitpunkten durch CO₂-Überdosierung getötet. Die Ohren der Tiere und eine 1 cm² große Rückenhautprobe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die genomische DNS wurde mithilfe des DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) 2 x extrahiert, um eine möglichst reine DNS-Probe mit möglichst geringen Proteinverunreinigungen zu erhalten. DNS-Konzentration und Reinheit (OD 260 nm/OD 280 nm) wurden photometrisch mithilfe des BioPhotometers (Eppendorf) gemessen. Reinheiten von wenigstens 1,8 wurden als ausreichend erachtet.

Die Bestimmung der DNS-Schäden erfolgte durch quantitative Analyse von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPD) über die South-Western Dot Blot-Methode. Sie wurde durchgeführt von Dr. Daniel Yarosh der Firma Agidermatics in Freeport, New York, USA. Als

Standardkurven diente λ -DNS, die bei bestimmten UVC-Dosen (31,25; 62,5; 125; 250 J/m²) definierte Mengen an Thymindimeren produzieren. In dreifacher Bestimmung wurden je 500 ng der Proben-DNS und in Mehrfachbestimmung 500 ng der Standard- λ -DNS auf den South-Western Dot Blot-Apparat aufgetragen und auf eine positiv geladenene Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde die Nylonmembran mit dem Anti-Thymindimer-Primärantikörper (1:2000 in 1% Blocking Reagenz) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit Waschpuffer (0,1% Tween-20 in TBS-Puffer) wurde die Membran mit dem „Horse-Radish-Peroxidase- (HRP)“-konjugierten Sekundärantikörper Anti-Maus-HRP (1:5 in 1% Blocking Reagenz) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wieder 3 x gewaschen und mit Detektionreagenz (HRP-Substrat) 90 sec. bei RT inkubiert.

Zur zusätzlichen Überprüfung der Reinheit der Proben wurden jeweils 100 ng Proben-DNS auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid gefärbt. Über die Bandenstärke lässt sich die aufgetragene DNS-Menge normalisieren.

Sowohl die Dot-blots als auch die Agarosegele wurden über die Kodak Image Station 440 CF aufgenommen. Die Aufnahmen wurden mithilfe der Software TotalLab v.2003 analysiert. Mithilfe der CPD-Standards und der definiert eingesetzten DNS-Mengen lassen sich die Dot blot-Daten als Enzym-sensitive Orte/Megabase quantifizieren.

III.14. Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen der Ergebnisse erfolgten mithilfe der GraphPad Prism 3.02 Software. Die Daten wurden statistisch über den ungepaarten „two-tailed“ Student's t Test analysiert. Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. Markierungen mit einem Sternchen (*) zeigen einen p-Wert < 0,05, mit zwei Sternchen (**) einen p-Wert < 0,01 und mit drei Sternchen (***) einen p-Wert < 0,005 an. Mit der Bezeichnung (ns) sind statistisch nicht signifikante Unterschiede markiert.

IV. Ergebnisse

IV.1. Homozygote Taurintransporter-defiziente Tiere haben eine stark reduzierte Taurinkonzentration, jedoch eine unveränderte Gesamtkonzentration an organischen Substanzen in der Rückenhaut.

Taurintransporter-defiziente Mäuse zeichnen sich durch einen Defekt im spezifischen Taurintransport aus. Da diesen Tieren das Exon 1 des Taurintransportergens fehlt (siehe unter Material und Methoden III.3), kann das hieraus generierte Protein keine Transportfunktion mehr erfüllen. Abbildung IV.1. zeigt jeweils einen beispielhaften Ausschnitt der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie-Analysen der Perchlorsäure-Extrakte aus der Rückenhaut der drei Maus-Genotypen. In Tabelle IV.1 sind die errechneten Konzentrationen aller mit dieser Methode messbaren organischen Substanzen aufgeführt und können zwischen den Genotypen verglichen werden. Die für diese Arbeit wichtigsten Werte sind die Taurinkonzentrationen in der Rückenhaut von *taut +/+*, *taut +/-* und *taut -/-* Tieren. Die Gewebeprobe der Rückenhaut von *taut +/+* Mäusen ergaben eine Taurinkonzentration von $9,82 \pm 3,86$ mM. Damit besitzt Taurin im Vergleich zu den anderen organischen Substanzen die höchste Konzentration und ist das häufigste freie organische Solut in der Rückenhaut dieser Tiere. Das Fehlen eines Allels für den funktionalen Taurintransporter führt zu einer reduzierten Taurinkonzentration von $6,48 \pm 3,07$ mM in der Haut von *taut +/-* Mäusen, was im Vergleich zu den *taut +/+* Mäusen einer Reduktion von etwa 34% entspricht. Rückenhautextrakte der *taut -/-* Mäuse, denen beide Allele für den funktionsfähigen Taurintransporter fehlen, wiesen lediglich eine Taurinkonzentration von $0,64 \pm 0,16$ mM auf. Diese Tiere haben damit eine sehr starke Reduktion der Taurinkonzentration um etwa 93,5% verglichen mit *taut +/+* Tieren.

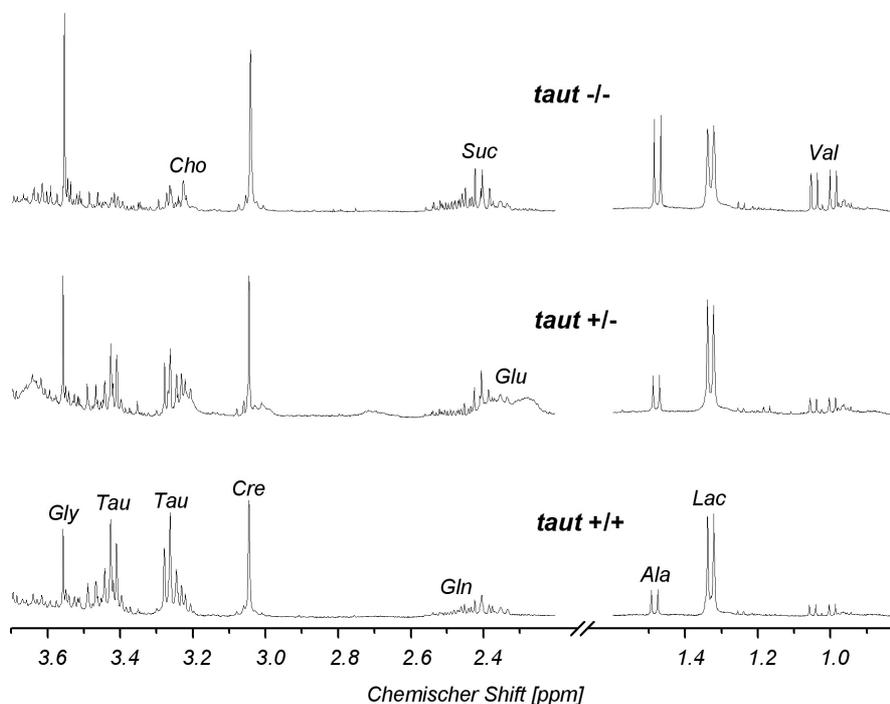


Abbildung IV.1.

Abbildung IV.1. Jeweils vier Mäusen pro Genotyp im Alter von 16 Wochen wurde nach Tötung durch CO₂-Überdosierung eine circa 3 cm² große Gewebeprobe der Rückenhaut entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde pulverisiert und anschließend mit Perchlorsäure extrahiert und lyophilisiert. Die lyophilisierten Perchlorsäureextrakte wurden in 0,5 ml D₂O gelöst und mittels ¹H-NMR-Spektroskopie analysiert wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Abbildung zeigt repräsentative Ausschnitte der ¹H-NMR-Spektren der Perchlorsäureextrakte von *taut*^{-/-}, *taut*^{+/-} and *taut*^{+/+} Mäusen. Abkürzungen: Ala, Alanin; Cho, Cholin; Cre, Creatin; Gln, Glutamin; Glu, Glutamat; Gly, Glycin; Lac, Laktat; Suc, Succinat; Tau, Taurin; Val, Valin.

Die vergleichenden ¹H-NMR-Spektroskopie-Untersuchungen zeigten zudem, dass das Fehlen des Taurintransporters und der damit verbundene starke Taurinverlust in *taut*^{-/-} Mäusen zu einer erhöhten Konzentration anderer organischer Stoffe im Cytosol von Hautzellen führte. Quantitativ signifikante Unterschiede zwischen *taut*^{+/+} und *taut*^{-/-} Tieren fanden sich für Acetat von $0,17 \pm 0,06$ mM in *taut*^{+/+} Mäusen auf $0,51 \pm 0,29$ mM in *taut*^{-/-} Tieren, für Alanin (von $1,46 \pm 0,32$ mM auf $2,36 \pm 0,43$ mM), für Betain (von $0,22 \pm 0,13$ mM auf $0,89 \pm 0,08$ mM), für Carnitin (von $0,29 \pm 0,11$ mM auf $0,89 \pm 0,28$ mM), für Glutamat (von $2,74 \pm 0,72$ mM auf $5,34 \pm 1,69$ mM), für Glutamin (von $2,15 \pm 1,07$ mM auf $4,23 \pm 1,41$ mM), für Glycin (von $5,69 \pm 1,21$ mM auf $8,48 \pm 1,64$ mM), für Succinat (von $0,90 \pm 0,55$ mM auf $1,81 \pm 0,35$ mM), für Tyrosin (von $0,20 \pm 0,07$ mM auf $0,37 \pm 0,08$ mM) und für Valin (von $0,53 \pm 0,11$ mM auf $0,80 \pm 0,15$ mM). Dem schwächeren Taurinverlust in der Haut von *taut*^{+/-} Mäusen folgt eine Aufkonzentration von einer geringeren Anzahl an organischen Substanzen als bei den *taut*^{-/-} Mäusen. Konzentrationssteigerungen zeigten sich bei *taut*^{+/-} Tieren verglichen mit den *taut*^{+/+} Tieren für Acetat (von $0,17 \pm 0,06$ mM bei *taut*^{+/+} auf $0,58 \pm 0,07$ mM bei *taut*^{+/-} Mäusen), für Glutamin (von $2,15 \pm 1,07$ mM auf $3,80 \pm 1,11$ mM) und für Glycin (von $5,69 \pm 1,21$ mM auf $7,29 \pm 2,09$ mM).

Während in *taut*^{+/+} Mäusen Taurin die organische Substanz mit der höchsten Konzentration im Cytosol von Hautzellen darstellt, besitzt sowohl in *taut*^{-/-} als auch *taut*^{+/-} Tieren Glycin die höchste Konzentration in der Rückenhaut. Beim Vergleich der Summen an organischen Substanzen bei den drei verschiedenen *taut* Maus-Genotypen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Da alle gelösten organischen Substanzen die Gesamtosmolarität der Zelle mit bestimmen und zudem auch nicht essentielle Aminosäuren wie beispielsweise Glycin, Alanin, Glutamat und Glutamin und Methylamine wie Betain als kompatible organische Osmolyte bei Säugetierzellen aktiv sein können, können sie offenbar zum Erhalt der normalen Gesamtosmolarität auf Basis organischer Substanzen, die bei den *taut*^{+/+} Mäusen gemessen wurde, bei den *taut*-defizienten Tieren beitragen.

Ergebnisse

Organische Substanz	<i>taut +/+</i> [mM]	<i>taut +/-</i> [mM]	<i>taut -/-</i> [mM]	Student's t Test: <i>taut -/-</i> vs <i>taut +/+</i> p-Wert
Acetat	0,17 ± 0,06	0,58 ± 0,07	0,51 ± 0,29	0,023 *
Alanin	1,46 ± 0,32	1,67 ± 0,31	2,36 ± 0,43	0,031 *
Arginin	1,07 ± 0,67	1,18 ± 0,29	1,27 ± 0,16	0,630
Aspartat	0,19 ± 0,13	0,13 ± 0,08	0,13 ± 0,06	0,473
Betain	0,22 ± 0,13	0,32 ± 0,15	0,89 ± 0,08	0,017 *
Carnitin	0,29 ± 0,11	0,39 ± 0,26	0,89 ± 0,28	0,026 *
Cholin	0,16 ± 0,06	0,18 ± 0,06	0,17 ± 0,06	0,877
Creatin	3,10 ± 1,25	2,52 ± 1,87	3,37 ± 1,02	0,785
Cystein	0,65 ± 0,29	0,49 ± 0,32	0,44 ± 0,08	0,248
Glukose	1,35 ± 0,47	1,41 ± 0,55	1,30 ± 0,34	0,900
Glutamat	2,74 ± 0,72	2,94 ± 1,50	5,34 ± 1,69	0,049 *
Glutamin	2,15 ± 1,07	3,80 ± 1,11	4,23 ± 1,41	0,048 *
Glycero-phosphocholin	0,32 ± 0,09	0,29 ± 0,21	0,28 ± 0,13	0,747
Glycin	5,69 ± 1,21	7,29 ± 2,09	8,48 ± 1,64	0,048 *
Isoleucin	0,35 ± 0,14	0,42 ± 0,29	0,37 ± 0,08	0,904
Lactat	7,78 ± 3,50	5,41 ± 2,39	6,24 ± 1,42	0,506
Leucin	0,16 ± 0,09	0,18 ± 0,15	0,20 ± 0,07	0,553
Lysin	0,50 ± 0,32	0,76 ± 0,14	0,79 ± 0,18	0,215
Phenylalanin	0,50 ± 0,20	0,56 ± 0,27	0,65 ± 0,12	0,283
Phosphocholin	0,21 ± 0,11	0,23 ± 0,02	0,24 ± 0,07	0,709
Succinat	0,90 ± 0,55	0,95 ± 0,47	1,81 ± 0,35	0,041 *
Taurin	9,82 ± 3,86	6,48 ± 3,07	0,64 ± 0,16	0,006 *
Tyrosin	0,20 ± 0,07	0,21 ± 0,06	0,37 ± 0,08	0,039 *
Valin	0,53 ± 0,11	0,56 ± 0,14	0,80 ± 0,15	0,036 *
Σ	40,53 ± 4,53	38,93 ± 3,86	41,78 ± 4,37	

Tabelle IV.1. zeigt die Konzentration aller organischen Substanzen in der Rückenhaut von *taut -/-*, *taut +/-* und *taut +/+* Mäusen, die mithilfe der ¹H NMR-Spektroskopie gemessen wurden. Die Konzentrationen wurden berechnet wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Daten sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Es wurden vier Tiere pro Genotyp analysiert. Grau hinterlegte Felder heben die organischen Stoffe hervor, die in den Hautextrakten der *taut -/-* Mäuse im Vergleich zu den *taut +/-* Mäusen statistisch signifikant erhöht sind (zusätzlich markiert mit einem Sternchen *). Ein p-Wert unter 0,05 nach Berechnung mit dem „Student's t Test“ wurde als statistisch signifikant angegeben.

IV.2. Homozygote Taurintransporter-defiziente Mäuse sind signifikant empfänglicher für UVB-induzierte Immunsuppression als Wildtyp-Mäuse.

In einer vorangegangenen Studie von Warskulat und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von Osmolyten, im Besonderen von Taurin, Teil der UV-induzierten Stressantwort in primären humanen normalen Keratinozyten (HNKS) *in vitro* ist (181). Basierend auf dieser Beobachtung wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von Taurin *in vivo* in der UVB-induzierten Immunsuppression untersucht. Von Untersuchungen an dem UVB-sensiblen Mausstamm C57Bl/6 ist bekannt, dass die Induktion einer Kontaktsensibilisierung gegen ein Hapten (z.B. DNFB) unterdrückt ist, wenn man die Tiere mit dem Hapten auf Hautstellen sensibilisiert, die zuvor mit geringen UVB-Dosen (100 mJ/cm²) bestrahlt worden waren (218). Entsprechend dieser Erkenntnis wurden in der vorliegenden Studie Gruppen von *taut* +/+ , *taut* +/- und *taut* -/- Mäusen mit drei verschiedenen UVB-Dosen bestrahlt und anschließend durch Applikation mit DNFB auf den UVB-bestrahlten Rückenhautarealen sensibilisiert (Abb. IV.2. A – D). Die eingesetzten UVB-Dosen von 100, 200 und 400 mJ/cm² liegen nach Literaturdaten im niedrigen (100 und 200 mJ/cm²) bis mittleren (400 mJ/cm²) Dosisbereich (166). In der vorliegenden Arbeit wird im Folgenden eine UVB-Dosis von 100 mJ/cm² als niedrige, von 200 mJ/cm² als mittlere und 400 mJ/cm² als hohe Dosis bezeichnet.

Die niedrige UVB-Dosis von 100 mJ/cm² löste weder bei den *taut* +/+ (Abb. IV.2. A) noch bei den *taut* +/- (Abb. IV.2. B) Tieren eine signifikante Suppression der Kontaktsensibilisierung aus verglichen mit den korrespondierenden Gruppen der DNFB-behandelten Positivkontrolle, die nicht mit UVB bestrahlt worden waren (siehe Schema unter Punkt III.8. *Auslösen einer Kontaktsensibilisierung bei Mäusen* im Kapitel Material und Methoden). Dennoch ist zu bemerken, dass die *taut* +/- Tiere eine stärkere Reduktion in der Ohrschwellung zeigten (etwa 27% Reduktion zur pos. Kontrolle) als die *taut* +/+ Tiere (etwa 12% Reduktion zur pos. Kontrolle) (Abb. IV.2. D). Sowohl die mittlere UVB-Dosis von 200 mJ/cm² als auch die hohe UVB-Dosis von 400 mJ/cm² führten zu signifikanten Reduktionen der Ohrschwellungsreaktion in *taut* +/+ Mäusen (33% und 43% Reduktion) und in *taut* +/- Mäusen (50% und 51% Reduktion), wobei auch hier die *taut* +/- Tiere jeweils stärkere Reaktionen zeigten als die *taut* +/+ Tiere, was auf eine etwas stärkere UVB-Sensibilität bei den *taut* +/- Tieren hindeutet. Während die hohe UVB-Dosis eine stärkere Suppression als die mittlere UVB-Dosis bei den *taut* +/+ Tieren bewirkte, scheint die maximale Suppression bei den *taut* +/- Mäusen bereits bei der mittleren UVB-Dosis erreicht zu sein.

Bei den *taut* -/- Mäusen allerdings rief bereits die niedrige UVB-Dosis von 100 mJ/cm² eine signifikante Suppression der Kontaktsensibilisierung hervor (42% Reduktion zur pos. Kontrolle) (Abb. IV.2. C und D), was auf eine höhere Empfänglichkeit dieses Genotyps im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression hinweist. Wurden die *taut* -/- Tiere mit der mittleren UVB-Dosis (200 mJ/cm²) und der hohen UVB-Dosis (400 mJ/cm²) vor der Sensibilisierung behandelt, zeigten sie eine noch stärkere Reduktion der Ohrschwellungsreaktion (61% und 57% Reduktion zur pos. Kontrolle), wobei die maximale

Suppression der Kontaktsensibilisierung wie bei den *taut +/-* Tieren unter der mittleren UVB-Dosis erreicht zu sein scheint und unter der hohen UVB-Dosis nicht weiter stieg.

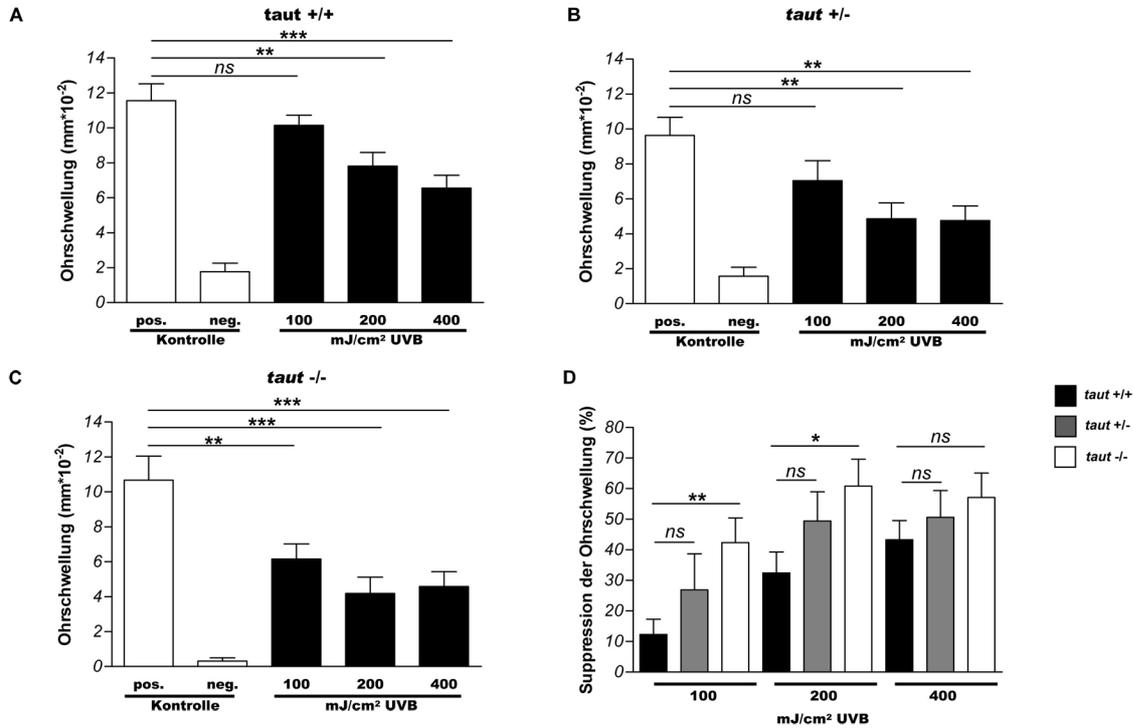


Abbildung IV.2. A) *taut +/+* Mäuse, B) *taut +/-* Mäuse and C) *taut -/-* Mäuse wurden mit drei verschiedenen UVB-Dosen bestrahlt (100, 200 und 400 mJ/cm²) und anschließend am Tag 0 mit einer 0,5%igen DNFB-Lösung sensibilisiert. Am Tag 5 wurden die Ohrdicken der Tiere als Referenzwerte bestimmt. Direkt im Anschluss wurden die Ohren der Mäuse mit einer 0,3%igen DNFB-Lösung behandelt, um eine Kontaktsensibilisierung auszulösen. 24 h später (Tag 6) wurde die Ohrschwellung als Reaktion der Kontaktsensibilisierung gemessen. Als positive Kontrolle (pos. Kontr.) dienen Tiere, die zwar sensibilisiert und ausgelöst, aber nicht mit UVB-Bestrahlung behandelt waren. Mäuse der negativen Kontrolle (neg. Kontr.) zeigen die Hintergrundreaktion durch leichte Irritationen der Auslösung und wurden nur mit der 0,3%igen DNFB-Lösung auf den Ohren behandelt, waren aber weder mit UVB bestrahlt noch mit DNFB sensibilisiert. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen [mm × 10⁻²] + Standardfehler des Mittelwertes. Die Gruppen bestanden aus 5 – 9 Tieren. Die Ergebnisse wurden mithilfe des „two-tailed Student's t Test“ analysiert. Signifikante Unterschiede zur entsprechenden positiven Kontrolle sind mit Sternchen markiert (*, p-Wert < 0,05; **, p-Wert < 0,01; ***, p-Wert < 0,005). Die Abbildung IV.2. zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten. D) Die UVB-induzierte Suppression des Mausohrschwelungstests wurde als Prozent der jeweiligen positiven Kontrolle berechnet. Die Ergebnisse der Suppression der *taut +/-* and *taut -/-* Mäuse wurden versus den entsprechenden UVB-Gruppen der *taut +/+* Mäuse statistisch analysiert. Die statistische Analyse und Markierung mit Sternchen erfolgte wie oben beschrieben.

Um die UVB-induzierte Suppression der Kontaktsensibilisierung zwischen den drei Genotypen statistisch miteinander vergleichen zu können, wurden die Ohrschwellungsreaktionen als

Prozent der korrespondierenden positiven Kontrollgruppen berechnet und als UVB-induzierte Suppression in Abbildung IV.2. D dargestellt. Hierbei stellte sich heraus, dass die *taut -/-* Gruppen, die mit der niedrigen und der mittleren UVB-Dosis bestrahlt wurden, signifikant stärkere UVB-induzierte Suppressionen der Ohrschwellungsreaktion (42% und 61%) aufwiesen im Vergleich zu den Reaktionen der entsprechenden *taut +/+* UVB-Gruppen (12% und 33%). Ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Genotypen ging jedoch verloren, wenn die Tiere mit der hohen UVB-Dosis von 400 mJ/cm² bestrahlt wurden. UVB-induzierte Suppression der Ohrschwellungsreaktion bei den *taut +/-* Tieren war in keinem Fall signifikant unterschiedlich verglichen weder mit den entsprechenden *taut +/+* Gruppen noch mit den *taut -/-* Gruppen, was darauf hindeutet, dass die UVB-Empfindlichkeit der *taut +/-* Mäuse zwischen den beiden anderen Genotypen liegt.

IV.3. UVB-Bestrahlung führt in homozygoten Taurintransporter-defizienten Mäusen nicht zu vermehrten DNS-Schäden im Vergleich zu heterozygoten Taurintransporter-defizienten und Wildtyp-Mäusen.

Da die Absorptionsmaxima der Purin- und Pyrimidin-Basen der DNS zwischen 230 – 300 nm liegen (128), kann die Strahlungsenergie von UVB direkt auf die DNS übertragen werden. Hierbei entstehen Photoprodukte wie CPD und sogenannte (6-4)-Photoprodukte (221). Aus einer Reihe von Studien ist bekannt, dass CPD wichtige molekulare Mediatoren für eine UVB-induzierte Immunsuppression darstellen (126;135-138).

Da aus den vergleichenden Experimenten zur UVB-induzierten Immunsuppression (siehe IV.2) zu beobachten war, dass *taut* $-/-$ Mäuse signifikant empfänglicher für UVB-induzierte Immunsuppression waren als *taut* $+/-$ und *taut* $+/+$ Mäuse, könnten unterschiedlich starke UVB-induzierte DNS-Schäden in der Haut von *taut* $-/-$ Mäusen im Vergleich zu *taut* $+/-$ und *taut* $+/+$ Mäusen verantwortlich sein für deren höhere Sensibilität gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression. Da außerdem gezeigt wurde, dass DNS-Schäden, die durch oxidativen Stress hervorgerufen werden, mithilfe von Taurin signifikant reduziert werden konnten (222), könnte ein Zusammenhang zwischen Taurin und UVB-induzierten DNS-Schäden weiterhin möglich sein.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden alle drei Genotypen mit der niedrigen UVB-Dosis von 100 mJ/cm² bestrahlt, da unter diesen Bedingungen die größten Unterschiede in der UVB-induzierten Immunsuppression zwischen *taut* $-/-$ Tieren und den beiden weiteren Genotypen beobachtet wurden (Abb. IV.2. A – D). Sowohl 6 h als auch 24 h nach der Bestrahlung wurde die DNS der bestrahlten Rückenhaut isoliert und die Mengen an CPD bestimmt. Als Referenzwerte dienten CPD-Konzentrationen isolierter DNS aus gleich behandelten, aber unbestrahlter Maushaut des entsprechenden Genotyps.

6 h nach UVB-Behandlung wurde bei den *taut* $+/+$ Tieren eine 2,5 fache UVB-bedingte CPD-Induktion gemessen, die nach 24 h leicht auf eine 2-fache Induktion gesunken war (Abb. IV.3.). Die *taut* $+/-$ Tiere wiesen 6 h nach UVB-Bestrahlung eine 2,9-fache mittlere CPD-Induktion auf, die zum Zeitpunkt 24 h nach Behandlung ebenfalls nur leicht auf eine etwa 2,6-fache Induktion zurückging. Die UVB-Bestrahlung führte bei *taut* $-/-$ Mäusen 6 h nach Behandlung zu einer knapp 2-fachen CPD-Induktion, die 24 h nach UVB-Exposition unverändert blieb (Abb. IV.3.). Die Unterschiede zwischen den Genotypen sind minimal und statistisch nicht signifikant. Somit löste UVB-Bestrahlung bei *taut* $-/-$, *taut* $+/-$ und *taut* $+/+$ Tiere keinen Unterschied, sondern vergleichbare Mengen an UVB-induzierten DNS-Schäden, wie die Bildung von CPD, aus. Das bedeutet daher, dass die beobachtete höhere UVB-Sensibilität bei *taut* $-/-$ Mäusen im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen hinsichtlich ihrer UVB-induzierbaren Immunsuppression nicht auf einer stärkeren Schädigung der DNS beruht. Eine Korrelation zwischen Taurinmangel in der Haut und UVB-induzierten DNS-Schäden scheint daher auszuschließen zu sein.

Die nur geringe Abnahme der DNS-Schäden 24 h nach UVB-Exposition im Vergleich zu den 6 h-Werten bei den *taut* $+/-$ und *taut* $+/+$ Tieren und die Stagnation der DNS-Schäden zwischen 6

und 24 h bei den *taut* $-/-$ Mäusen deutet darauf hin, dass dieser Mausstamm über eine mäßige bzw. verzögerte DNS-Reparatur verfügt. Der Literatur ist zu entnehmen, dass der UVB-sensible Mausstamm C3H/HeN bereits 16 h nach UVB-Bestrahlung DNS-Schäden deutlich reduzierte (223).

A CPD-Bildung in der Rückenhaut nach 100 mJ/cm² UVB

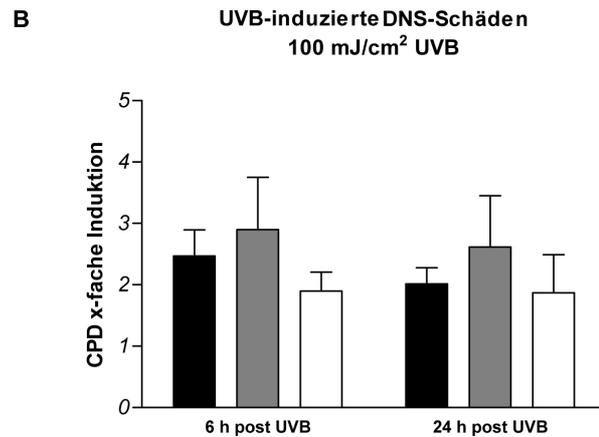
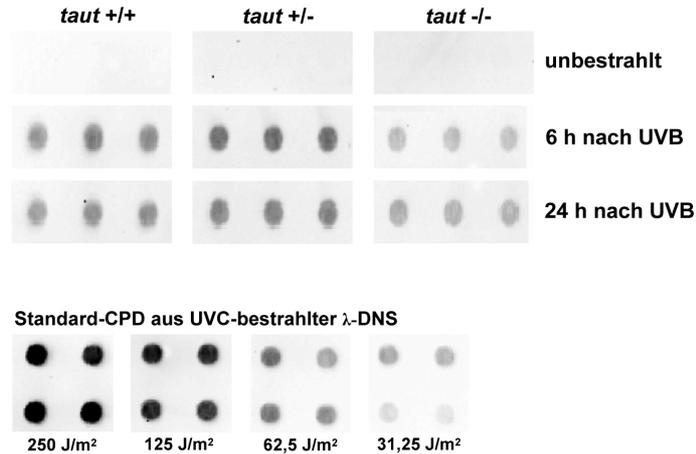


Abbildung IV.3. Die rasierte Rückenhaut von *taut* $-/-$, *taut* $+/-$ and *taut* $+/+$ Mäusen wurde mit 100 mJ/cm² UVB bestrahlt. 6 h and 24 h später wurden Hautproben der UVB-exponierten Hautstellen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff bei -196 °C tiefgefroren. Anschließend wurde die DNS extrahiert und der Gehalt an CPD als DNS-Schädigung bestimmt wie unter Material und Methoden beschrieben. Der CPD-Gehalt der DNS von rasierten, aber unbestrahlten Tieren des entsprechenden Genotyps diente als Kontrollwert. A) Abgebildet sind repräsentative South-Western Dot blots der DNS der Hautproben von allen drei *taut* Genotypen jeweils einer unbestrahlten Maus, einer Maus 6 h nach UVB-Exposition und einer Maus 24 h nach UVB-Behandlung in Dreifachbestimmung. B) Mithilfe der CPD-Standards und der definiert eingesetzten DNS-Mengen lassen sich die Dot blot-Daten als Enzym-sensitve Orte/Megabasen quantifizieren. Für Abbildung IV.3. B wurden aus dieser Quantifizierung die UVB-induzierten CPD-Induktionen aller Tiere verglichen auf Basis der entsprechenden unbestrahlten Kontrolle berechnet. Die Daten sind die Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes. Die Gruppen bestanden aus jeweils drei Tieren.

IV.4. UVB-bestrahlte primäre Maus-Keratinocyten von homozygoten Taurintransporter-defizienten Mäusen produzieren größere Mengen an Plättchen-aktivierendem Faktor als primäre Maus-Keratinocyten von Wildtyp-Mäusen.

Da in *taut -/-* Tieren keine höhere Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierten DNS-Schäden festgestellt werden konnte, wurde der Frage nachgegangen, ob die primären Maus-Keratinocyten dieser Tiere möglicherweise zu UVB-induzierten Membranschäden neigen. Walterscheid und Kollegen zeigten in ihrer im Jahr 2002 veröffentlichten Studie, dass das Freisetzen von Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF), welcher aus Phospholipiden der Zellmembran von Hautzellen nach UVB-Exposition generiert wird (siehe Einleitung 1.1.5.c. *Zellmembranveränderungen und Freisetzung des Lipidmediators PAF*), ein sehr früher Schritt in der Induktion von UVB-bedingter Immunsuppression ist (92). Aufgrund der Bindungseigenschaften von Taurin an Phospholipide (224) und Taurins Eigenschaft, Zellmembranen zu stabilisieren (206), wurde untersucht, ob das Fehlen eines funktionellen Taurintransporters dazu führt, dass primäre Maus-Keratinocyten von *taut -/-* Mäusen nach UVB-Bestrahlung vermehrte Mengen an PAF produzieren im Vergleich zu den primären Maus-Keratinocyten von *taut +/-* und *taut +/+* Tieren.

Aus Literaturdaten ist bekannt, dass PAF-Rezeptor positive KB Zellen (eine humane epitheliale Zelllinie, die aus einem epidermalem Karzinom des Mundes isoliert wurde) nach einer Bestrahlung mit 60 mJ/cm² UVB große Mengen an PAF freisetzen (225). Daher wurde diese UVB-Dosis auch für die Bestrahlung der primären Maus-Keratinocyten der drei Genotypen in dieser Arbeit gewählt, um PAF-Freisetzungen zu untersuchen.

Da zudem gezeigt wurde, dass die Produktion von *sn-2*-Acetyl-Glycerophosphocholin-Spezies (PAF-Spezies) sowohl von carbamyl-PAF-behandelten KB Zellen (226) als auch von Ionophorstimulierten HaCaT Keratinocyten (eine spontan immortalisierte humane Keratinocytenzelllinie) etwa 10 min. nach Behandlung ihren Peak hatten (227), wurde in der vorliegenden Arbeit die PAF-Menge in den primären Maus-Keratinocyten ebenfalls 10 min. nach UVB-Bestrahlung bestimmt. Um zu überprüfen, ob eine UVB-induzierte PAF-Freisetzung nach diesem Zeitpunkt abnimmt oder weiter steigt, wurde die PAF-Freisetzung zusätzlich 30 min. nach Bestrahlung gemessen (Abb. IV.4.). Als Referenzwerte dienten PAF-Konzentrationen von primären Maus-Keratinocyten der entsprechenden Genotypen, die gleich behandelt, aber nicht mit UVB bestrahlt wurden. In Abbildung IV.4. sind die UVB-bedingten PAF-Induktionen basierend auf den Werten der Kontrollzellen dargestellt.

In primären Maus-Keratinocyten von *taut +/+* Mäusen führte UVB-Bestrahlung weder nach 10 min. noch nach 30 min. zu einer Induktion von PAF über den Hintergrundlevel hinaus (Abb. IV.4., schwarze Balken). In deutlichem Unterschied dazu resultierte die UVB-Behandlung nach 10 min. bei primären Maus-Keratinocyten von *taut -/-* Tieren in einer circa 1,6-fachen Erhöhung der PAF-Produktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abb. IV.4., weiße Balken). 30 min. nach der UVB-Exposition wiesen diese Maus-Keratinocyten im Mittel eine 1,8-fache Erhöhung der PAF-Menge auf (Abb. IV.4., weißer Balken). Damit zeigt sich zum Einen, dass eine PAF-

Freisetzung bei diesen Zellen ebenfalls in den ersten Minuten lokalisiert ist, die 30 min. nach der Behandlung noch leicht weiter ansteigt. Zum Anderen lässt sich feststellen, dass primäre Maus-Keratinocyten aus *taut*^{-/-} Mäusen mit vermehrter PAF-Freisetzung auf UVB-Bestrahlung reagieren, während die PAF-Produktion in Keratinocyten von *taut*^{+/+} Tieren durch UVB unbeeinflusst bleibt.

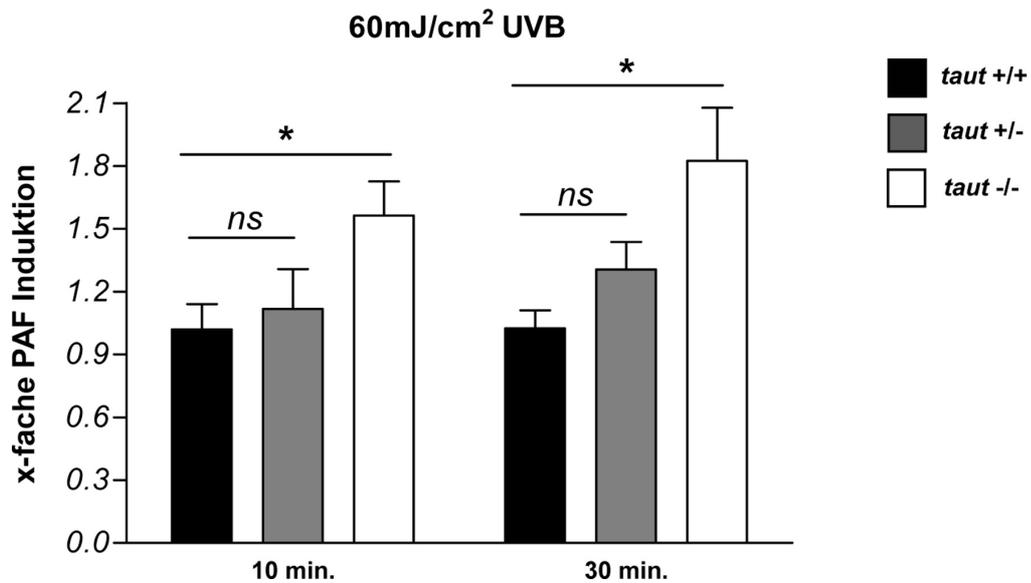


Abbildung IV.4. Primäre epidermale Maus-Keratinocyten von *taut*^{+/+}, *taut*^{+/-} and *taut*^{-/-} Mäusen wurden mit 60 mJ/cm² UVB *in vitro* bestrahlt. 10 min. und 30 min. nach der UVB-Exposition wurden die Lipide mithilfe eines Chloroform/Methanol-Gemisches (2:1, v/v) extrahiert. Für die Lipidextraktion wurden festgesetzte Proteinmengen der Proben eingesetzt. Kontrollzellen des entsprechenden Genotyps wurden identisch behandelt, jedoch nicht mit UVB bestrahlt. Die extrahierten Lipidproben wurden auf Kieselgelplatten in der HPTLC separiert. Die PAF-Konzentration wurde quantifiziert wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Ergebnisse zeigen die UVB-induzierte x-fache PAF-Induktion auf Basis der entsprechenden unbestrahlten Kontrollzellen. Die Daten sind die Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes. Ein Sternchen zeigt statistisch signifikante Unterschiede versus den *taut*^{+/+} Keratinocyten (two-tailed Student's t Test, p-Wert < 0,05; n = 4 – 6) an. Das Experiment wurde 6 mal durchgeführt.

Primäre Maus-Keratinocyten, die aus *taut*^{+/-} Tieren isoliert wurden, wiesen 10 min. nach UVB-Exposition nahezu keine PAF-Induktion (1,1-fach) auf, zeigten aber nach 30 min. eine leichte Induktion von PAF (1,3-fach) und damit eine nur leichte Erhöhung der PAF-Freisetzung nach UVB-Behandlung, die allerdings verglichen mit den Ergebnissen der *taut*^{+/+} Keratinocyten statistisch nicht signifikant erhöht ist (Abb. IV.4., graue Balken). Somit liegt die Stärke der PAF-Freisetzung der UVB-bestrahlten *taut*^{+/-} Keratinocyten zwischen denen der *taut*^{+/+} und der *taut*^{-/-} Keratinocyten.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass primäre Maus-Keratinocyten, welchen der funktionsfähige Taurintransporter fehlt, eine Taurintransporter-expressionsabhängige Freisetzung von PAF-

Ergebnisse

oder PAF-ähnlichen Lipiden haben und infolgedessen zu UVB-induzierter PAF-Freisetzung aus Zellmembranlipiden neigen. Daraus lässt sich schließen, dass diese Zellen empfindlicher für UVB-induzierte Membranschädigungen sind.

IV.5. UVB-Bestrahlung führt bei primären Maus-Keratinocyten von homozygoten Taurintransporter-defizienten Mäusen zu stärkerer Expression des Gens für Interleukin-10 als bei primären Maus-Keratinocyten von Wildtyp-Mäusen, aber zu gleicher COX-2 Expression.

Um zu überprüfen, ob die gemessene PAF-Freisetzung möglicherweise mit einer UVB-induzierten Genexpression in den Maus-Keratinocyten korreliert, wurde die UVB-induzierte Expression der immunmodulatorischen Gene für IL-10 und für COX-2 in primären Maus-Keratinocyten von *taut* *+/+* und *taut* *-/-* Tieren untersucht.

Da sowohl PAF als auch UVB die Transkription des IL-10-Gens in murinen Keratinocyten aktivieren kann (92), und gezeigt wurde, dass von Keratinocyten sezerniertes IL-10 ein zentraler Faktor der UVB-induzierten Immunsuppression ist (87), wurde hier die IL-10 mRNA Expression von UVB-behandelten Maus-Keratinocyten aus *taut* *-/-* Mäusen mit jener der Maus-Keratinocyten aus *taut* *+/+* Mäusen verglichen.

Neben dem IL-10 ist auch das PGE₂ an der Ausprägung einer Immunsuppression durch UVB beteiligt (85). Zudem wurde ein Zusammenhang zwischen der PAF-Rezeptoraktivierung und der PGE₂-Freisetzung in Keratinocyten beschreiben (226). An der Synthese des PGE₂ ist das Enzym Cyclooxygenase-2 (COX-2) entscheidend beteiligt. Da die Menge der COX-2 mRNA mit dem COX-2-Enzym und nachfolgend mit der PGE₂-Freisetzung eng korreliert (226), wurde hier die Induktion der COX-2 mRNA in den primären Maus-Keratinocyten von *taut* *-/-* und *taut* *+/+* Mäusen nach UVB-Behandlung getestet.

Hierzu wurden die Maus-Keratinocyten mit entweder 10 oder 20 mJ/cm² UVB bestrahlt, die totale RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung isoliert und die relative Menge an IL-10 und COX-2 mRNA wurde basierend auf zwei verschiedenen Haushaltsgenen mittels semiquantitativer Real time PCR analysiert (Abb. IV.5. A, B). Als Referenzwerte dienten die relativen Mengen an IL-10 bzw. COX-2 mRNA aus Kontrollzellen des entsprechenden Genotyps, die gleich behandelt, aber nicht mit UVB bestrahlt wurden. In der Abbildung IV.5. A – B sind die UVB-bedingten IL-10 Induktionen, in der Abbildung IV.5. C – D die UVB-verursachten COX-2 Induktionen von *taut* *+/+* Keratinocyten und *taut* *-/-* Keratinocyten basierend auf den Werten der Kontrollzellen dargestellt.

In Abbildung IV.5. A ist zu erkennen, dass die Keratinocyten der *taut* *+/+* Mäuse (schwarze Balken) nach einer Bestrahlung mit 10 mJ/cm² UVB zu den frühen Zeitpunkten bis 12 h nach Bestrahlung mit nur geringer Aufregulierung der IL-10 mRNA um das 2-fache reagierten, jedoch 24 h nach der UVB-Behandlung eine etwa 3,6-fache Aufregulierung von IL-10 aufwiesen. Im Vergleich dazu zeigten die Keratinocyten der *taut* *-/-* Mäuse (weiße Balken) bereits zu den sehr frühen Zeitpunkten eine deutliche IL-10 Aufregulierung. Direkt nach der UVB-Bestrahlung (Zeitpunkt 0 h) konnte hier bereits eine 2-fache IL-10 Erhöhung festgestellt werden. Diese stieg dann stetig über den gemessenen Zeitraum bis zu 12 h auf das etwa 4-fache an. 24 h nach der Bestrahlung nahm die UVB-induzierte IL-10 Aufregulierung gegenüber der nach 12 h leicht ab

und sank auf ein etwa 3,5-Faches, was allerdings im Schwankungsbereich liegt und hier noch nicht als eindeutige Abnahme zu sehen ist.

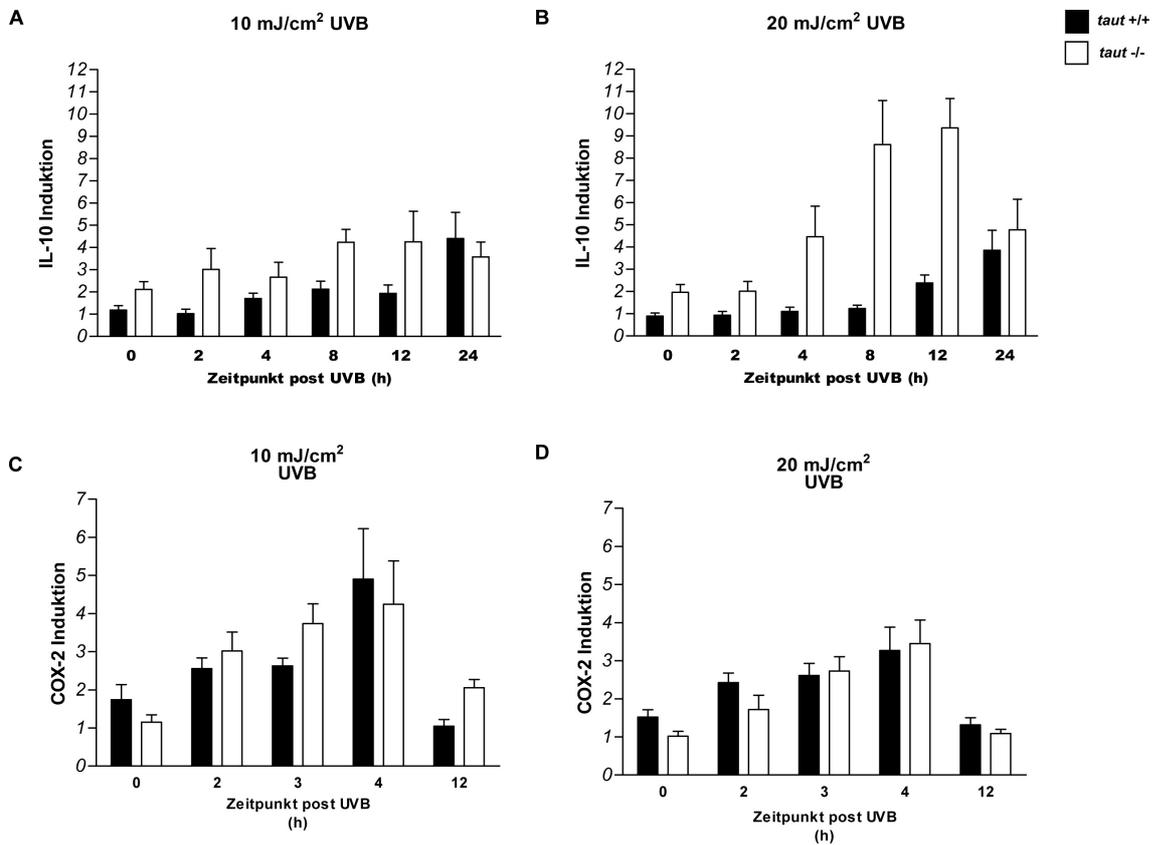


Abbildung IV.5. Primäre epidermale Maus-Keratinocyten von *taut*^{-/-} Mäusen (weiße Balken) und *taut*^{+/+} Mäusen (schwarze Balken) wurden mit 10 mJ/cm² UVB (A und C) oder 20 mJ/cm² UVB (B und D) bestrahlt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, und die Gesamt-RNS wurde isoliert. Die Ausprägung der IL-10 mRNS (A und B) und COX-2 mRNS (C und D) basierend auf zwei verschiedenen Haushaltsgenen (RPS6 und GAPDH) wurde anschließend mittels semiquantitativer Real Time PCR gemessen und analysiert wie in Material und Methoden beschrieben. Die Daten sind dargestellt als UVB-induzierte x-fache Induktion auf Basis der IL-10- und Cox-2-Ausprägung von unbestrahlten Kontrollzellen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes von zwei unabhängigen Experimenten.

Abbildung IV.5. B zeigt die IL-10 Induktion nach Bestrahlung der Maus-Keratinocyten mit der höheren UVB-Dosis von 20 mJ/cm². Analog zu den Ergebnissen in Abbildung IV.5. A reagierten die Keratinocyten der *taut*^{+/+} Mäuse auf die UVB-Behandlung zu den frühen Zeitpunkten bis 8 h nicht mit der Aufregulierung der IL-10 mRNS (Abb. IV.5. B, schwarze Balken). Nach 12 h wurde allerdings eine etwas mehr als 2-fache Aufregulierung von IL-10 gemessen, die 24 h nach der Bestrahlung auf eine knapp 4-fache Aufregulierung wie nach der geringeren UVB-Dosis von 10 mJ/cm² ansteigt. Die UVB-bedingte IL-10 Induktion bei den Zellen der *taut*^{+/+}

Tiere setzte damit erst zu späteren Zeitpunkten ein und scheint in ihrer Stärke unabhängig von der UVB-Dosis zu sein und ihr Maximum bereits bei der geringeren UVB-Dosis erreicht zu haben.

Im Gegensatz zu den Zellen der *taut +/+* Mäuse, reagierten die Keratinozyten der *taut -/-* Mäuse auch bei der höheren UVB-Dosis von 20 mJ/cm^2 bereits sehr schnell direkt nach der UVB-Exposition mit einer 2-fachen Aufregulierung der IL-10 mRNA (Abb. IV.5. B, weiße Balken). 4 h nach der Bestrahlung stieg die IL-10 mRNA Expression stark an auf einen etwa 4,5-fachen Wert der Kontrollzellen und nahm 8 und 12 h nach der Bestrahlung weiterhin rapide zu. 8 h nach Bestrahlung wurde im Mittel eine etwa 8,5-fache, 12 h nach Bestrahlung eine über 9-fache Aufregulierung der IL-10 mRNA gemessen. 24 h nach der UVB-Behandlung sank diese extreme IL-10 Aufregulierung auf das circa 5-fache der Kontrollzellen zurück. Diese Ergebnisse bestätigen den zeitlichen Verlauf der UVB-induzierten IL-10 Induktion der *taut -/-* Keratinozyten, der sehr früh beginnt und seinen Peak zwischen 8 und 12 h nach UVB-Behandlung erreichte. Dieser Verlauf unterscheidet sich deutlich vom zeitlichen Verlauf der *taut +/+* Keratinozyten, die erst zu späteren Zeitpunkten nach UVB-Behandlung mit einer IL-10 Aufregulierung reagierten und ihr Maximum bei 24 h oder später hatten (spätere Zeitpunkte wurden in dieser Arbeit nicht gemessen). Weiterhin unterschieden sich die *taut -/-* Keratinozyten auch hinsichtlich der Höhe der IL-10 Induktion durch UVB von den *taut +/+* Keratinozyten, denn sie zeigten eine deutlich stärkere UVB-induzierte IL-10 Aufregulierung als die *taut +/+* Zellen, die außerdem dosisabhängig zunahm.

Die Messungen zu den COX-2 Induktionen durch 10 mJ/cm^2 UVB (Abb. IV.5. C) zeigten bei den Keratinozyten der *taut +/+* Tiere (Abb. IV.5. schwarze Balken) einen raschen, 2-fachen Anstieg bereits 2 h nach der Bestrahlung, der bei 4 h sein Maximum mit einer etwa 4,5-fachen Induktion erreichte, um 12 h nach Bestrahlung auf den Kontrollwert zu sinken. Die Zellen der *taut -/-* Mäuse (Abb. IV.5. weiße Balken) zeigten im Vergleich dazu einen parallelen Verlauf in der UVB-bedingten COX-2 Induktion, sodass kein Unterschied, weder in der Zeitkinetik noch in der Stärke, festzustellen war. Ein vergleichbares Ergebnis zur COX-2 Induktion in den Keratinozyten der beiden Maus-Genotypen zeigte sich bei der höheren UVB-Dosis von 20 mJ/cm^2 (Abb. IV.5. D). Hier lag der 4 h Maximalwert sowohl bei den *taut -/-* und *taut +/+* Keratinozyten mit etwa 3-fachen Induktionen sogar leicht unter dem Maximalwert, der bei der geringeren UVB-Dosis von 10 mJ/cm^2 gemessen wurde. Das deutet darauf hin, dass in beiden Genotypen die COX-2 Induktion bereits durch niedrige UVB-Dosen ihr Maximum erreichte und durch höhere Dosen nicht weiter gesteigert werden kann. Insgesamt konnte kein Unterschied in der UVB-induzierten COX-2 Expression zwischen den Hautzellen der *taut -/-* und *taut +/+* Mäuse weder zeitlich, in der Höhe noch dosisabhängig gemessen werden.

IV.6. UVB-induzierte Immunsuppression kann durch Blocken des PAF Rezeptors ausschließlich in homozygoten Taurintransporter-defizienten Mäusen aufgehoben werden.

Im Folgenden wurde die Rolle von Taurin in der UVB-induzierten und PAF-vermittelten Immunsuppression in Mäusen untersucht. Um zu testen, ob die höhere Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression der *taut* $-/-$ Tiere (Abb. IV.2. A – D) *in vivo* auf UVB-vermittelter PAF-Freisetzung und PAF-Rezeptoraktivierung beruht, wurde eine potenzielle PAF-Rezeptoraktivierung durch den spezifischen PAF-Rezeptorantagonisten PCA-4248 gehemmt, indem dieser 1 h vor jeder UVB-Bestrahlung i.p. in Gruppen von *taut* $+/+$, *taut* $+/-$ und *taut* $-/-$ Mäusen (Abb. IV.6, PCA4248+UVB) injiziert wurde. Eine weitere Gruppe der drei Maus-Genotypen erhielt an vier aufeinander folgenden Tagen im Abstand von 24 h eine i.p. Injektion mit carbamyl-PAF (Abb. IV.6., cPAF), eine PAF-Spezies, die metabolisch nicht so schnell abgebaut wird, daher längere Zeit stabil bleibt und den PAF-Rezeptor aktivieren kann. Diese Gruppen sollten dazu dienen, zu überprüfen, ob der PAF-Rezeptor in allen drei Genotypen aktiviert und hierdurch eine Suppression der Kontaktsensibilisierung erreicht werden kann. Die UVB-Gruppen wurden an vier aufeinander folgenden Tagen nur mit dem reinen Lösungsmittel i.p. injiziert und 1 h später mit UVB behandelt (Abb. IV.6., UVB), welche als Referenz für die mit dem PAF-Rezeptorantagonisten behandelten Gruppen diente. Kontrollgruppen erhielten ebenfalls an vier aufeinander folgenden Tagen im Abstand von 24 h i.p. Injektionen mit dem reinen Lösungsmittel, wurden jedoch nicht mit UVB bestrahlt (Abb. IV.6., pos. Kontrolle, neg. Kontrolle).

Da in diesem Experiment der Einfluss des PAF-Rezeptorantagonisten auf die UVB-induzierte Immunsuppression bei allen drei Maus-Genotypen getestet werden sollte, wurde hier die mittlere UVB-Dosis von 200 mJ/cm^2 eingesetzt, die im Gegensatz zu der niedrigen Dosis von 100 mJ/cm^2 bei allen drei Genotypen im vorangegangenen Experiment (Abb. IV.2. A – D) zu einer statistisch signifikanten Suppression der Kontaktsensibilisierung führte. Wie in Abbildung IV.2. A – D bereits gezeigt wurde, führte eine Bestrahlung mit einer UVB-Dosis von 200 mJ/cm^2 bei allen drei Genotypen zu einer signifikanten Suppression der Kontaktsensibilisierung (Abb. IV.6. A – C, UVB). Dabei zeigten die *taut* $-/-$ Tiere wie zuvor beschrieben eine stärkere UVB-induzierte Immunsuppression (62%) als die *taut* $+/-$ Mäuse (41%) und die *taut* $+/+$ Mäuse (38%).

Der Einsatz des PAF-Rezeptorantagonisten PCA-4248 bei *taut* $+/+$ Mäusen (Abb. IV.6. A, PCA4248+UVB) als auch bei *taut* $+/-$ Mäusen (Abb. IV.6. B, PCA4248+UVB) hatte hier keinen Einfluss auf die Unterdrückung der Immunantwort durch UVB, was auf einen PAF-unabhängigen Mechanismus in der UVB-induzierten Immunsuppression bei diesen Tieren hindeutet. Im Gegensatz dazu führten die PCA-4248-Injektionen vor den UVB-Bestrahlungen bei den *taut* $-/-$ Mäusen zu einer vollständigen Aufhebung der UVB-induzierten Suppression der Kontaktsensibilisierung (Abb. IV.6. C, PCA4248+UVB). Die mittlere Ohrschwellung dieser Gruppe liegt statistisch signifikant oberhalb der UVB-Gruppe (Abb. IV.6. C, UVB) und ist vergleichbar mit der positiven Kontrolle (Abb. IV.6. C, pos. Kontrolle). Dieses Ergebnis weist

stark auf einen PAF-abhängigen Mechanismus in der UVB-induzierten Immunsuppression bei den *taut*^{-/-} Mäusen hin.

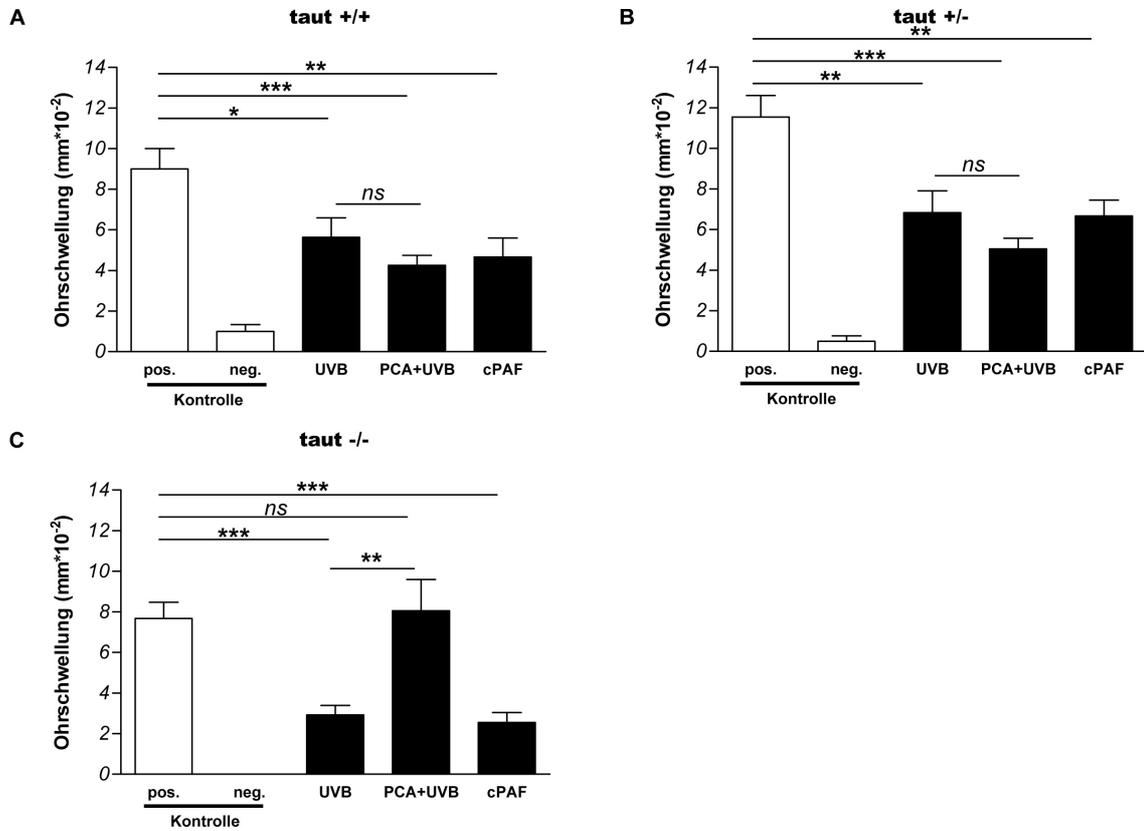


Abbildung IV.6. (A) *Taut*^{+/+} Mäusen, (B) *taut*^{+/-} Mäusen und (C) *taut*^{-/-} Mäusen wurden entweder 100 µl Lösungsmittel (12,5% DMSO in physiologischer Kochsalzlösung) (pos. Kontr., neg. Kontr., UVB) oder 125 nmol PAF-Rezeptor-Antagonist PCA-4248 (PCA+UVB) (in 100 µl Volumen) oder 500 pmol cPAF (cPAF) (in 100 µl Volumen) an vier aufeinanderfolgenden Tagen i.p. injiziert. Jeweils 1 h nach der Injektion wurden die Tiere mit 200 mJ/cm² UVB (UVB) an vier aufeinanderfolgenden Tagen bestrahlt. Die cPAF-Gruppen sowie die positiven und negativen Kontrollgruppen wurden jedoch nicht mit UVB bestrahlt. 24 h nach der letzten Bestrahlung bzw. 25 h nach der letzten Injektion wurden die Tiere mit einer 0,5%igen DNFB-Lösung auf der UVB-exponierten Rückenhaul bzw. der unbestrahlten Rückenhaul sensibilisiert (Tag 0). Negative Kontrollgruppen wurden nur mit dem DNFB-freien Lösungsmittel behandelt. Am Tag 5 wurden die Ohrdicken bestimmt, und anschließend wurden die Ohren mit einer 0,3%igen DNFB-Lösung bestrichen. 24 h später (Tag 6) wurde die Ohrschwellung gemessen. Die Ohrschwellung [mm × 10⁻²] wurde angegeben als Differenz zwischen der Ohrdicke direkt vor der Auslösung und der Ohrdicke 24 h nach der Auslösung der Kontaktsensibilisierung. Die Gruppen bestanden aus jeweils 5 – 6 Tieren. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes. Die Daten wurden mithilfe des „two-tailed student“ t test“ statistisch ausgewertet. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert (*, p-Wert < 0,05; **, p-Wert < 0,01; ***, p-Wert < 0,005). Eins von zwei Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen ist hier dargestellt.

Die Injektionen mit cPAF resultierten bei allen drei Maus-Genotypen in einer signifikanten Unterdrückung der Ohrschwellung (Abb IV.6. A – C, cPAF), was auf eine immunsuppressive Wirkung in der Kontaktsensibilisierung hindeutet, die unabhängig ist von der *taut*-Expression. Allerdings ist zu erwähnen, dass der stärkste Effekt durch cPAF in den *taut* $-/-$ Tieren zu messen war (67% Suppression) (Abb. IV.6. C, cPAF) verglichen mit einer Suppression der Kontaktsensibilisierung von 42% bei den *taut* $+/-$ Mäusen (Abb. IV.6. B, cPAF) und von 48% bei den *taut* $+/+$ Mäusen (Abb. IV.6. A, cPAF).

V. Diskussion

Aus der Literatur ist seit Kurzem bekannt, dass Taurin in Hautzellen eine wichtige Rolle bei zellulären Stressantworten spielt. In Zellkulturexperimenten wurde beobachtet, dass zum Ersten Taurin von epidermalen Keratinozyten sowohl nach hyperosmotischem Stress als auch nach UVB-Exposition intrazellulär angereichert wurde (181), und dass zum Zweiten die Taurinakkumulation vor UVB-induzierter Apoptose schützte (182). Aus diesen *in vitro* Befunden stellte sich die Frage, ob Taurin auch *in vivo* vor Stress-induzierten, insbesondere vor UVB-induzierten Zellschäden schützen kann. Eine der wichtigsten *in vivo* Schädigung, die durch UVB-Strahlung verursacht wird, ist die Immunsuppression, die in Kombination mit den mutagenen Eigenschaften des UVBs zur Ausbildung von Hautkrebs führen kann (6). So sollte im Rahmen dieser Dissertationsarbeit geklärt werden,

1. ob die Taurinkonzentration in der Haut mit der Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression in Zusammenhang steht und
2. wenn ja, auf welcher molekularbiologischen Ebene schützende Eigenschaften durch Taurin vor der UVB-induzierten Immunsuppression festzustellen sind.

V.1. Die Haut der Taurintransporter-defizienten Maus

Um diesen offenen Fragen nachzugehen, stand für die Untersuchungen ein einzigartiges Gen-defizientes Mausmodell zur Verfügung: die Taurintransporter (*taut*)-defiziente Maus. Dieses transgene Mausmodell besteht aus homozygoten *taut*-defizienten (*taut*^{-/-}), heterozygoten *taut*-defizienten (*taut*^{+/-}) und *taut* Wildtyp (*taut*^{+/+}) Tieren.

Zwar ist bekannt, dass bei den *taut*^{-/-} Tieren der Tauringehalt in einer Reihe von Organen im Vergleich zu den *taut*^{+/+} Tieren stark reduziert ist (siehe Einleitung 1.2.2. *Die Taurintransporter-defiziente Maus*), jedoch war bislang unbekannt, wie sich das Fehlen eines funktionsfähigen Taurintransporters auf Hautzellen auswirkt. Daher wurde zunächst die Konzentration von Taurin in der Haut der drei *taut* Maus-Genotypen untersucht, um sie miteinander zu vergleichen und zu klären, ob hier ein signifikanter Unterschied festzustellen ist. Die eingesetzte Methode der ¹H NMR-Spektroskopie erlaubte es außerdem einen Großteil der anderen organischen Solute der Hautzellen zu bestimmen, sodass Konzentrationsänderungen anderer organischer Substanzen infolge eines Taurinmangels detektiert werden konnten.

Wie aus Tabelle IV.1 abgeleitet werden kann, macht der Taurinlevel in der Haut von normalen Wildtyp-Mäusen, den *taut*^{+/+} Tieren, etwa 24% des gesamten Gehaltes an organischen Substanzen aus, die mithilfe der ¹H NMR-Spektroskopie gemessen wurden. Damit ist Taurin das häufigste organische Solut in der Haut der *taut*^{+/+} Tiere, gefolgt von Laktat mit 19% und Glycin mit 14%. Der hohe Tauringehalt in der Haut lässt vermuten, dass das organische Osmolyt eine große Bedeutung für die Integrität und Funktion der Hautzellen hat.

Wie man der Literatur entnehmen kann, ist Taurin nicht gleichmäßig in den Hautschichten verteilt. Immunhistochemische Analysen von Hautschnitten aus Ratten, Hunden und dem Menschen zeigten, dass Taurin in hohen Mengen in der Epidermis und hier insbesondere im äußeren Stratum spinosum und Stratum granulosum vorkommt, während in der Dermis

schwächere Färbungen in Endothelzellen des Kapillarsystems, einigen Fibroblasten und Zellen der Schweißdrüsen gefunden wurden und die Hornzellen der Epidermis frei von Taurin waren (182;228).

Das Fehlen des Taurintransporters TAUT führte zu einer drastischen Reduktion des Tauringehaltes in der Haut von *taut -/-* Mäusen von ursprünglich 24% des Gesamtgehaltes an organischen Molekülen bei den *taut +/+* Tieren auf lediglich 1,5% (Abb. IV.1. und Tabelle IV.1.). Dieser Verlust wird durch die Aufkonzentrierung anderer organischer Moleküle, in besonderem Maße von Glutamin von normalen 5% auf 10%, von Glutamat von normalen 7% auf 13% und Betain und Carnitin von normalen 0,5 bzw. 0,3% auf 2,1% ausgeglichen, sodass die Summe aller gemessenen organischen Moleküle in der Haut von *taut -/-* Mäusen und *taut +/+* Tieren gleich bleibt und damit auch die Osmolarität auf Basis der organischen Substanzen. Ein ähnlicher Ausgleich wurde auch bei den *taut +/-* Mäusen festgestellt, wenngleich der Taurinverlust auf 17% des Gesamtgehaltes an organischen Molekülen weniger stark und damit auch der Ausgleich moderater war (Tabelle IV.1).

Einen Taurinmangel durch die Aufkonzentrierung anderer organischer Substanzen auszugleichen und damit die Summe an organischen Substanzen, welche die Gesamtosmolarität der Zelle mitbestimmen, konstant zu halten, ist dabei nicht nur auf die Haut beschränkt. ¹H NMR-Spektroskopiemessungen des Herzmuskels und der Skelettmuskulatur in demselben *taut*-defizienten Mausmodell zeigten, dass der Herzmuskel den Taurinverlust auf vergleichbare Weise wie die Haut kompensiert, indem ebenfalls organische Moleküle wie Glutamin/Glutamat, Alanin, Acetat und Glycin aufreguliert waren (213). Im Gegensatz dazu wurde der Taurinmangel in der Skelettmuskulatur jedoch nicht ausgeglichen. Die Folge waren Funktions- und Leistungsverluste der Skelettmuskulatur sowohl bei jungen als auch alten *taut -/-* Tieren verglichen mit *taut +/+* Tieren, wohingegen die Herzfunktionen bei den *taut -/-* Mäusen im Normbereich lagen.

Die Ergebnisse der ¹H NMR-Spektroskopie-Messungen der vorliegenden Studie zeigten deutlich, dass das Fehlen eines funktionalen Taurintransporters zu einer drastischen Taurinreduktion in der Haut führte, wobei die Gesamtosmolarität auf Basis der organischen Solute, die über die ¹H NMR-Spektroskopie gemessen wurden, unbeeinflusst blieb. In Zusammenhang mit den makroskopischen Beobachtungen der Haut der *taut -/-* Mäuse (in dieser Arbeit nicht dokumentiert), die keinerlei sichtbaren Unterschiede zu den *taut +/+* und *taut +/-* Tieren aufwiesen, ist davon auszugehen, dass die wichtigsten Grundfunktionen der Hautzellen erhalten sind. Unter normalen Bedingungen scheint die Fähigkeit, ein osmolytisches Gleichgewicht auf Basis organischer Substanzen in der Haut aufrecht zu erhalten, bei den *taut -/-* Mäusen unter ihrem starken Taurinmangel nicht eingeschränkt zu sein. Mit diesem Befund eignete sich dieses transgene Mausmodell in idealer Weise dazu, eventuelle protektive Effekte von Taurin vor UVB-induzierten Schädigungen *in vivo* wie der UVB-induzierten Immunsuppression zu studieren.

V.2. Höhere Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression durch Taurinmangel

Trotz der unveränderten Osmolarität der Haut von *taut* $-/-$ Mäusen auf Basis der gemessenen organischen Substanzen resultierte der starke Mangel des normalerweise hoch konzentrierten Taurins in einer geringeren Stressresistenz, was sich an einer höheren Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression beobachten ließ (Abb. IV.2. A – D). Die höhere UVB-Empfindlichkeit zeigte sich vor allem darin, dass eine signifikante Suppression der Kontaktsensibilisierung bei *taut* $-/-$ Tieren bereits durch eine niedrige UVB-Dosis (100 mJ/cm^2) hervorgerufen wurde, die weder bei *taut* $+/+$ noch bei *taut* $+/-$ Tieren einen signifikanten Einfluss hatte. Bei mittleren UVB-Dosen (200 mJ/cm^2) konnte allerdings auch bei den *taut* $+/+$ und *taut* $+/-$ Mäusen signifikante Immunsuppression beobachtet werden. Dennoch ist zu beachten, dass die *taut* $-/-$ Tiere stärker auf die UVB-Behandlung bei der mittleren Dosis von 200 mJ/cm^2 reagierten als die beiden anderen Maus-Genotypen. Bei der höchsten UVB-Dosis (400 mJ/cm^2), die hier angewendet wurde, verschwanden die Unterschiede zwischen den drei *taut* Genotypen. Weiter sei darauf hingewiesen, dass die Höhe des Taurinspiegels in der Haut offenbar konzentrationsabhängig die UVB-Empfindlichkeit beeinflusst. Beim Vergleich der Ergebnisse der *taut* $+/-$ Tiere mit denen der *taut* $+/+$ Mäuse ergibt sich zwar kein statistisch signifikanter Unterschied in der Stärke der UVB-induzierten Immunsuppression, die Suppression lag aber dennoch immer etwas über der, welche bei den *taut* $+/+$ Mäusen gemessen wurde (Abb. IV.2. D). Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass ein Schutz vor UVB-bedingten Hautschäden umso besser und effektiver ist, je näher am physiologischen Normbereich der Taurinspiegel in der Haut ist.

Dieses Ergebnis zeigt erstmalig, dass die Stärke des Taurinmangels mit der Induzierbarkeit einer Immunsuppression durch UVB eng korreliert und ein physiologischer Taurinstatus schützende Wirkung vor der UVB-induzierten Immunsuppression besitzt. Dabei ist hervorzuheben, dass der schützende Effekt von Taurin offensichtlich nicht unbegrenzt ist, da hohe UVB-Dosen auch in Mäusen mit gutem Taurinstatus letztlich zur Immunsuppression führten. Gleichzeitig zeigte sich hierbei, dass die *taut* $+/+$ und *taut* $+/-$ Tiere ebenfalls abhängig von der Dosis sensibel auf UVB-Bestrahlung reagierten und nicht grundsätzlich resistent gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression waren. Im Vergleich zu Mäusen des Stammes C57Bl/6, die, wie aus der Literatur zu entnehmen ist, eine signifikante Reduktion der Kontaktsensibilisierung bereits bei der niedrigen UVB-Dosis von 100 mJ/cm^2 aufweisen (218) und zu den Mausstämmen mit hoher UVB-Sensibilität zählen (166), sind die *taut* $+/+$ und *taut* $+/-$ Tiere weniger sensibel gegenüber den immunsuppressiven Effekten des UVBs, da eine signifikante Reduktion nur durch höhere UVB-Dosen erreicht wurde. Da bekannt ist, dass der genetische Hintergrund von Mäusen die Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression bestimmt (166), könnte die abweichende UVB-Empfindlichkeit der *taut* $+/+$ Tiere von den C57Bl/6 Mäusen durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund verursacht werden. Die in dieser Arbeit untersuchten *taut* Tiere besitzen keinen reinen C57Bl/6 Hintergrund, sondern eine Mischung aus den Mausstämmen C57Bl/6 und 129/SvJ. Der starke

Taurinmangel bei den *taut* –/– Tieren führt zu einer höheren UVB-Empfindlichkeit dieses Maustammes.

Aufgrund der kompensatorischen Effekte in der Haut der *taut*-defizienten Mäuse, ist eine einfache Veränderung des osmolytischen Gleichgewichts an organischen Substanzen höchstwahrscheinlich nicht verantwortlich für die in dieser Arbeit beobachteten Phänomene auf Ebene der UVB-Empfindlichkeit. Die in diesem Versuch gemachten Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Taurin in der Haut eine einzigartige Schutzfunktion gegenüber UVB-Schädigungen besitzt, die offensichtlich nicht durch andere organische Moleküle, wie beispielsweise osmolytisch aktive Aminosäuren wie Alanin, Glutamin und Glycin oder Methylaminen wie Betain, ausgeglichen werden können.

V.3. Suche nach der molekularen Ursache

Dem neuartigen Befund, dass der Taurinstatus der Haut die Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression beeinflusst, folgte die Suche nach den zugrundeliegenden Mechanismen.

V.3.1. DNS-Schäden

Die DNS hat ihre Absorptionsmaxima zwischen 230 – 300 nm, sodass sie nicht nur ein ideales Chromophor für UVC-Strahlung, sondern auch für UVB-Strahlung ist (128). Bei der Absorption von UVB-Strahlung entstehen im DNS-Molekül Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) als eines der häufigsten Photoprodukte (221;229). Bereits seit den späten 1980er Jahren kennt man den Zusammenhang zwischen der Bildung von CPD und der UVB-induzierten Immunsuppression, und man erkannte in einer Reihe von Studien, dass die CPD eine primäre und direkte Ursache dieses UVB-verursachten Effekts sind (126;135;136). Als zellulären Mediator identifizierte man vornehmlich die LZ, denn es wurde mehrfach beobachtet, dass UVB-Bestrahlung die Antigenpräsentation in diesen Zellen stark reduzierte (134-136), aller Wahrscheinlichkeit nach über die gehemmte Expression des kostimulatorischen Moleküls ICAM-1 (113;126;137). So fand man heraus, dass eine Steigerung der DNS-Reparatur sowohl die UVB-induzierte Immunsuppression als auch die UVB-induzierte Reduktion des ICAM-1 aufheben konnte (113;126). Da aber auch die DNS der Keratinozyten durch UVB-Strahlung geschädigt wird, können sie über ihr verändertes Zytokinmuster ebenfalls die Antigenpräsentation der LZ verändern und Einfluss nehmen auf die Ausprägung von Immunantworten (80;82;83;86;87).

Da DNS-Schäden durch UVB-Strahlung im Allgemeinen als primäre Ursache für die Ausbildung von Immunsuppression gelten (126;135), sowie eine eingeschränkte Reparaturkapazität von UV-bedingten DNS-Schäden sowohl beim Menschen als auch bei Mäusen die UVB-Empfindlichkeit steigert (171;172), wurde geprüft, ob der höheren UVB-Empfindlichkeit der *taut* –/– Mäuse stärkere Schädigungen der DNS in Form von CPD-Bildungen zu einem frühen und einem späten Zeitpunkt zugrunde liegen. Ein Zusammenhang zwischen Taurinmangel in der Haut und erhöhten UVB-induzierten DNS-Schäden konnte jedoch im *taut*-defizienten Mausmodell nicht bestätigt werden (Abb. IV.3.) und ist daher aller Wahrscheinlichkeit nach auszuschließen. Da die Menge an UVB-induzierten CPD sich sowohl 6 als auch 24 Stunden

nach der UVB-Behandlung zwischen den drei Maus-Genotypen nicht unterschied, ist zudem auch davon auszugehen, dass der Taurinlevel die Reparaturkapazität von UVB-induzierten DNS-Schäden in Hautzellen nicht beeinflusst. Zudem scheint der hier untersuchte Mausstamm insgesamt UVB-induzierten DNS-Schäden nur langsam oder verzögert zu reparieren, da bei keinem der drei *taut* Maus-Genotypen 24 Stunden nach der UVB-Behandlung eine signifikante Abnahme der DNS-Schäden gegenüber den nach 6 Stunden gemessenen UVB-induzierten DNS-Schäden festgestellt werden konnte. Dagegen zeigten Studien am ebenfalls UVB-sensiblen Mausstamm C3H/HeN, dass dieser bereits 16 Stunden nach UVB-Bestrahlung DNS-Schäden deutlich reduzierte (223).

V.3.2. Membranschäden

Da die Untersuchung zu UVB-induzierten DNS-Schäden keine Korrelation zum Taurinstatus ergab, wurde die Ursache für die leichtere Induzierbarkeit eines immunsupprimierten Status durch UVB bei Taurinmangel daher auf anderer molekularbiologischer Ebene gesucht.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, ist eine DNS-Schädigung durch UVB nicht die einzige primäre molekulare Ursache für die Entstehung von UVB-induzierter Immunsuppression. Auch Veränderungen an der Zellmembran als frühe UVB-induzierte Schädigung können die Ausbildung eines immunsupprimierten Status zur Folge haben. Walterscheid und Kollegen schlugen vor, dass Membranlipide möglicherweise durch UVB-induzierte ROS attackiert werden und so über Lipidperoxidation die Freisetzung des Lipidmediators PAF bzw. PAF-ähnlicher Lipide verursachen, was in Folge die Ausprägung immunsuppressiver Zytokine nach sich zieht (92). Sie fanden, dass sowohl UVB-Bestrahlung als auch PAF bei einer murinen Keratinozytenlinie die intrazellulären mRNA-Level von COX-2 und dem immunsuppressiven Zytokin IL-10 steigerten (92). Außerdem beobachteten sie *in vivo*, dass ähnlich der UVB-Bestrahlung intraperitoneale (i.p.) Injektionen mit einem metabolisch stabilen PAF (Carbamyl-PAF, cPAF) sowie Injektionen von Phosphatidylcholin aus Eigelb, das unter Sauerstoffatmosphäre *in vitro* mit UVB bestrahlt worden war, die Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ gegen *Candida albicans*-Antigene bei Mäusen supprimierten. Die Suppression durch cPAF, UVB-bestrahltes Phosphatidylcholin als auch durch UVB konnten sie durch i.p. Injektionen verschiedener PAF-Rezeptor-Antagonisten, die eine Aktivierung des PAF-Rezeptors blockieren, oder eines COX-2-Inhibitors aufheben. Anhand dieser Ergebnisse postulierten sie, dass UVB-Bestrahlung zur Bildung von PAF oder PAF-ähnlichen Lipiden führt, vermutlich über ROS, die eine oxidative Fragmentierung des Membranlipids Phosphatidylcholin bewirken, woraufhin durch PAF-Rezeptoraktivierung eine immunmodulatorische Zytokinkaskade über PGE₂, IL-4, IL-8 und IL-10 in Gang gesetzt wird, die am Ende in einer Suppression von Th1-Immunantworten resultiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Disserationsarbeit bestätigen, dass der Lipidmediator PAF eine wichtige Rolle bei der Initiierung der UVB-induzierten Immunsuppression spielt. Mithilfe des *taut*-defizienten Mausmodells wird hier die Aminosulfonsäure Taurin erstmals als entscheidender Regulator dieses Prozesses vorgestellt. Denn im *taut*-defizienten Mausmodell

zeigte sich interessanterweise, dass primäre Keratinozyten von *taut* $-/-$ Mäusen *in vitro* auf UVB-Bestrahlung mit der Freisetzung von PAF zwischen 10 bis 30 Minuten nach der Behandlung reagierten, die Zellen der *taut* $+/+$ Tiere reagierten in diesem Zeitraum dagegen jedoch nicht und Keratinozyten von *taut* $+/-$ Tieren in nur geringem Maße (Abb. IV.4.). 10 Minuten nach UVB-Bestrahlung wiesen die epidermalen Keratinozyten von *taut* $-/-$ Mäusen eine etwa 1,6-fache PAF-Induktion auf, die 30 Minuten nach der Behandlung sogar noch auf eine 1,8-fache PAF-Induktion anstieg. Wenngleich in viel geringerem Maße und statistisch nicht signifikant gegenüber den Werten der *taut* $+/+$ Keratinozyten, wiesen die Keratinozyten der *taut* $+/-$ Tiere eine ähnliche Zeitkinetik auf wie die Zellen der *taut* $-/-$ Mäuse, denn die 1,1-fache PAF-Induktion 10 Minuten nach der Behandlung stieg auf eine 1,3-fache PAF-Freisetzung 30 Minuten nach UVB-Exposition. Dieser Befund war ein erster wichtiger Hinweis auf eine mögliche regulatorische Rolle von Taurin in UVB-induzierten Membranschädigungen. Der erste Messzeitpunkt des PAF wurde nach 10 Minuten gewählt, da Literaturdaten übereinstimmend zeigen, dass humane Keratinozyten als auch KB Zellen nach Stimulierung um diesen Zeitpunkt ihr Maximum aufwiesen (226;227). Mit dem zweiten Messpunkt 30 Minuten nach UVB-Bestrahlung wurde der weitere kinetische Verlauf der PAF-Freisetzung aus den Keratinozyten der *taut* Mäuse kontrolliert.

Zellen, die PAF freisetzen, verfügen nicht über vorrätiges PAF, sondern synthetisieren PAF, indem in einem ersten enzymatischen Schritt aktivierte Phospholipase- A_2 den Arachidonsäurerest an der *sn*-2-Position des Membranlipids Phosphatidylcholin schneidet, woraufhin in einem zweiten Schritt 1-O-Alkyl-2-Lyso-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin-Acetyltransferase den Acetylrest von Acetyl-CoA an die freie Hydroxyl-Stelle überträgt. Diesen Syntheseweg bezeichnet man als „Remodelling“. Über oxidative Fragmentierung von Phosphatidylcholin am ungesättigten Alkylrest durch beispielsweise ROS können aber auch auf nichtenzymatische Weise sogenannte PAF-ähnliche Phospholipide entstehen (230). Wie PAF selbst können solche PAF-ähnlichen Lipide aufgrund sehr ähnlicher Bindungsstellen, nämlich einer *sn*-1-Etherbindung, einem kurzen *sn*-2-Rest und der Phosphocholin-Kopfgruppe am Glycerol-Gerüst gute Liganden und Agonisten für den PAF-Rezeptor sein und diesen aktivieren (231) (Abb. V.1.). PAF-Rezeptoraktivierung löst verschiedene biochemische Prozesse aus, wie den Phosphoinositid- und Arachidonsäuremetabolismus, intrazelluläre Kalziumänderungen und die Phosphorylierung von Proteinen (232) (Abb. V.2.).

In der Haut prägen hauptsächlich die Keratinozyten einen funktionellen PAF-Rezeptor aus, während der PAF-Rezeptor in dermalen Fibroblasten nicht oder nur in sehr geringem Maße gefunden wurde (233). Interessanterweise wurde in völlig unabhängigen Studien und Versuchsansätzen beschrieben, dass die Aktivierung von „Extracellular signal-regulated kinase (ERK)“ und p38 MAPK Signalwegen in epidermalen Zellen sowohl durch UVB-Bestrahlung (175) als auch über PAF-Rezeptoraktivierung (234) ausgelöst werden kann, was wiederum zur Synthese von immunsuppressiven löslichen Faktoren führt, wie noch mehr PAF durch eine positive Rückkopplungsschleife über aktivierte Phospholipase A_2 , PGE_2 aufgrund von erhöhtem COX-2-Level als auch IL-6, IL-8 und IL-10 (92;226;235).

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Kinetik der PAF-Freisetzung primärer Keratinozyten von *taut -/-* und *taut +/-* Mäusen ließe sich folgendermaßen erklären: Die UVB-Behandlung bewirkt vermutlich über ROS eine oxidative Fragmentierung des Zellmembranlipids Phosphatidylcholin, sodass PAF-ähnliche Lipide freigesetzt werden. Dieser Schritt verläuft unmittelbar nach der UVB-Bestrahlung und repräsentiert größtenteils die gemessene PAF-Freisetzung nach 10 Minuten. Diese aktivierten dann den PAF-Rezeptor, sodass über die beschriebene positive Rückkopplungsschleife auf enzymatischem Weg weiteres PAF freigesetzt wird, das zu dem späteren Zeitpunkt (30 Minuten nach Behandlung) zusätzlich detektiert wurde. Der Nachweis verschiedener PAF-Spezies lag unterhalb des Auflösungsvermögens der in dieser Arbeit eingesetzten Messtechnik (HPTLC). Weiterführende Kinetikstudien könnten der Frage nachgehen, ob die PAF-Induktion in den epidermalen Keratinozyten der *taut -/-* Mäuse durch UVB nach 30 Minuten noch weiter steigt oder abfällt und ihr Maximum bei 30 Minuten erreicht ist.

Diese Befunde deuten auf einen Zusammenhang zwischen den Signalen, die durch UVB verursacht werden, und der PAF-Rezeptoraktivierung hin. Diese Verbindung könnte das Freisetzen von PAF-ähnlichen Molekülen aus der Zellmembran von UVB-bestrahlten Keratinozyten sein, was in Folge die Aktivierung des PAF-Rezeptors und in weiterer Folge die Aktivierung von ERK und p38 und die Aufregulierung der beschriebenen löslichen Faktoren hervorruft. Die Beteiligung von PAF an UVB-induzierten Effekten wird zudem durch eine weitere Studie unterstützt, die zeigt, dass die Ausprägung des PAF-Rezeptors die UVB-induzierte Apoptose in humanen epidermalen Zellen begünstigt, während ein Fehlen des Rezeptors die Anfälligkeit der Zellen gegenüber dem UVB-induzierten Zelltod herabsetzt (225).

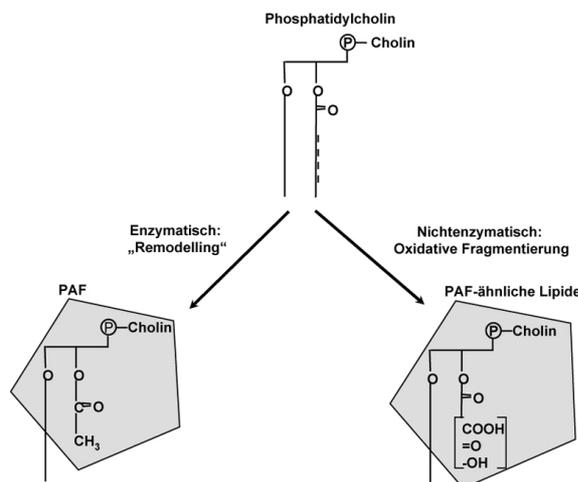


Abbildung V.1. Enzymatische und nichtenzymatische Generierung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) und PAF-ähnlicher Lipide. Die dunklen Schattierungen markieren die Bindungsstellen für den PAF-Rezeptor. Modifiziert nach S. M. Prescott et al., Annual. Review of Biochemistry, 2000, 69: 419 – 445.

V.3.3. Veränderte Genexpression

Da insbesondere das von den Keratinozyten sezernierte IL-10 ein entscheidender löslicher Faktor in der UVB-induzierten Immunsuppression ist (87) und zudem der oben beschriebene Zusammenhang zwischen UVB-induzierter PAF-Rezeptoraktivierung und IL-10-Freisetzung bekannt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die IL-10-Expression bei den epidermalen Keratinozyten der drei *taut* Maus-Genotypen untersucht, um einen eventuellen Zusammenhang zur UVB-induzierten PAF-Freisetzung zu detektieren. Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Expression der IL-10 mRNA mithilfe der Real-Time PCR gemessen, da dies eine sensitive Messmethode ist, mit der auch niedrige Expressionsunterschiede detektiert werden können. Wie aus Literaturdaten zu entnehmen ist, entspricht die Höhe der IL-10 mRNA-Expression bei murinen Keratinozyten der sezernierten IL-10 Proteinmenge (87).

Die Untersuchungen zur UVB-induzierten IL-10 Expression in den primären epidermalen Keratinozyten von *taut* $-/-$ und *taut* $+/+$ Mäusen korrelierten in der Tat eng mit den beobachteten PAF-Freisetzungen, was auf eine mögliche Aktivierung des PAF-Rezeptors in den *taut* $-/-$ Keratinozyten schließen ließ. Die UVB-Bestrahlungen bei den Zellen der *taut* $-/-$ Tiere führten bereits zu frühen IL-10-Induktionen und waren zudem in der Stärke abhängig von der verabreichten UVB-Dosis (Abb. IV.5. A, B). Im Gegensatz dazu induzierte UVB in den Keratinozyten der *taut* $+/+$ Tiere erst zu einem späten Zeitpunkt eine deutliche IL10-Expression, die zudem dosisunabhängig war. Dieses Ergebnis kann bedeuten, dass UVB-Bestrahlung in den Keratinozyten der *taut* $-/-$ Mäuse eine IL-10-Expression über die Freisetzung von PAF oder PAF-ähnlichen Molekülen und folglich eine PAF-Rezeptoraktivierung auslöst, während UVB bei den *taut* $+/+$ Zellen eine deutlich schwächere IL-10-Induktion bewirkt, die zudem unabhängig von einer PAF-Generierung scheint.

Die schnellere und dosisabhängige IL-10-Induktion nach UVB-Bestrahlung bei den *taut* $-/-$ Keratinozyten kann ein Schlüsselmechanismus für die höhere Empfindlichkeit der *taut* $-/-$ Mäuse gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression sein. Der zentrale Wirkmechanismus des IL-10 ist möglicherweise die Beeinflussung der Antigenpräsentationskapazität von LZ, unter anderem indem die IL-12 Freisetzung unterbunden ist. IL-12 ist jedoch das zentrale Zytokin, das für die Aktivierung einer inflammatorischen Immunreaktion von entscheidender Bedeutung ist (106). Enk und Kollegen zeigten, dass mit IL-10 vorbehandelte LZ zwar die Proliferation von naiven Th2-Zellen unterstützten, aber nicht in der Lage waren, eine Proliferation in naiven Th1-Zellen auszulösen, sondern im Gegenteil, in diesen sogar klonale Anergie hervorgerufen wurde (78). Mit Hilfe von aktivem IL-12, das unter normalen Umständen von DZ nach Antigen- bzw. Haptenkontakt produziert wird (106), aber auch von Keratinozyten stammen kann (236), lässt sich die UVB-induzierte Hemmung einer Kontaktsensibilisierung aufheben (237), sowie eine unzureichende Präsentation von Tumorantigenen der LZ verhindern (123), sodass die Gefahr einer Tumorgenese gemindert werden kann. Das bedeutet, dass eine Veränderung des UVB-induzierten IL-10/IL-12-Verhältnisses die UVB-induzierte Suppression von Th1-Antworten beeinflussen kann (238).

Zudem wurde beobachtet, dass mit IL-10 behandelte DZ das Oberflächenmolekül B7.2 (CD86) nach Stimulation nicht aufregulierten und gleichzeitig ihre Fähigkeit verloren, CD4⁺ T-Zellen zu

stimulieren (239). Aufgrund der fehlenden kostimulatorischen Moleküle geht UVB-exponierten LZ die Kapazität zur Antigenpräsentation, Kommunikation mit naiven T-Zellen und die Induktion von Th1-Antworten verloren (240). In einem UVB-unabhängigen System wurde außerdem beobachtet, dass mit IL-10 behandelte DZ klonale Anergie in CD8⁺ tumorspezifischen T-Zellen bewirken, sodass die Tumorabstoßung nicht mehr hinreichend erfolgen kann (241). IL-10 wird inzwischen als der wichtigste Mediator des Th1/Th2-Wechsels betrachtet (78;239).

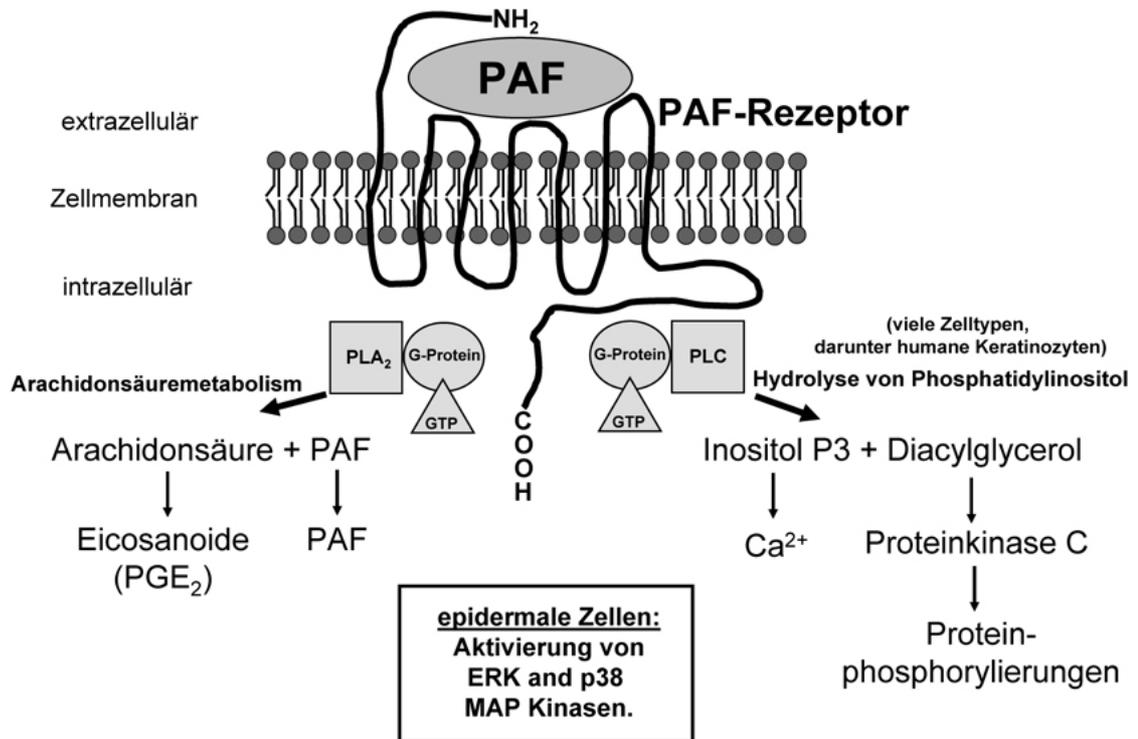


Abbildung V.2. Der zellmembranassoziierte PAF-Rezeptor besitzt sieben Transmembrandomänen und mehrere Serin- und Threoninreste als mögliche Phosphorylierungsstellen im intrazellulären Bereich. PAF-Bindung erfolgt über die extrazellulären Domänen. An der Signalweiterleitung zwischen dem Rezeptor und den Second-Messengern Inositol-1,4,5-Triphosphat (Inositol P3) und Diacylglycerol sind Guaninnukleotide(GTP)-bindende Proteine (G-Proteine) beteiligt. Obwohl bekannt ist, dass der PAF-Rezeptor mit den Effektorproteinen Phospholipase A₂ (PLA₂), welches den Arachidonsäurerest vom Phosphatidylcholin schneidet, und Phospholipase C (PLC), das Phosphatidylinositol spaltet, über G-Proteine verbunden ist, sind die G-Proteine bislang nicht genauer charakterisiert. PAF-Rezeptoraktivierung führt in epidermalen Zellen zur Aktivierung von ERK und p38 MAPK Signalwegen. Das Schema ist modifiziert nach W. Chao und M. S. Olson, Platelet-activating factor: receptors and signal transduction, Biochemical Journal, 1993, 292: 617 – 629.

Im Gegensatz zu antigen-induzierten Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ, die durch CD4⁺ T-Zellen (Th1) vermittelt sind, sind bei Kontaktsensibilisierungen, die durch starke Haptene wie das in dieser Arbeit eingesetzte DNFB hervorgerufen werden, oligoklonale CD8⁺ T-Effektorzellen (Tc1) die Hauptakteure (242). Neben der Aktivierung von CD8⁺T--Effektorzellen werden bei DNFB-vermittelter Kontaktsensibilisierung allerdings auch CD4⁺ T-Zellen induziert. Studien an MHC I und MHC II Knockout-Mäusen und MHC I/MHC II Doppelknockout-Mäusen zeigten unterschiedliche Ausprägungen der Kontaktsensibilisierung durch DNFB. Sowohl MHC I als auch die MHC I/MHC II Doppelknockout-Mäuse, die beide einen drastischen Mangel an CD8⁺ T-Zellen aufweisen, konnten keine Immunantwort ausprägen. Dagegen wiesen MHC II defiziente Tiere, denen CD4⁺ T-Zellen fehlen, eine deutlich stärkere Ausprägung der Kontaktsensibilisierung auf als normale Kontrollmäuse, was auf regulatorische Eigenschaften der CD4⁺ T-Zellen hindeutet (242). Diese Annahme wurde durch Folgeexperimente weiter unterstützt (44;243), so dass man heute davon ausgeht, dass bei haptens-vermittelten Kontaktsensibilisierungen die induzierten CD8⁺ T-Zellen die Rolle der Effektorzellen spielen, während die CD4⁺ T-Zellen kontrollierende, regulatorische Aktivitäten ausüben (244).

Da demnach in der haptens-vermittelten Kontaktsensibilisierung, die in der vorliegenden Arbeit im Ohrschwellungstest gemessen wurde, sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen beteiligt sind, hat das IL-10 eine zentrale Bedeutung in der Ausprägung und Stärke der Immunreaktion. In Folge könnten die LZ, die den Ergebnissen zufolge (Abb. IV.5. A, B) insbesondere bei den *taut* -/- Mäusen möglicherweise unter starkem IL-10-Einfluss stehen, neben einer Anergie bei den CD8⁺ T-Effektorzellen die Induktion von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen begünstigen, wodurch eine Kontaktsensibilisierung zusätzlich unterdrückt werden kann. Demnach wäre eine Untersuchung des Phänotyps und Aktivitätsmusters der LZ der in dieser Arbeit untersuchten *taut*-defizienten Maus im Zusammenhang mit der beobachteten höheren Empfindlichkeit der *taut* -/- Tiere (Abb. IV.2.) ein weiteres interessantes Untersuchungsprojekt. Leider war dies im zeitlichen Rahmen dieser Dissertationsarbeit nicht durchführbar. Es wäre jedoch lohnenswert, dieses Thema im Anschluss eingehender zu studieren und die hier aufgestellten hypothetischen Zusammenhänge zu überprüfen.

Dem PAF bzw. der PAF-Rezeptoraktivierung über MAPK Signalwege nachgeschaltet ist allerdings nicht nur die Induktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10, auch die PGE₂-Produktion wird offenbar angeregt (Abb. V.2.). Ein Zusammenhang zwischen PAF-vermittelten biochemischen Effekten und dem Arachidonsäuremetabolismus wurde mehrfach beschrieben (232). Beim zuvor erwähnten „Remodelling“-Syntheseweg des PAF wird durch die Aktivität der Phospholipase A₂ aus dem Phosphatidylcholin die Arachidonsäure, die an der sn-2 Position des Glycerolgerüst hängt, freigesetzt (234). Im Cyclooxygenase-Pfad können anschließend dann aus der Arachidonsäure Prostaglandine wie PGE₂ generiert werden. An diesem Syntheseschritt ist das COX-2-Enzym entscheidend beteiligt.

In der Tat wurde die Verbindung zwischen PAF, PAF-Rezeptoraktivierung und PGE₂-Biosynthese auch in Keratinozyten beschrieben (226). Pei und Kollegen transduzierten den PAF-Rezeptor in die humane epidermale Zelllinie KB, die normalerweise keinen PAF-Rezeptor ausprägt. Vergleichende Untersuchungen zwischen der PAF-Rezeptor-negativen und der PAF-

Rezeptor-positiven Zelllinie zeigten, dass es nach Stimulierung mit cPAF in der PAF-Rezeptor-positiven Zelllinie zur Biosynthese von PAF, zum Freisetzen von Arachidonsäure, zum Anstieg von COX-2 mRNA und Protein und neben IL-6 und IL-8 auch zur erhöhten PGE₂-Freisetzung kommt, während in den PAF-Rezeptor-negativen Zellen cPAF-Stimulierung ohne messbaren Effekte blieb.

Eine Verbindung zwischen PGE₂ und der UVB-induzierten Immunsuppression wird deutlich, indem man Arbeiten über die immunmodulatorischen Effekte von löslichen Faktoren und PGE₂ kombiniert. So wurde gezeigt, dass UVB-Bestrahlung die Produktion von IL-1 in Keratinozyten anregte (83;84), was die Synthese von PGE₂ in denselben Zellen steigerte (64). Eine direkte Kette zwischen PAF, COX-2, PGE₂ und UVB-induzierter Immunsuppression wurde in den Arbeiten von Shreedar und Kollegen und Walterscheid und Kollegen vorgestellt. Denn Shreedar und Kollegen postulierten zunächst eine UVB-induzierte Zytokinkaskade über PGE₂, IL-4 und IL-10 mit immunsuppressiver Wirkung (235), und Walterscheid und Kollegen ergänzten anschließend den Anfang der Kaskade mit Hinweisen zur UVB-induzierten PAF-Freisetzung und COX-2 Aufregulierung (92).

Demzufolge könnte neben der oben beschriebenen PAF-induzierten Aufregulierung des immunsuppressiven Zytokins IL-10 auch PGE₂ als ein zusätzlicher löslicher Faktor mit immunmodulatorischen Eigenschaften eine Rolle in der erhöhten UVB-Empfindlichkeit der *taut* ^{-/-} Mäuse spielen. Messungen zur COX-2 mRNA nach *in vitro* UVB-Bestrahlungen von primären Keratinozyten aus *taut* ^{-/-} und *taut* ^{+/+} Mäusen ergaben zwar 3 – 4 fache COX-2-Induktionen, die etwa 4 Stunden nach der UVB-Behandlung ihren Höhepunkt erreichten, unterschieden sich jedoch weder in ihrer Zeitkinetik noch in ihrer Stärke noch in ihrer Dosisabhängigkeit bei den beiden Genotypen (Abb. IV. 5. C, D). Da Pei und Kollegen in ihrer Arbeit eine Korrelation von COX-2 mRNA und Protein sowie der anschließenden PGE₂-Biosynthese beschrieben (226), scheint es unwahrscheinlich, dass der COX-2 mRNA-Expression auf gleichem Niveau in den epidermalen Zellen der *taut* ^{-/-} und *taut* ^{+/+} Mäuse trotzdem eine unterschiedliche PGE₂-Synthese folgt. Daher ist eher davon auszugehen, dass die stärkere UVB-Empfindlichkeit auf Ebene der UVB-induzierten Immunsuppression bei den *taut* ^{-/-} Tieren nicht auf einem höheren PGE₂-Level basiert, sondern in erster Linie auf eine stärkere IL-10-Expression zurückzuführen ist.

V.3.4. Die Rolle des PAF-Rezeptors

Weitere *in vivo* Experimente an Mäusen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit, denen vor der UVB-Bestrahlung ein PAF-Rezeptor-Antagonist injiziert wurde, bestätigten die Rolle des PAF-Signalwegs (Abb. IV.6.). Hierbei zeigte sich, dass das Blocken des PAF-Rezeptors eine UVB-induzierte Immunsuppression in den *taut* ^{-/-} Mäusen, nicht aber in den *taut* ^{+/-} und *taut* ^{+/+} Tieren verhinderte (Abb. IV.6. A – C). Mehrfache Injektionen des metabolisch stabilen cPAF unterdrückten jedoch unabhängig von der *taut* Ausprägung signifikant die Kontaktsensibilisierung (Abb. IV.6. A – C). Das zeigt zum Einen, dass alle drei *taut* Maus-Genotypen responsiv auf den Lipidmediator reagieren können. Zum anderen lässt sich im Vergleich mit den Ergebnissen von Walterscheid und Kollegen (92) ableiten, dass PAF eine

allgemeine Rolle in zellvermittelten Immunreaktionen spielt. Denn während in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von PAF auf lokale Immunreaktionen gegen das Hapten DNFB, also Kontaktsensibilisierungen, getestet wurde, überprüften Walterscheid und Kollegen die Rolle von PAF auf systemische Immunreaktionen, das heißt klassische Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen gegen *Candida albicans*-Antigene. Interessanterweise ergab sich eine enge Kongruenz zwischen deren und den vorliegenden Ergebnissen: bei Walterscheid und Kollegen unterdrückten einmalige PAF-Injektionen sowie einmalige Injektionen des PAF-Rezeptor-Antagonisten PCA-4248 eine Stunde vor der UVB-Behandlung die Überempfindlichkeitsreaktionen in Mäusen, während in der vorliegenden Arbeit vier aufeinanderfolgende Injektionen von PAF oder PCA-4248 im Abstand von 24 Stunden ebenfalls jeweils eine Stunde vor den Bestrahlungen mit UVB eine Suppression der Kontaktsensibilisierung hervorriefen.

Dass die UVB-induzierte Immunsuppression ausschließlich in den *taut* $-/-$ Mäusen durch Blocken des PAF-Rezeptors aufgehoben wurde, korreliert gut mit den Befunden zur UVB-induzierten PAF-Generierung und IL-10-Ausprägung in den *taut* Maus-Genotypen und bestätigt eine zentrale Rolle PAF-Rezeptors und seines Liganden PAF in Mäusen mit reduzierter Taurinkonzentration in der Haut. Hieraus kann man schlussfolgern, dass die höhere Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression bei diesen Tieren mit einer starken PAF-Freisetzung nach UVB-Exposition in enger Verbindung steht. Das freigesetzte PAF kann dann zu einer Aktivierung des PAF-Rezeptors führen und über PAF-Rezeptor-gekoppelte Signalwege am Ende die Expression des immunmodulatorischen IL-10 bewirken. Da die UVB-induzierte Immunsuppression bei den *taut* $-/-$ Mäusen durch den PAF-Rezeptor-Antagonisten vollständig aufgehoben wurde, spielt die Freisetzung von PAF durch UVB und die Aktivierung des PAF-Rezeptors bei den Tieren mit reduziertem Taurinlevel offenbar die Hauptrolle, während DNS-Schäden an der Ausprägung der UVB-induzierten Immunsuppression zumindest bei der in diesem Experiment eingesetzten mittleren UVB-Dosis scheinbar nicht beteiligt sind. Möglicherweise sind die *taut* $-/-$ Tiere sogar weniger empfindlich gegenüber UVB-induzierten DNS-Schäden als Tiere mit gutem Taurinstatus. Die CPD-Messungen deuten zumindest an, dass die UVB-induzierten DNS-Schäden durch die niedrige UVB-Dosis bei den *taut* $-/-$ Mäusen mit einer 2-fachen CPD-Induktion leicht geringer sind als bei den *taut* $+/+$ und *taut* $+/-$ Tieren, die CPD-Induktionen von 2 bis 2,5-fach bzw. knapp 3-fach aufwiesen, wenngleich der Unterschied statistisch nicht signifikant ist (Abb. IV.3.). Insgesamt scheinen diese Induktionen an DNS-Schäden, welche durch die niedrige UVB-Dosis hervorgerufen wurden, bei den *taut* Tieren nicht ausreichend zu sein, um zu einer Immunsuppression zu führen, da die niedrige Dosis bei den *taut* $+/-$ und *taut* $+/+$ Mäusen zu keiner signifikanten Unterdrückung der Kontaktsensibilisierung führte (Abb. IV.2. A und B). Da die Induktion an DNS-Schäden bei den *taut* $-/-$ Tieren nach Bestrahlung mit der niedrigen UVB-Dosis sogar noch leicht unterhalb der beiden anderen Genotypen lagen, ist zu vermuten, dass die beobachtete Immunsuppression unter dieser UVB-Dosis bei diesen Tieren auch nicht durch die CPD-Induktion verursacht wurde, sondern vermutlich durch Membranschädigungen wie die PAF-Freisetzung.

Im Gegensatz zu den *taut* $-/-$ Tieren scheint die UVB-induzierte Immunsuppression bei den *taut* $+/-$ und *taut* $+/+$ Mäusen, die nur durch mittlere und hohe UVB-Dosen induzierbar war, unabhängig von der Entstehung von PAF bzw. PAF-ähnlichen Lipiden und der PAF-Rezeptoraktivierung zu sein. Die zugrundeliegenden Mechanismen in diesen Genotypen mit gutem Taurinstatus müssten in weiteren Studien geklärt werden. Möglicherweise beeinflussen hier nicht in erster Linie Membranschädigungen, sondern stärkere DNS-Schäden nach Bestrahlung mit der mittleren UVB-Dosis oder andere primäre UVB-Effekte wie beispielsweise die Isomerisierung der Urokaninsäure oder eine Mischung aus beiden Effekten die Induktion einer UVB-induzierten Immunsuppression in diesen Mäusen. Eventuell basiert die Immunsuppression dieser Tiere auch auf einer PGE₂-Synthese, die aber nicht über PAF, sondern über eine *cis*-UCA-stimulierte Histaminfreisetzung aus Mastzellen aktiviert werden könnte (62). Mit Blick auf das IL-10 als wichtigster löslicher Faktor für die UVB-induzierte Immunsuppression, könnte es sein, dass bei den *taut* $+/+$ Mäusen die erst verzögert in die Haut einwandernden CD11b⁺ Makrophagen die Hauptproduzenten für IL-10 sind und nicht die Keratinozyten, die den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge erst verspätet und nur in geringem Maße auf die UVB-Behandlung mit einer IL-10-Expression reagierten (Abb. IV.5. A, B). CD11b⁺ Makrophagen wurden von Kang und Kollegen als bedeutendste sekretorische Quelle für epidermales IL-10 in humaner Haut vorgeschlagen (91). Hammerberg und Kollegen bestätigten, dass CD11b⁺ Makrophagen auch in Mäusen eine entscheidende Rolle in der Toleranzinduktion durch UVB gegenüber DNFB spielen (245). Anhand einer Folgestudie, in der sie Anti-CD11b-Antikörper einsetzten, beschrieben sie, dass eine Reduktion der CD11b⁺-Zellinfiltration die UVB-induzierten Schädigungen sowohl in den Keratinozyten als auch den APZ minimierte (246). Später zeigten Mittal und Kollegen, dass diese Zellen durch ihre H₂O₂-Produktion den UVB-induzierten oxidativen Stress weiter ankurbeln (247). So sind die CD11b⁺-Makrophagen mit ihrer IL-10- und H₂O₂-Freisetzung als ein weiterer wichtiger Zelltyp in der UVB-induzierte Immunsuppression anzusehen.

Da UVB-Strahlung Hautzellen auf vielfältiger Ebene mit Einfluss auf das Immunsystem schädigt, ist es vorstellbar, dass der Endpunkt wie die Beeinflussung der Antigenpräsentation der LZ und die Induktion regulatorischer T-Zellen bei den drei *taut* Genotypen vergleichbar ist, der Weg dorthin allerdings scheint sich zwischen den *taut* $-/-$ Mäusen, die unter Taurinmangel stehen, und den *taut* $+/-$ und *taut* $+/+$ Tieren, die einen guten Taurinstatus besitzen, zu unterscheiden. Dass die *taut* $-/-$ Mäuse keinen signifikanten Unterschied zu den *taut* $+/+$ Mäusen in den UVB-induzierten DNS-Schäden aufwiesen, aber deren Keratinozyten nach UVB-Bestrahlung mehr PAF freisetzen und IL-10 in größerem Maße sowie schneller und dosishängig ausprägen, unterstützt zum ersten Mal die Idee, dass Mäuse, die einen stark reduzierten Taurinspiegel in der Haut haben, anfällig sind für stärkere Zellmembranschädigungen und eine veränderte Genexpression durch UVB-Strahlung. Derartige Schäden führen zur Freisetzung von PAF-ähnlichen Lipiden und PAF hauptsächlich aus den epidermalen Keratinozyten, woraufhin die Signalwege des PAF-Rezeptors aktiviert werden. In diesem Szenario schützt dann das Taurin die Zellmembran der Hautzellen, wodurch das Freisetzen von PAF-ähnlichen Lipiden und PAF gehemmt wird.

V.4. Mögliche molekulare Schutzmechanismen des Taurins

Welcher exakte molekulare/biochemische Mechanismus hinter den hier erstmals vorgestellten protektiven Eigenschaften des Taurins vor einer UVB-induzierten Immunsuppression steckt, ist allerdings unklar. Im Folgenden werden mögliche Mechanismen des Taurins bzw. die Folgen des Taurinmangels, wie er bei den *taut* –/– Mäusen festgestellt wurde, diskutiert, die eventuell einen Einfluss auf die hier gemachten Beobachtungen der Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression haben könnten.

V.4.1. Regulation des Hydratationszustands als kompatibles organisches Osmolyt

Wie am Anfang der Diskussion beschrieben, führte ein Taurinmangel in der Haut bei den *taut* –/– Mäusen unter normalen Bedingungen zu keinen feststellbaren funktionellen Einschränkungen. Der Taurinmangel wirkte sich dagegen aus, wenn die Tiere Stressoren wie der UVB-Bestrahlung ausgesetzt wurden, und führte zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression. Es ist möglich, dass die peroxidativen Effekte der UVB-Strahlung die Membranpermeabilität verändern, was in Folge aufgrund von Wasser- und Ionenströmen die Osmolarität verändert, woraus Zellschwellung und weitere Schäden resultieren können. So kann Taurin auch als organisches Osmolyt helfen, extreme Osmolaritätsänderungen zu vermeiden, und so die Zelle vor Folgeschäden bewahren. Frühe Studien über Taurin klassifizierten diese Aminosulfonsäure als kompatiblen organischen Osmolyten. So wurde bereits 1982 von Yancey und Kollegen beschrieben, dass Taurin Teil eines Osmolytsystems in vielen verschiedenen Organismen ist (248). Später wurde die osmolytische Eigenschaft des Taurins auch in Zellen höherer Organismen beobachtet. Warskulat und Kollegen identifizierten Taurin als wichtigen Osmolyten in den Kupferzellen der Leber von Ratten (203). Waren diese Zellen hyperosmotischem Medium ausgesetzt, stieg der mRNA Level des Taurintransporters, während hypoosmotisches Medium das Gegenteil bewirkte. Zusätzlich zeigten sie, dass eine Lipopolysaccharid-stimulierte COX-2-Induktion durch hyperosmotisches Medium signifikant erhöht wurde und Taurin diese erhöhte COX-2-Induktion ebenso wie eine PGE₂-Synthese reduzierte. Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass Taurin als organisches Osmolyt nicht nur einfach den Hydratationszustand der Lebermakrophagen reguliert, sondern gleichzeitig die Funktion der Immunzellen wie beispielsweise die Eicosanoidproduktion beeinflussen kann.

Osmotisch abhängige Regulierungen des Taurintransportes wurden in zwei unabhängigen Studien auch für humane Keratinozyten festgestellt. So beobachtete unsere Arbeitsgruppe, dass nach hyperosmotischem Stress und nach UVB-Bestrahlung der Taurintransporter von allen getesteten Osmolyttransportern die höchste Induzierbarkeit in den humanen Keratinozyten aufwies (181). Janeke und Kollegen fanden bei ähnlichen Behandlungen die gleichen Regulierungen und zeigten weiterhin, dass Taurin die Apoptoserate nach hyperosmotischem Stress und UVB-Bestrahlung in den Keratinozyten reduzieren konnte (182).

Auch aus der zuvor beschriebenen ungleichmäßigen Verteilung von Taurin in den verschiedenen Hautschichten (siehe Diskussion V.1. *Die Haut der Taurintransporter-defizienten*

Maus) wird angenommen, dass die starke Akkumulation von Taurin in den differenzierten und langsam keratinisierten Zellen des Stratum spinosum und granulosum entsprechend seiner Funktion als organisches Osmolyt dem Erhalt des Hydratationszustandes dient, da in diesen Schichten bereits Wasserreduktionen nachgewiesen wurden (249). Bei fortschreitender Keratinisierung und Wasserreduktion der Keratinozyten des Stratum granulosum zu den Hornzellen, scheinen diese ihr Taurin auszuschleusen. Extrazelluläres Taurin kann dann von den darunter liegenden Zellen wieder aufgenommen werden, wodurch sowohl ein Taurin- als auch Feuchtigkeitsverlust über die Hornschicht vermieden wird.

Aufgrund der dargelegten Befunde ist nicht auszuschließen, dass die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit auf den osmotischen Eigenschaften des Taurins basieren. Einerseits können osmotische Veränderungen die Funktion und Stabilität der Zellmembran verändern. Beispielsweise dehnt sich die Zellmembran, wenn das Zellvolumen anschwillt, wodurch dehnungssensitive Membrankanäle und das Membranpotential beeinflusst werden. Andererseits beeinflusst der Hydratationszustand auf vielfältige Weise die Zellfunktion. Er moduliert Stoffwechselprozesse, intrazelluläre Signalwege, unter anderem MAP Kinasen, und Genexpressionen (180;212). Auch wurde beschrieben, dass ein osmotisches Zellschrumpfen ebenso wie UVB-Strahlung in einer epithelialen Karzinomzelllinie das „Clustern“ von Zytokinrezeptoren für den epidermalen Wachstumsfaktor, TNF- α und IL-1 bewirkt und ligandenunabhängig die Aktivierung intrazellulärer Signalwege auslöst (153).

Da die Hautzellen der *taut* $-/-$ Mäuse nach UVB Exposition nicht mit einer effektiven Taurinakkumulation reagieren können, wäre es möglich, dass eine UVB-induzierte Veränderung des osmolytischen Gleichgewichts nicht schnell genug und ausreichend reguliert werden kann, sodass Folgeschäden wie eine PAF-Freisetzung und/oder PAF-Rezeptoraktivierung sowie eine Aktivierung intrazellulärer Signalwege und Genexpressionen mit größerem Ausmaß entstehen. Im Vergleich dazu wären dann die Hautzellen der *taut* $+/+$ und *taut* $+/-$ Mäuse nach UVB-Bestrahlung aufgrund ihrer Fähigkeit, einen funktionsfähigen Taurintransporter aufzuregulieren und Taurin intrazellulär anzureichern, vor einer starken Änderung des osmolytischen Gleichgewichts und Hydratationsverlusten besser geschützt, sodass die *taut* $+/+$ und *taut* $+/-$ Tiere weniger empfindlich gegenüber UVB-induzierten Folgeschäden sind als die *taut* $-/-$ Mäuse. Um zu überprüfen, ob die höhere UVB-Empfindlichkeit der *taut* $-/-$ Mäuse auf einer reduzierten Fähigkeit zur Osmoregulation basiert, könnte in weiterführenden Studien analog zu der oben erwähnten Studie untersucht werden, ob UVB-Bestrahlung und osmotischer Stress bei den Hautzellen der *taut* $-/-$ Mäuse zu einem stärkeren „Clustern“ der oben beschriebenen Zytokinrezeptoren und einer erhöhten Aktivierung von intrazellulären Signalwegen führt.

V.4.2. Stabilisierung der Zellmembran

Wie zuvor beschrieben, tragen auch Membranveränderungen zur Ausbildung von UVB-induzierter Immunsuppression bei. Eine Interaktion von Taurin mit Phospholipiden wird seit langem diskutiert. Die stark ionischen Eigenschaften des Taurins sind vermutlich auch Grundlage für die beschriebenen Interaktionen zwischen Taurin und den Kopfgruppen neutraler Membranlipide wie Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin (224). Zudem gibt es

Hinweise darauf, dass Taurin einen Einfluss auf die Membranzusammensetzung nimmt. Denn es wurde beobachtet, dass eine taurinreiche Diät bei Hamstern in der Leber die Konzentration von Triglyceriden erhöhte, den Gehalt an Diglyceriden und Phosphatidylcholin in der Zellmembran senkte, während der Gehalt an Phosphatidylethanolamin nicht beeinflusst wurde (250). Außerdem kann Taurin ein Lipid/Protein-Missverhältnis sowie einen Mangel an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Leber normalisieren (251). Beide Effekte können Einfluss nehmen auf die Funktion und Stabilität der Zellmembran.

Die Einflussnahme des Taurins auf die Membranzusammensetzung kann sich möglicherweise auch auf die Zellmembran von Hautzellen auswirken und eventuell zur hohen UVB-Empfindlichkeit der *taut -/-* Mäuse beitragen. Denn dadurch dass Taurin den Anteil des PAF-Vorläufers Phosphatidylcholin in der Zellmembran senken kann (250), ist es vorstellbar, dass unter Taurinmangel die Zellmembran der Keratinozyten bei den *taut -/-* Mäusen einen im Vergleich zu den *taut +/+* Mäusen hohen Phosphatidylcholin-Level besitzen. Ein vermehrtes Vorhandensein dieses Membranlipids kann dann die Anfälligkeit für eine gesteigerte Freisetzung von PAF-ähnlichen Lipiden unter oxidativem Stress bei den *taut -/-* Tieren zur Folge haben, woraufhin eine übermäßige Aktivierung des PAF-Rezeptors resultieren könnte mit anschließender hoher PAF-Freisetzung und Produktion immunmodulatorischer löslicher Faktoren aufgrund von aktivierten ERK und p38 MAPK Signalwegen (234). Die Keratinozyten von Tieren mit gutem Taurinstatus wie die *taut +/+* Mäuse und eventuell auch die *taut +/-* Mäuse sind dann in diesem Szenario aufgrund ihres geringeren Phosphatidylgehaltes in der Membran weniger anfällig für die Attacken der UVB-induzierten ROS und setzen deutlich weniger PAF-ähnliche Lipide nach UVB-Bestrahlung frei. Unter Umständen bleibt damit eine Aktivierung des PAF-Rezeptors unterhalb eines messbaren Bereiches oder ganz aus, da die PAF-ähnlichen Lipide ebenso wie PAF selbst rasch von der PAF-Acetylhydrolase, die bei oxidativem Stress zur Zellmembran transloziert, abgebaut werden (162;163), bevor es zur Bindung der Liganden an den Rezeptor kommt. Da außerdem gezeigt wurde, dass PAF die Expression des PAF-Rezeptors beeinflussen kann, ist es zudem möglich, dass die Zellen der *taut +/+* und *taut +/-* Mäuse nach UVB-Behandlung aufgrund des geringeren PAF-Levels auch eine geringere Induktion des PAF-Rezeptors aufweisen, was eine reduzierte Responsivität zur Folge haben könnte. Die vergleichbare Suppression der Kontaktsensibilisierung durch die PAF-Injektionen ohne UVB-Bestrahlung (Abb. IV.6.) deutet aber darauf hin, dass alle drei *taut* Maus-Genotypen die gleiche konstitutive und durch PAF induzierbare Responsivität besitzen, und ein grundsätzlicher Unterschied in der Aktivierbarkeit des PAF-Rezeptors auszuschließen ist.

Interessante Ansatzpunkte für Folgeuntersuchungen zum protektiven Mechanismus von Taurin gegen UVB-Schädigungen wären demzufolge 1. detaillierte Analysen zur Lipidzusammensetzung der Keratinozytenzellmembran der *taut -/-* und *taut +/+* Mäuse und 2. Messungen zur Induzierbarkeit des PAF-Rezeptors in den Keratinozyten dieser Tiere durch UVB-Bestrahlungen.

V.4.3. Antioxidative Eigenschaften

Dass Taurin in hohen Konzentrationen in Zellen und Geweben vorkommt, die oxidativem Stress ausgesetzt sind wie der Retina (252) und Neutrophilen (207), deutet darauf hin, dass Taurin auch über antioxidative Schutzfunktionen verfügt. So wurde beschrieben, dass Taurin Zellen vor Oxidantien schützt, welche unter anderem die Zellmembran attackieren und zur Lipidperoxidation führen können (198;253). Es wurde gezeigt, dass der hohe Tauringehalt in den äußeren Stäbchenzellen der Retina von etwa 25 mM die Bildung sekundärer Lipidperoxidationsprodukte wie Malondialdehyd reduzieren kann (254). Auf ähnliche Weise scheint Taurin auch in der Leber vor der Bildung von Malondialdehyd durch Tetrachlormethan zu schützen (255). Und auch Spermatozoen sind durch ihren relativ hohen Taurinspiegel gegen Schädigungen durch Superoxidradikale gewappnet (256).

Da auch ROS-induzierte Lipidperoxidationen bei der Bildung und Freisetzung von PAF-ähnlichen Lipiden aus der Zellmembran zugrunde liegen, wäre es durchaus möglich, dass der hohe Taurinspiegel die *taut* *+/+* Mäuse vor diesen Attacken durch seine antioxidativen Phänomene schützt, während die *taut* *-/-* Mäuse durch ihren starken Taurindefizit diesen Angriffen weitestgehend ungeschützt ausgeliefert sind. Die Folgen wären dann eine niedrige PAF-Bildung in den UVB-exponierten Hautzellen der *taut* *+/+* Mäusen und eine hohe PAF-Bildung in UVB-exponierten Hautzellen der *taut* *-/-* Tieren, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurden.

Ein direkter Zusammenhang zwischen antioxidativen Substanzen und einer Aufhebung der UVB-induzierten Immunsuppression ist auf vielerlei Ebenen aus Literaturdaten bekannt (148-150;257). Allerdings bleibt offen, ob Taurin tatsächlich direkt als Antioxidant fungiert oder ob der Zellschutz indirekter Natur ist und Taurin in seiner Eigenschaft als organisches Osmolyt, wie oben beschrieben (Diskussion V.4.1. *Regulation des Hydratationszustands als kompatibles organisches Osmolyt*), den peroxidativen Wirkungen, welche eine Beeinflussung der Membranpermeabilität und nachfolgend eine Osmolaritätsänderung bewirken, entgegensteuert. Außerdem ist es denkbar, dass Taurin durch eine direkte Bindung an den PAF-Vorläufer Phosphatidylcholin, wie unter V.4.2. *Stabilisierung der Zellmembran* dargelegt, die Angriffsfläche am Membranlipid für ROS verändern oder behindern kann.

V.4.4. Modulation der Ca²⁺-Verfügbarkeit

Eine weitere Möglichkeit des Taurineinflusses ist die Modulation des freien zytosolischen Kalziums, was man allerdings auch als Membraneffekt betrachten kann. Insgesamt scheinen eine Reihe von den beschriebenen Taurineffekten auf Interaktionen mit Phospholipiden zu basieren. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass Taurin die Ca²⁺-Bindungseigenschaften von sauren Phospholipiden beeinflusst, die Ca²⁺-Kanalaktivität moduliert und die Speicherkapazität für Ca²⁺ von intrazellulären Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum steigert (224), was alles mit der Regulation der Ca²⁺-Verfügbarkeit in der Zelle zusammenhängen kann. Pasantes-Morales und Kollegen beobachteten, dass Taurin eine Lymphozytenzelllinie vor Eisenascorbat-induzierter Apoptose schützte (198). Bei Untersuchungen zum Mechanismus stellte sich heraus, dass Taurin nicht die Lipidperoxidation

durch Eisenascorbat verhindert. Sie erklärten den positiven Taurineffekt auf die Zellviabilität dadurch, dass Taurin offenbar den starken Ca^{2+} -Einstrom nach der Eisenascorbatbehandlung unterdrückte.

Insbesondere die schützenden Effekte von Taurin auf die Herzfunktion machen den Einfluss auf die Ca^{2+} -Modulation deutlich. Denn man fand heraus, dass Taurin im Herzen eine doppelte Rolle spielt: Bei Ca^{2+} -Konzentrationen unterhalb des physiologischen Levels wirkt Taurin aktivierend auf die Herzmuskelkontraktion, während bei Ca^{2+} -Konzentrationen oberhalb des physiologischen Levels die Herzmuskelkontraktion reduziert wird, sodass die Herzfunktion auf einem konstanten Level gehalten wird (258;259). Außerdem wurde gezeigt, dass Taurin vor dem Ca^{2+} -Paradox schützt (260). Dieses Phänomen tritt auf, wenn sich das Herz einige Minuten in einem Ca^{2+} -freien Milieu befindet. Erhöht sich dann der Ca^{2+} -Level auf physiologische Konzentrationen, entstehen Zellschäden aufgrund eines hohen Ca^{2+} -Einstroms. Der Schutz durch Taurin besteht scheinbar jedoch nicht darin, den Ca^{2+} -Überfluss zu minimieren, aber es reduziert wohl die daraus entstehenden Konsequenzen (183).

Unter Berücksichtigung dieser Wirkungsmechanismen des Taurins, erscheint es verständlich, dass Stimuli, welche die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration verändern, bei Organismen mit Taurinmangel stärkere Konsequenzen nach sich ziehen können. Dies könnte auch der Fall sein bei den mit UVB behandelten *taut* –/– Mäusen. So wurde gezeigt, dass UVB-Strahlung Kalziumsignale wie etwa Tyrosinphosphorylierungen in Lymphozyten auslösen kann, sodass Signalwege unter Umgehung der Rezeptorkontrolle aktiviert werden können (261). In der Membran von humanen Keratinozyten führte UVB neben einer Abnahme der Membranfluidität zur Aktivitätszunahme von Ca^{2+} -abhängigen Enzymen wie der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen NO-Synthase (262). Beides liefert Hinweise für einen Anstieg der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration durch UVB-Behandlung.

Diese Möglichkeit wird außerdem dadurch weiter unterstützt, dass Ligandenbindung an den PAF-Rezeptor einen Anstieg an freiem Ca^{2+} im Zytosol verursacht, was zum Einen auf vermehrten Ca^{2+} -Einstrom über zellmembranassoziierte Kalziumkanäle, die über den PAF-Rezeptor reguliert werden, zurückzuführen ist, zum Anderen auf der Mobilisierung von freiem Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern über „Second messengers“ wie beispielsweise Inositol-1,4,5-Triphosphat, die bei der PAF-Rezeptoraktivierung entstehen, basieren kann (232).

Für eine Reihe von Zelltypen, unter anderem auch für humane Keratinozyten (263) wurde gezeigt, dass es bei der PAF-Rezeptoraktivierung zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol kommt, wobei nicht nur Inositol-1,4,5-Triphosphat und freies Ca^{2+} entstehen, sondern auch Diacylglycerol, welches die Ca^{2+} -abhängige Proteinkinase C aktiviert, sodass Phosphorylierungen verschiedener Substrate folgen können (264) (Abb. V.2.), unter anderem die schon mehrfach erwähnten MAP Kinasen, die in den Zellkern wandern und dort verschiedene UVB-typische Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NF κ B oder p53 aktivieren (175). Somit könnte die starke IL-10-Expression in den Keratinozyten der *taut* –/– Mäuse und die damit einhergehende hohe Empfindlichkeit für eine UVB-induzierte Immunsuppression auch auf einer stärkeren Freisetzung von Ca^{2+} basieren, welche abhängig von der PAF-Rezeptoraktivierung ist. Diese Vermutung müssten Folgestudien klären.

V.5. Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden,

1. dass die Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression *in vivo* in Mäusen abhängig ist von der Taurinkonzentration in der Haut und Taurin damit eine wichtige regulatorische Rolle in der UVB-induzierten Immunsuppression einnimmt. Die phänotypischen Merkmale der homozygoten Taurintransporter-defizienten Maus (schematisch zusammengefasst in der Einleitung 1.2.2. *Die Taurintransporter-defiziente Maus* Abb. I.8.) müssen aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertation mit der Eigenschaft der erhöhten Sensibilität gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression erweitert werden (Abb. V.3.).
2. dass der wichtigste molekulare Schutzmechanismus des Taurins vor der UVB-induzierten Immunsuppression eine Reduktion von Zellmembranschäden durch UVB-Strahlung ist. Taurin reguliert die UVB-induzierte Freisetzung des Lipidmediators PAF aus der Zellmembran epidermaler Keratinozyten und moduliert damit eine Unterdrückung von zellvermittelten Immunantworten.

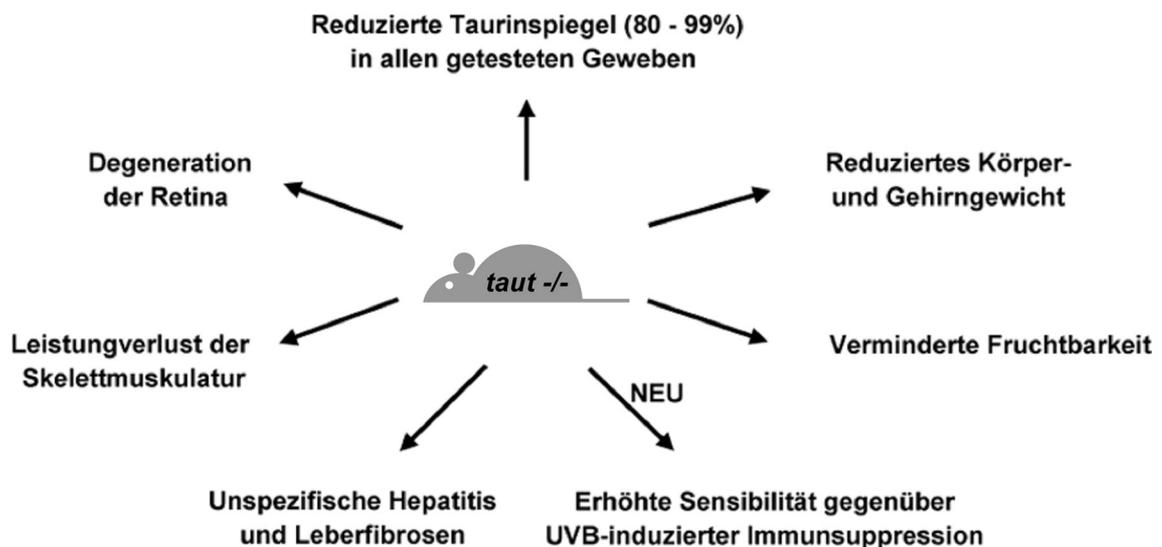


Abbildung V.3. Die erhöhte Sensibilität gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression kann als weiteres phänotypisches Merkmal bei der homozygoten Taurintransporter-defizienten (*taut -/-*) Maus ergänzt werden. Eine mögliche Ursache sind die stärkeren Zellmembranschädigungen durch UVB bei Taurinmangel, insbesondere die vermehrte Freisetzung des Lipidmediators PAF bzw. PAF-ähnlicher Lipide, die wie PAF selbst den PAF-Rezeptor aktivieren können. Hieraus folgt dann die Induktion des immunmodulatorischen löslichen Faktors IL-10, wodurch zellvermittelte Immunreaktionen wie Kontaktsensibilisierungen oder Tumorabstoßung unterdrückt werden. Auf diese Weise beeinflusst der Taurinstatus der Haut eines Organismus die Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression.

Die vorliegenden Daten lassen den Schluss zu, dass die Taurinaufnahme, neben der DNS-Reparatur, Antioxidation und Hautpigmentierung, ein weiterer endogener Schutzmechanismus gegen UVB-induzierte Zellschäden ist.

V.6. Medizinische Relevanz der Ergebnisse

Welche Bedeutung hat das Gesamtergebnis und die Schlussfolgerung dieser Dissertationsarbeit aus medizinischer Sicht? Im Folgenden werden medizinische und therapeutische Einsatzmöglichkeiten diskutiert, die sich aus den hier vorgelegten Daten ableiten lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben deutlich gemacht, dass die Höhe des Taurinspiegels in der Haut konzentrationsabhängig die UVB-Empfindlichkeit beeinflusst und folglich ein Schutz vor UVB-bedingten Hautschäden umso besser und effektiver ist, je näher am physiologischen Normbereich der Taurinspiegel in der Haut ist. Allerdings wurden in den Studien der vorliegenden Dissertation ausschließlich Mäuse und Hautzellen von Mäusen mit einem natürlichen physiologischen (*taut* *+/+* Mäuse) und einem reduzierten (*taut* *+/-* und *taut* *-/-* Mäuse) Taurinspiegel untersucht. Weitere Studien könnten die Frage klären, ob eine Steigerung des Taurinspiegels über den Normbereich einen besseren UVB-Schutz liefern kann. Hierzu könnten Untersuchungen zur UVB-induzierten Immunsuppression und anderen UVB-verursachten Schäden an normalen Mäusen, die beispielsweise mit einer taurinangereicherten Nahrung oder topischen Applikationen einer Taurinemulsion behandelt werden, überprüft werden. Derartige Untersuchungen wären insbesondere wertvoll, um protektive Effekte des Taurins vor UVB-Schäden in der Haut zu bestätigen. Positive Ergebnisse aus Tierversuchen müssten dann in Testreihen mit humanen Hautzellen überprüft werden. Ein Ziel wäre zum Beispiel die Entwicklung von Sonnenschutzprodukten mit Taurinzusatz, die UVB-Schäden wie die Immunsuppression reduzieren. Der Einsatz von Taurin in Sonnenschutzprodukten wäre damit eine völlig neue Präventionsmaßnahme vor UV-Schäden. Dass die Haut in der Lage ist, Taurin über epikutane Applikationen aufzunehmen, zeigt sich darin, dass der Pharmakonzern Beiersdorf Feuchtigkeitslotionen mit Taurinzusatz zur Verbesserung des Feuchtigkeitshaushalt der Haut bereits im Handel vertreibt.

Da der natürliche Weg der Taurinaufnahme über die Nahrung erfolgt, ließe sich unter Umständen ein verbesserter UVB-Schutz auch durch orale Applikationen erreichen. In klinischen und experimentellen Studien, in denen Taurin oral verabreicht wurde, zeigte sich, dass die orale Tauringabe von 6 g/Tag Salz-induzierten Bluthochdruck beim Menschen signifikant reduzieren konnte (265). Im Tierversuch konnten orale Tauringaben über die Nahrung (circa 2 – 2,7 g/Tag) die funktionale Beeinträchtigung der Retina und oxidativen Stress bei diabetischen Ratten deutlich reduzieren (266). Zukünftige Studien müssten jedoch zunächst zeigen, dass sich über die orale Aufnahme der natürliche physiologische Taurinspiegel in der Haut effektiv steigern lässt.

Bei allen Taurinapplikationen muss allerdings ein potenziell gesundheitsschädlicher Effekt durch Taurinüberdosierungen beachtet werden. Das „National Institute for Occupational Safety

and Health (NIOSH)“ in Washington, DC, USA gibt den LD₅₀-Wert (Letaldosis, die bei 50% der Individuen zum Tode führt) für Taurin bei verschiedenen Säugetieren wie Ratte, Maus, Hund und Kaninchen zwischen 1000 – 7000 mg/kg Körpergewicht je nach Applikationsweise (oral, intravenös, intraperitoneal oder subkutan) an. Damit scheint Taurin eine nur geringe akute Toxizität zu besitzen. Im Vergleich dazu liegt die LD₅₀-Dosis der Aminosäure Cystein, dem Taurinvorläufer, bei Ratte und Maus zwischen 600 – 2000 mg/kg Körpergewicht je nach Applikationsweise. Die akute Toxizität für Natriumchlorid liegt je nach Applikationsweise bei Ratte, Maus und Mensch zwischen 650 – 3000 mg/kg Körpergewicht. Die Toxizität von Taurin liegt demnach in teilweise sogar unterhalb den Bereichen von Natriumchlorid und körpereigenen Aminosäuren. Übermäßige Taurinaufnahmen sollten vermieden werden, da die toxikologischen Effekte einer Überexposition nicht umfassend untersucht und zum Teil widersprüchlich sind. Demzufolge sollte bei weiteren Studien zum protektiven Einfluss von Taurin auf UVB-induzierte Schäden mit Taurinapplikationen auf eine mögliche Beeinträchtigung der Gesundheit unbedingt geachtet werden.

Eine Prävention der UVB-induzierten Immunsuppression hat vor allem aus epidemiologischer Sicht wachsende Bedeutung gewonnen. An dieser Stelle sei nochmals darauf hingewiesen, dass die UVB-induzierte Immunsuppression im Zusammenhang mit der schädigenden Wirkung des UVBs auf die DNS ursächlich für die Entstehung von Hautkrebs verantwortlich ist. Die Unterdrückung des Immunsystems, insbesondere der zellvermittelten Immunantworten, zu denen die Beseitigung von Tumorantigenen zählt, führt dazu, dass UVB-geschädigte Zellen, aus denen sich Hautkrebs entwickeln kann, weniger effektiv eliminiert werden. Die UVB-induzierte Karzinogenese von Basalzell- und Stachelzellkarzinomen sowie maligner Melanome ist zudem von großer allgemeiner und klinischer Bedeutung. Die Abnahme der Ozonschicht in der Stratosphäre, die in einer Erhöhung an UVB-Strahlung auf der Erdoberfläche resultiert (267), sowie das veränderte Freizeit- und Sozialverhalten der Bevölkerung, das zu einer erhöhten individuellen Sonnenstrahlenexposition führt, sind Ursache für eine deutlich steigende Hautkrebsinzidenz (Umweltbundesamt: www.env-it.de/umweltdaten/public/theme.do). Hautkrebs zählt zu den weltweit am häufigsten auftretenden Krebsarten. Daher ist es äußerst wichtig, geeignete Maßnahmen gegen die schädigenden Einflüsse der UV-Strahlung wie der UVB-induzierten Immunsuppression zu entwickeln. Die in dieser Arbeit eingesetzten UVB-Dosen zur Bestrahlung der Mäuse haben durchaus auch eine Relevanz für den Menschen. Die UVB-Dosen von 100, 200 und 400 mJ/cm² entsprechen etwa dem 4- bis 16-fachen einer minimalen Erythemdosis (MED) beim Menschen und haben daher medizinische Bedeutung. Eine MED eines hellhäutigen Menschen (Hauttyp II) beträgt im Durchschnitt 25 mJ/cm² (Bundesamt für Strahlenschutz: www.bfs.de/uv/uv2/sonnenbrand.html) und ist die Energiedosis, bei der sich erste Hautrötungen zeigen. Allerdings ist anzumerken, dass sich die UVB-Effekte zwischen verschiedenen Spezies nicht direkt übertragen lassen.

Die hier vorgelegten Erkenntnisse besitzen auch Bedeutung für therapeutisch eingesetzte UV-Therapien. In medizinischen UV-Therapien wird die UVB-induzierte Immunsuppression gezielt

genutzt, um Entzündungsreaktionen bei Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis oder chronische allergische Hautreaktionen wie Neurodermitis zu reduzieren. Da entsprechend der Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit eine Taurinreduktion in der Haut zu einer höheren Empfindlichkeit gegenüber den immunsupprimierenden Effekten der UVB-Strahlung führt, könnte eine taurinarme Ernährung helfen, die Wirkung der UV-Therapie zu vergrößern und die Länge und Dauer einer Behandlung zu verkürzen.

Selbstverständlich ist zu berücksichtigen, dass die aufgeführten Vorschläge theoretische Ableitungen der hier vorgestellten Daten sind. Es bedarf noch vieler Untersuchungen zu den Wirkmechanismen von Taurin im Hinblick auf protektive Eigenschaften gegenüber UVB-bedingten Effekten im Tiermodell und insbesondere auch in der Humanmedizin, bevor sich eine fundierte Therapieempfehlung formulieren lässt. Dennoch machen sie die Bedeutung dieser ersten tierexperimentellen Studie über die protektiven Effekte von Taurin in Verbindung mit UVB auch für die Humanmedizin deutlich. Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertationsarbeit könnten einen ersten Schritt hin zu neuen medizinisch protektiven Maßnahmen gegen UVB-induzierte Schädigungen durch den Einsatz von Taurin einleiten.

VI. Zusammenfassung

Aus vorangegangenen Studien wurde vorgeschlagen, dass die Aufnahme von Osmolyten, wie beispielsweise Taurin, Teil der UVB-induzierten Stressantwort von humanen epidermalen Hautzellen, den Keratinozyten (HNK), ist. Diese Hypothese basierte auf den Beobachtungen, dass a) UVB Strahlung die Aufregulierung des spezifischen Taurintransporters (TAUT) in den bestrahlten Keratinozyten induzierte und b) diese Aufregulierung von einer vermehrten Taurinaufnahme in diesen Zellen begleitet wurde. Unterstützend zu dieser Hypothese dokumentiert die vorliegende Dissertation, dass die Taurinaufnahme Hautzellen vor UVB-induzierten immunsuppressiven Effekten schützt. Es wird gezeigt, dass homozygote Taurintransporter-defiziente (*taut -/-*) Mäuse signifikant empfindlicher gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression sind als heterozygote Taurintransporter-defiziente (*taut +/-*) und Wildtyp (*taut +/+*) Mäuse. *Taut -/-* Mäuse besitzen aufgrund einer Disruption des Exon-1 des murinen *taut* Gens keinen funktionellen Taurintransporter. ¹H NMR-Spektroskopieanalysen zeigten, dass der Taurinlevel in der Haut dieser Tiere um über 90% reduziert ist verglichen mit den *taut +/+* Mäusen. *Taut +/-* Mäuse haben eine moderatere Taurinreduktion von etwa 35%. Die UVB-Empfindlichkeit der drei Maus-Genotypen wurde im Mausohrschwellungstest am Modell der Kontaktsensibilisierung untersucht. Vergleichende Studien demonstrierten, dass *taut -/-*, aber nicht die *taut +/-* Mäuse empfindlicher gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression sind als *taut +/+* Tiere. Bei Studien zum zugrundeliegenden Mechanismus wurde herausgefunden, dass die höhere UVB-Empfindlichkeit der *taut -/-* Tiere nicht auf vermehrter DNS-Schädigung basiert, sondern durch stärkere UVB-induzierte Membranschädigungen, insbesondere durch eine erhöhte Freisetzung des Lipidmediators Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) bzw. PAF-ähnlicher Lipide aus der Zellmembran ausgelöst wird. Vermutlich über eine Aktivierung des PAF-Rezeptors folgt die Aufregulierung immunsuppressiver löslicher Faktoren wie Interleukin-10, dessen Level in UVB-behandelten Keratinozyten aus *taut -/-* Mäusen im Vergleich zu denen der *taut +/+* Tiere zum Einen erhöht, zum Anderen dosisabhängig reguliert war. Behandlungen mit einem spezifischen PAF-Rezeptor-Antagonisten hoben die UVB-induzierte Immunsuppression in *taut -/-* Mäusen auf, jedoch nicht in den beiden anderen Genotypen. PAF selbst löste dagegen Immunsuppression aus unabhängig von der Ausprägung des *taut*. Die hier vorgestellten Befunde weisen darauf hin, dass UVB-Bestrahlung bei Taurinmangel zu einer gesteigerten Freisetzung von PAF aus der Keratinozytenzellmembran, zur PAF-Rezeptoraktivierung und in Folge zur Immunsuppression führt.

Es konnte erstmalig gezeigt werden, 1. dass die Empfindlichkeit gegenüber UVB-induzierter Immunsuppression *in vivo* in Mäusen abhängig ist von der Taurinkonzentration in der Haut und Taurin damit eine wichtige regulatorische Rolle in der UVB-induzierten Immunsuppression einnimmt. Und 2., dass der wichtigste molekulare Schutzmechanismus des Taurins vor der UVB-induzierten Immunsuppression eine Reduktion von Zellmembranschäden durch UVB-Strahlung ist.

Zusammengenommen lässt sich schlussfolgern, dass ein physiologischer Taurinspiegel in der Haut neben der DNS-Reparatur, Antioxidantien und Pigmentierung ein zusätzlicher endogener Schutzmechanismus von Hautzellen gegenüber UVB-induzierten Schädigungen ist.

VII. Abkürzungen

Abb	Abbildung
AP1	Aktivatorprotein 1
APZ	Antigenpräsentierende Zelle(n)
bp	Basenpaar(e)
Ca ²⁺	zweifach geladenes Kalzium-Kation
CD	„Cluster of Differentiation“; Oberflächenmarkerantigen
CLA	„Cuteaneous lymphocyte-associated antigen“
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer(e)
DNFB	Dinitrofluorbenzol
DNS	Deoxyribonukleinsäure
DZ	Dendritische Zelle(n)
FAS	„FS7-associated cell surface antigen“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
h	Stunde(n)
¹ H-NMR-Spektroskopie	Protonenkernmagnetresonanzspektroskopie
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
i.p.	intraperitoneal
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
JNK	„c-Jun-NH2-terminal kinase“
LFA-1	„Lymphocyte function-associated antigen-1“
LZ	Langerhans Zelle(n)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
NF κ B	Nukleärer Faktor kappa B
ns	statistisch nicht signifikant unterschiedlich
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAF-AH	Plättchen-aktivierender Faktor-Acetylhydrolase
PBS	„Phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TAUT	Taurintransporter (Protein)

Abkürzungen

<i>taut</i>	Taurintransportergen
Tc1	CD8 ⁺ zytotoxische T-Zelle
TGF- β	transformierender Wachstumsfaktor-beta
Th1	CD4 ⁺ T-Helfer 1 Zelle, inflammatorische T-Zelle
Th2	CD4 ⁺ T-Helfer 2 Zelle, B-Zellaktivator
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
Treg	regulatorische T Zelle
UV	Ultraviolett
UVB	Ultraviolett B
VLA-4	„Very late antigen-4“
-/-	homozygot
+/-	heterozygot
+/+	Wildtyp

VIII. Literaturverzeichnis

- (1) McGregor JM, Hawk JLM. Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austin KF, Goldsmith LA, Katz I, et al., eds. Fitzpatrick's Dermatology in general medicine. 5th edition ed. New York: MacGrawHill, **1999**. p. 1555-61.
- (2) Hruza LL, Pentland AP. Mechanisms of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol* **1993 Feb**;100(1):35S-41S.
- (3) Murphy G, Young AR, Wulf HC, Kulms D, Schwarz T. The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp Dermatol* **2001 Jul**;10(3):155-60.
- (4) Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S, Voorhees JJ. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* **1997 Dec** **13**;337(20):1419-28.
- (5) Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J. Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **2000**;16(6):239-44.
- (6) Kripke ML. Antigenicity of murine skin tumors induced by ultraviolet light. *J Natl Cancer Inst* **1974 Dec**;53(5):1333-6.
- (7) Kripke ML, Lofgreen JS, Beard J, Jessup JM, Fisher MS. In vivo immune responses of mice during carcinogenesis by ultraviolet irradiation. *J Natl Cancer Inst* **1977 Nov**;59(4):1227-30.
- (8) DeFabo EC, Kripke ML. Dose-response characteristics of immunologic unresponsiveness to UV-induced tumors produced by UV irradiation of mice. *Photochem Photobiol* **1979 Oct**;30(3):385-90.
- (9) Kripke ML. Effects of UV radiation on tumor immunity. *J Natl Cancer Inst* **1990 Oct** **5**;82(17):1392-6.
- (10) Armstrong BK, Kricger A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* **2001 Nov**;63(1-3):8-18.
- (11) De Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* **2001 Nov**;63(1-3):19-27.
- (12) de Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs. UVB radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **2002 Sep**;15(5):316-20.
- (13) Mullenders LH, Berneburg M. Photoimmunology and nucleotide excision repair: impact of transcription coupled and global genome excision repair. *J Photochem Photobiol B* **2001 Dec** **31**;65(2-3):97-100.
- (14) Kim TY, Kripke ML, Ullrich SE. Immunosuppression by factors released from UV-irradiated epidermal cells: selective effects on the generation of contact and delayed hypersensitivity after exposure to UVA or UVB radiation. *J Invest Dermatol* **1990 Feb**;94(1):26-32.
- (15) Grabbe S, Granstein RD. Photoimmunology of UV-induced skin cancer. In: J.Krutmann, C.A.Elmetts, eds. Photoimmunology. first ed. Blackwell Science, **1995**. p. 99-118.

- (16) Fisher MS, Kripke ML. Systemic alteration induced in mice by ultraviolet light irradiation and its relationship to ultraviolet carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1977 May**;74(4):1688-92.
- (17) Mommaas AM, Mulder AA, Out CJ, et al. Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cells in situ. *Eur J Immunol* **1995 Feb**;25(2):520-5.
- (18) Kalish RS, Askenase PW. Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: implications for allergies, asthma, and autoimmunity. *J Allergy Clin Immunol* **1999 Feb**;103(2 Pt 1):192-9.
- (19) Budinger L, Hertl M. Immunologic mechanisms in hypersensitivity reactions to metal ions: an overview. *Allergy* **2000 Feb**;55(2):108-15.
- (20) Kimber I, Dearman RJ. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis* **2002 Jan**;46(1):1-5.
- (21) Saint-Mezard P, Krasteva M, Chavagnac C, et al. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J Invest Dermatol* **2003 Apr**;120(4):641-7.
- (22) Enk AH, Katz SI. Early molecular events in the induction phase of contact sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992 Feb 15**;89(4):1398-402.
- (23) Schuler G, Steinman RM. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* **1985 Apr 1**;161(3):526-46.
- (24) Cumberbatch M, Kimber I. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology* **1992 Feb**;75(2):257-63.
- (25) Schwarzenberger K, Udey MC. Contact allergens and epidermal proinflammatory cytokines modulate Langerhans cell E-cadherin expression in situ. *J Invest Dermatol* **1996 Mar**;106(3):553-8.
- (26) Fleming MD, Pinkus JL, Fournier MV, et al. Coincident expression of the chemokine receptors CCR6 and CCR7 by pathologic Langerhans cells in Langerhans cell histiocytosis. *Blood* **2003 Apr 1**;101(7):2473-5.
- (27) Griem P, Wulferink M, Sachs B, Gonzalez JB, Gleichmann E. Allergic and autoimmune reactions to xenobiotics: how do they arise? *Immunol Today* **1998 Mar**;19(3):133-41.
- (28) Ferrer JM, Plaza A, Kreisler M, Diaz-Espada F. Differential interleukin secretion by in vitro activated human CD45RA and CD45RO CD4+ T cell subsets. *Cell Immunol* **1992 Apr 15**;141(1):10-20.
- (29) Picker LJ, Treer JR, Ferguson-Darnell B, Collins PA, Bergstresser PR, Terstappen LW. Control of lymphocyte recirculation in man. II. Differential regulation of the cutaneous lymphocyte-associated antigen, a tissue-selective homing receptor for skin-homing T cells. *J Immunol* **1993 Feb 1**;150(3):1122-36.
- (30) Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12

- and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* **1996 Aug 1**;184(2):747-52.
- (31) Traidl C, Sebastiani S, Albanesi C, et al. Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes. *J Immunol* **2000 Sep 15**;165(6):3058-64.
- (32) Groux H, O'Garra A, Bigler M, et al. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **1997 Nov 16**;389(6652):737-42.
- (33) Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal MR, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol* **2001 May 1**;166(9):5530-9.
- (34) Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* **1997**;15:297-322.
- (35) Grabbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* **1998 Jan**;19(1):37-44.
- (36) Grabbe S, Steinert M, Mahnke K, Schwartz A, Luger TA, Schwarz T. Dissection of antigenic and irritative effects of epicutaneously applied haptens in mice. Evidence that not the antigenic component but nonspecific proinflammatory effects of haptens determine the concentration-dependent elicitation of allergic contact dermatitis. *J Clin Invest* **1996 Sep 1**;98(5):1158-64.
- (37) Barker JN, Mitra RS, Griffiths CE, Dixit VM, Nickoloff BJ. Keratinocytes as initiators of inflammation. *Lancet* **1991 Jan 26**;337(8735):211-4.
- (38) Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987 Dec**;84(24):9238-42.
- (39) Osborn L, Hession C, Tizard R, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* **1989 Dec 22**;59(6):1203-11.
- (40) Goebeler M, Trautmann A, Voss A, Brocker EV, Toksoy A, Gillitzer R. Differential and sequential expression of multiple chemokines during elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Am J Pathol* **2001 Feb**;158(2):431-40.
- (41) Kim BH, Lee YS, Kang KS. The mechanism of retinol-induced irritation and its application to anti-irritant development. *Toxicol Lett* **2003 Dec 15**;146(1):65-73.
- (42) Waldorf HA, Walsh LJ, Schechter NM, Murphy GF. Early cellular events in evolving cutaneous delayed hypersensitivity in humans. *Am J Pathol* **1991 Feb**;138(2):477-86.
- (43) Kerdel FA, Belsito DV, Scotto-Chinnici R, Soter NA. Mast cell participation during the elicitation of murine allergic contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* **1987 Jun**;88(6):686-90.
- (44) Akiba H, Kehren J, Ducluzeau MT, et al. Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J Immunol* **2002 Mar 15**;168(6):3079-87.

- (45) Dustin ML, Singer KH, Tuck DT, Springer TA. Adhesion of T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *J Exp Med* **1988 Apr 1**;167(4):1323-40.
- (46) Lewis RE, Buchsbaum M, Whitaker D, Murphy GF. Intercellular adhesion molecule expression in the evolving human cutaneous delayed hypersensitivity reaction. *J Invest Dermatol* **1989 Nov**;93(5):672-7.
- (47) Barker JN, Sarma V, Mitra RS, Dixit VM, Nickoloff BJ. Marked synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors. *J Clin Invest* **1990 Feb**;85(2):605-8.
- (48) Basham TY, Nickoloff BJ, Merigan TC, Morhenn VB. Recombinant gamma interferon induces HLA-DR expression on cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **1984 Aug**;83(2):88-90.
- (49) Belsito DV, Epstein SP, Schultz JM, Baer RL, Thorbecke GJ. Enhancement by various cytokines or 2-beta-mercaptoethanol of Ia antigen expression on Langerhans cells in skin from normal aged and young mice. Effect of cyclosporine A. *J Immunol* **1989 Sep 1**;143(5):1530-6.
- (50) Cavani A, Nasorri F, Prezzi C, Sebastiani S, Albanesi C, Girolomoni G. Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses. *J Invest Dermatol* **2000 Feb**;114(2):295-302.
- (51) Enk AH, Katz SI. Identification and induction of keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* **1992 Jul 1**;149(1):92-5.
- (52) Schwarz A, Grabbe S, Riemann H, et al. In vivo effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol* **1994 Sep**;103(2):211-6.
- (53) Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, et al. Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses. *J Exp Med* **1995 Jul 1**;182(1):99-108.
- (54) Groux H, Powrie F. Regulatory T cells and inflammatory bowel disease. *Immunol Today* **1999 Oct**;20(10):442-5.
- (55) Kronenberg M, Gapin L. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* **2002 Aug**;2(8):557-68.
- (56) Moodycliffe AM, Nghiem D, Clydesdale G, Ullrich SE. Immune suppression and skin cancer development: regulation by NKT cells. *Nat Immunol* **2000**;1(6):521-5.
- (57) Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)/CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* **2000 Jul 17**;192(2):295-302.
- (58) Schwarz A, Beissert S, Grosse-Heitmeyer K, et al. Evidence for functional relevance of CTLA-4 in ultraviolet-radiation-induced tolerance. *J Immunol* **2000 Sep 15**;165(4):1824-31.
- (59) Epstein SP, Baer RL, Thorbecke GJ, Belsito DV. Immunosuppressive effects of transforming growth factor beta: inhibition of the induction of Ia antigen on Langerhans

- cells by cytokines and of the contact hypersensitivity response. *J Invest Dermatol* **1991 Jun**;96(6):832-7.
- (60) Gamble JR, Vadas MA. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor-beta 1. *J Immunol* **1991 Feb 15**;146(4):1149-54.
- (61) Hart PH, Jaksic A, Swift G, Norval M, el Ghorr AA, Finlay-Jones JJ. Histamine involvement in UVB- and cis-urocanic acid-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses. *Immunology* **1997 Sep**;91(4):601-8.
- (62) Hart PH, Townley SL, Grimbaldston MA, Khalil Z, Finlay-Jones JJ. Mast cells, neuropeptides, histamine, and prostaglandins in UV-induced systemic immunosuppression. *Methods* **2002 Oct**;28(1):79-89.
- (63) Robertson B, Gahring L, Newton R, Daynes R. In vivo administration of interleukin 1 to normal mice depresses their capacity to elicit contact hypersensitivity responses: prostaglandins are involved in this modification of immune function. *J Invest Dermatol* **1987 May**;88(4):380-7.
- (64) Pentland AP, Mahoney MG. Keratinocyte prostaglandin synthesis is enhanced by IL-1. *J Invest Dermatol* **1990 Feb**;94(1):43-6.
- (65) Walker C, Kristensen F, Bettens F, deWeck AL. Lymphokine regulation of activated (G1) lymphocytes. I. Prostaglandin E2-induced inhibition of interleukin 2 production. *J Immunol* **1983 Apr**;130(4):1770-3.
- (66) Schwarz A, Schwarz T. Molecular determinants of UV-induced immunosuppression. *Exp Dermatol* **2002**;11 Suppl 1:9-12.
- (67) Toews GB, Bergstresser PR, Streilein JW. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* **1980 Feb**;124(1):445-53.
- (68) Aberer W, Schuler G, Stingl G, Honigsmann H, Wolff K. Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* **1981 Apr**;76(3):202-10.
- (69) Swartz RP. Role of UVB-induced serum factor(s) in suppression of contact hypersensitivity in mice. *J Invest Dermatol* **1984 Nov**;83(4):305-7.
- (70) Morison WL, Bucana C, Kripke ML. Systemic suppression of contact hypersensitivity by UVB radiation is unrelated to the UVB-induced alterations in the morphology and number of Langerhans cells. *Immunology* **1984 Jul**;52(2):299-306.
- (71) Beissert S, Ullrich SE, Hosoi J, Granstein RD. Supernatants from UVB radiation-exposed keratinocytes inhibit Langerhans cell presentation of tumor-associated antigens via IL-10 content. *J Leukoc Biol* **1995 Aug**;58(2):234-40.
- (72) Aubock J, Romani N, Grubauer G, Fritsch P. HLA-DR expression on keratinocytes is a common feature of diseased skin. *Br J Dermatol* **1986 Apr**;114(4):465-72.
- (73) Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor. *J Am Acad Dermatol* **1989 Apr**;20(4):617-29.

- (74) Grossman RM, Krueger J, Yourish D, et al. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1989 Aug**;86(16):6367-71.
- (75) Nickoloff BJ, Karabin GD, Barker JN, et al. Cellular localization of interleukin-8 and its inducer, tumor necrosis factor-alpha in psoriasis. *Am J Pathol* **1991 Jan**;138(1):129-40.
- (76) Luger TA, Stadler BM, Katz SI, Oppenheim JJ. Epidermal cell (keratinocyte)-derived thymocyte-activating factor (ETAF). *J Immunol* **1981 Oct**;127(4):1493-8.
- (77) Kirnbauer R, Kock A, Schwarz T, et al. IFN-beta 2, B cell differentiation factor 2, or hybridoma growth factor (IL-6) is expressed and released by human epidermal cells and epidermoid carcinoma cell lines. *J Immunol* **1989 Mar 15**;142(6):1922-8.
- (78) Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* **1993 Oct 1**;151(5):2390-8.
- (79) Schwarz T, Urbanska A, Gschnait F, Luger TA. Inhibition of the induction of contact hypersensitivity by a UV-mediated epidermal cytokine. *J Invest Dermatol* **1986 Sep**;87(2):289-91.
- (80) Ullrich SE. The role of epidermal cytokines in the generation of cutaneous immune reactions and ultraviolet radiation-induced immune suppression. *Photochem Photobiol* **1995 Sep**;62(3):389-401.
- (81) Ullrich SE, Schmitt DA. The role of cytokines in UV-induced systemic immune suppression. *J Dermatol Sci* **2000 Mar**;23 Suppl 1:S10-S12.
- (82) Krutmann J, Czech W, Parlow F, et al. Ultraviolet radiation effects on human keratinocyte ICAM-1 expression: UV-induced inhibition of cytokine-induced ICAM-1 mRNA expression is transient, differentially restored for IFN gamma versus TNF alpha, and followed by ICAM-1 induction via a TNF alpha-like pathway. *J Invest Dermatol* **1992 Jul**;98(6):923-8.
- (83) Kupper TS, Chua AO, Flood P, McGuire J, Gubler U. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest* **1987 Sep**;80(2):430-6.
- (84) Murphy GM, Dowd PM, Hudspith BN, Brostoff J, Greaves MW. Local increase in interleukin-1-like activity following UVB irradiation of human skin in vivo. *Photodermatol* **1989**;6(6):268-74.
- (85) Chung HT, Burnham DK, Robertson B, Roberts LK, Daynes RA. Involvement of prostaglandins in the immune alterations caused by the exposure of mice to ultraviolet radiation. *J Immunol* **1986 Nov 15**;137(8):2478-84.
- (86) Kock A, Schwarz T, Kirnbauer R, et al. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* **1990**;172(6):1609-14.
- (87) Rivas JM, Ullrich SE. Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from UV-irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* **1992**;149(12):3865-71.

- (88) Vermeer M, Streilein JW. Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor-alpha. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **1990**;7(6):258-65.
- (89) Moodycliffe AM, Kimber I, Norval M. Role of tumour necrosis factor-alpha in ultraviolet B light-induced dendritic cell migration and suppression of contact hypersensitivity. *Immunology* **1994 Feb**;81(1):79-84.
- (90) Amerio P, Toto P, Feliciani C, et al. Rethinking the role of tumour necrosis factor-alpha in ultraviolet (UV) B-induced immunosuppression: altered immune response in UV-irradiated TNFR1R2 gene-targeted mutant mice. *Br J Dermatol* **2001 May**;144(5):952-7.
- (91) Kang K, Hammerberg C, Meunier L, Cooper KD. CD11b+ macrophages that infiltrate human epidermis after in vivo ultraviolet exposure potently produce IL-10 and represent the major secretory source of epidermal IL-10 protein. *J Immunol* **1994**;153(11):5256-64.
- (92) Walterscheid JP, Ullrich SE, Nghiem DX. Platelet-activating factor, a molecular sensor for cellular damage, activates systemic immune suppression. *J Exp Med* **2002 Feb 21**;195(2):171-9.
- (93) Schade N, Esser C, Krutmann J. Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations. *Photochem Photobiol Sci* **2005 Sep**;4(9):699-708.
- (94) Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch (Pathol Anat)* **1868**;44:325-37.
- (95) Stingl G, Katz SI, Clement L, Green I, Shevach EM. Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* **1978 Nov**;121(5):2005-13.
- (96) Bergstresser PR, Fletcher CR, Streilein JW. Surface densities of Langerhans cells in relation to rodent epidermal sites with special immunologic properties. *J Invest Dermatol* **1980 Feb**;74(2):77-80.
- (97) Wolff K. The langerhans cell. *Curr Probl Dermatol* **1971**;4:79-145.
- (98) Streilein JW, Toews GB, Bergstresser PR. Corneal allografts fail to express Ia antigens. *Nature* **1979 Nov 15**;282(5736):326-7.
- (99) Stingl G, Hauser C. The skin immune response. In: Krutmann J, Elmetts CA, eds. *Photoimmunology*. 1st edition ed. Oxford: Blackwell Sciences, **1995**. p. 3-18.
- (100) Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* **1998 Jul 20**;188(2):373-86.
- (101) Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, et al. Signaling events following chemokine receptor ligation in human dendritic cells at different developmental stages. *Int Immunol* **2001 Feb**;13(2):167-79.
- (102) Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* **1997 Feb**;9(1):10-6.

- (103) Saint-Vis B, Vincent J, Vandenabeele S, et al. A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* **1998 Sep**;9(3):325-36.
- (104) Driessen C, Bryant RA, Lennon-Dumenil AM, et al. Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol* **1999 Nov** **15**;147(4):775-90.
- (105) Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat Immunol* **2000 Sep**;1(3):199-205.
- (106) Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, et al. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* **1995 May** **15**;154(10):5071-9.
- (107) Kalinski P, Hilkens CM, Snijders A, Snijdewint FG, Kapsenberg ML. Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂, promote Th2 responses. *Adv Exp Med Biol* **1997**;417:363-7.
- (108) Braun MC, He J, Wu CY, Kelsall BL. Cholera toxin suppresses interleukin (IL)-12 production and IL-12 receptor beta1 and beta2 chain expression. *J Exp Med* **1999 Feb** **1**;189(3):541-52.
- (109) Moodycliffe AM, Kimber I, Norval M. The effect of ultraviolet B irradiation and urocanic acid isomers on dendritic cell migration. *Immunology* **1992 Dec**;77(3):394-9.
- (110) Kolgen W, Both H, van Weelden H, et al. Epidermal langerhans cell depletion after artificial ultraviolet B irradiation of human skin in vivo: apoptosis versus migration. *J Invest Dermatol* **2002 Jun**;118(5):812-7.
- (111) Krutmann J, Khan IU, Wallis RS, et al. Cell membrane is a major locus for ultraviolet B-induced alterations in accessory cells. *J Clin Invest* **1990 May**;85(5):1529-36.
- (112) Tang A, Udey MC. Inhibition of epidermal Langerhans cell function by low dose ultraviolet B radiation. Ultraviolet B radiation selectively modulates ICAM-1 (CD54) expression by murine Langerhans cells. *J Immunol* **1991 Jun** **15**;146(10):3347-55.
- (113) Grewe M, Stege H, Vink A, et al. Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in ultraviolet B-irradiated human antigen-presenting cells is restored after repair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Exp Dermatol* **2000**;9(6):423-30.
- (114) Boonstra A, van Oudenaren A, Barendregt B, An L, Leenen PJ, Savelkoul HF. UVB irradiation modulates systemic immune responses by affecting cytokine production of antigen-presenting cells. *Int Immunol* **2000 Dec**;12(11):1531-8.
- (115) Mizuno K, Okamoto H, Horio T. Ultraviolet B radiation suppresses endocytosis, subsequent maturation, and migration activity of langerhans cell-like dendritic cells. *J Invest Dermatol* **2004 Mar**;122(2):300-6.
- (116) Schwarz T. Ultraviolet radiation-induced tolerance. *Allergy* **1999**;54(12):1252-61.
- (117) Elmetts CA, Bergstresser PR, Tigelaar RE, Wood PJ, Streilein JW. Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J Exp Med* **1983 Oct** **1**;158(3):781-94.

- (118) Schwarz A, Grabbe S, Mahnke K, et al. Interleukin 12 breaks ultraviolet light induced immunosuppression by affecting CD8+ rather than CD4+ T cells. *J Invest Dermatol* **1998 Apr**;110(3):272-6.
- (119) Shreedhar VK, Pride MW, Sun Y, Kripke ML, Strickland FM. Origin and characteristics of ultraviolet-B radiation-induced suppressor T lymphocytes. *J Immunol* **1998 Sep** 1;161(3):1327-35.
- (120) Simon JC, Hara H, Denfeld RW, Martin S. UVB-irradiated dendritic cells induce nonproliferating, regulatory type T cells. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **2002 Sep**;15(5):330-4.
- (121) De Fabo EC, Noonan FP. Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J Exp Med* **1983 Aug** 1;158(1):84-98.
- (122) Kurimoto I, Streilein JW. cis-urocanic acid suppression of contact hypersensitivity induction is mediated via tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **1992 Jun** 15;148(10):3072-8.
- (123) Beissert S, Ruhlmann D, Mohammad T, et al. IL-12 prevents the inhibitory effects of cis-urocanic acid on tumor antigen presentation by Langerhans cells: implications for photocarcinogenesis. *J Immunol* **2001**;167(11):6232-8.
- (124) Hart PH, Grimbaldston MA, Swift GJ, Hosszu EK, Finlay-Jones JJ. A critical role for dermal mast cells in cis-urocanic acid-induced systemic suppression of contact hypersensitivity responses in mice. *Photochem Photobiol* **1999 Dec**;70(5):807-12.
- (125) Holan V, Kuffova L, Zajicova A, et al. Urocanic acid enhances IL-10 production in activated CD4+ T cells. *J Immunol* **1998 Nov** 1;161(7):3237-41.
- (126) Applegate LA, Ley RD, Alcalay J, Kripke ML. Identification of the molecular target for the suppression of contact hypersensitivity by ultraviolet radiation. *J Exp Med* **1989 Nov** 1;170(4):1117-31.
- (127) Yuen KS, Halliday GM. alpha-Tocopherol, an inhibitor of epidermal lipid peroxidation, prevents ultraviolet radiation from suppressing the skin immune system. *Photochem Photobiol* **1997 Mar**;65(3):587-92.
- (128) Basu S. Ultraviolet absorption studies on DNA. *Biopolymers* **1967**;5(9):876-8.
- (129) Kochevar IE. Primary processes in photobiology and photosensitization. In: Krutmann J, Elmetts CA, eds. *Photoimmunology*. 1st edition ed. Oxford: Blackwell Science Ltd., **1995**. p. 19-33.
- (130) Yarosh DB, Boumakis S, Brown AB, et al. Measurement of UVB-Induced DNA damage and its consequences in models of immunosuppression. *Methods* **2002 Sep**;28(1):55-62.
- (131) Ueda M, Matsunaga T, Bito T, Nikaido O, Ichihashi M. Higher cyclobutane pyrimidine dimer and (6-4) photoproduct yields in epidermis of normal humans with increased sensitivity to ultraviolet B radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **1996 Feb**;12(1):22-6.

- (132) Qin X, Zhang S, Oda H, et al. Quantitative detection of ultraviolet light-induced photoproducts in mouse skin by immunohistochemistry. *Jpn J Cancer Res* **1995 Nov**;86(11):1041-8.
- (133) Maccubbin AE, Przybyszewski J, Evans MS, et al. DNA damage in UVB-irradiated keratinocytes. *Carcinogenesis* **1995 Aug**;16(7):1659-60.
- (134) Vink AA, Strickland FM, Bucana C, et al. Localization of DNA damage and its role in altered antigen-presenting cell function in ultraviolet-irradiated mice. *J Exp Med* **1996 May 1**;183(4):1491-500.
- (135) Kripke ML, Cox PA, Alas LG, Yarosh DB. Pyrimidine dimers in DNA initiate systemic immunosuppression in UV-irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992 Sep 15**;89(16):7516-20.
- (136) Vink AA, Moodycliffe AM, Shreedhar V, et al. The inhibition of antigen-presenting activity of dendritic cells resulting from UV irradiation of murine skin is restored by in vitro photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997 Jun 13**;94(10):5255-60.
- (137) Ahrens C, Grewe M, Berneburg M, et al. Photocarcinogenesis and inhibition of intercellular adhesion molecule 1 expression in cells of DNA-repair-defective individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1997 Jul 24**;94(13):6837-41.
- (138) Stege H, Roza L, Vink AA, et al. Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000 Mar 15**;97(4):1790-5.
- (139) Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. third edition ed. New York: Oxford University Press, **1999**.
- (140) Jurkiewicz BA, Buettner GR. Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochem Photobiol* **1994 Feb**;59(1):1-4.
- (141) Masaki H, Atsumi T, Sakurai H. Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun* **1995 Feb 17**;206(2):474-9.
- (142) Hasegawa T, Kaneko F, Niwa Y. Changes in lipid peroxide levels and activity of reactive oxygen scavenging enzymes in skin, serum and liver following UVB irradiation in mice. *Life Sci* **1992**;50(24):1893-903.
- (143) Sasaki H, Akamatsu H, Horio T. Effects of a single exposure to UVB radiation on the activities and protein levels of copper-zinc and manganese superoxide dismutase in cultured human keratinocytes. *Photochem Photobiol* **1997 May**;65(4):707-13.
- (144) Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, Laskin JD. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J Biol Chem* **2003 Jul 20**;278(25):22432-6.
- (145) Chang H, Oehrl W, Elsner P, Thiele JJ. The role of H₂O₂ as a mediator of UVB-induced apoptosis in keratinocytes. *Free Radic Res* **2003 Jun**;37(6):655-63.

- (146) Kramer-Stickland K, Edmonds A, Bair WB, III, Bowden GT. Inhibitory effects of deferoxamine on UVB-induced AP-1 transactivation. *Carcinogenesis* **1999 Dec**;20(11):2137-42.
- (147) Brenneisen P, Sies H, Scharffetter-Kochanek K. Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* **2002 Dec**;973:31-43.
- (148) Katiyar SK, Elmets CA, Agarwal R, Mukhtar H. Protection against ultraviolet-B radiation-induced local and systemic suppression of contact hypersensitivity and edema responses in C3H/HeN mice by green tea polyphenols. *Photochem Photobiol* **1995 Dec**;62(5):855-61.
- (149) Katiyar SK. Treatment of silymarin, a plant flavonoid, prevents ultraviolet light-induced immune suppression and oxidative stress in mouse skin. *Int J Oncol* **2002**;21(6):1213-22.
- (150) Lee EH, Faulhaber D, Hanson KM, et al. Dietary lutein reduces ultraviolet radiation-induced inflammation and immunosuppression. *J Invest Dermatol* **2004 Mar**;122(2):510-7.
- (151) Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol* **2001 Mar**;44(3):425-32.
- (152) Afaq F, Mukhtar H. Photochemoprevention by botanical antioxidants. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* **2002 Sep**;15(5):297-306.
- (153) Rosette C, Karin M. Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science* **1996 Dec 15**;274(5290):1194-7.
- (154) Aragane Y, Kulms D, Metze D, et al. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* **1998 Feb 12**;140(1):171-82.
- (155) Marchese C, Maresca V, Cardinali G, et al. UVB-induced activation and internalization of keratinocyte growth factor receptor. *Oncogene* **2003 May 24**;22(16):2422-31.
- (156) Benveniste J, Henson PM, Cochrane CG. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor. *J Exp Med* **1972 Dec 1**;136(6):1356-77.
- (157) Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* **2000 Jan**;39(1):41-82.
- (158) Snyder F. Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim Biophys Acta* **1995 Feb 9**;1254(3):231-49.
- (159) Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. *J Biol Chem* **1990 Oct 15**;265(29):17381-4.
- (160) Klopogge E, Akkerman JW. Binding kinetics of PAF-acether (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) to intact human platelets. *Biochem J* **1984 Nov 1**;223(3):901-9.

- (161) Tjoelker LW, Stafforini DM. Platelet-activating factor acetylhydrolases in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **2000 Oct 31**;1488(1-2):102-23.
- (162) Matsuzawa A, Hattori K, Aoki J, Arai H, Inoue K. Protection against oxidative stress-induced cell death by intracellular platelet-activating factor-acetylhydrolase II. *J Biol Chem* **1997 Dec 19**;272(51):32315-20.
- (163) Marques M, Pei Y, Southall MD, et al. Identification of platelet-activating factor acetylhydrolase II in human skin. *J Invest Dermatol* **2002 Oct**;119(4):913-9.
- (164) Dupre DJ, Chen Z, Le Gouill C, et al. Trafficking, ubiquitination, and down-regulation of the human platelet-activating factor receptor. *J Biol Chem* **2003 Nov 28**;278(48):48228-35.
- (165) Streilein JW, Bergstresser PR. Genetic basis of ultraviolet-B effects on contact hypersensitivity. *Immunogenetics* **1988**;27(4):252-8.
- (166) Noonan FP, Hoffman HA. Susceptibility to immunosuppression by ultraviolet B radiation in the mouse. *Immunogenetics* **1994**;39(1):29-39.
- (167) Streilein JW, Taylor JR, Vincek V, et al. Relationship between ultraviolet radiation-induced immunosuppression and carcinogenesis. *J Invest Dermatol* **1994 Dec**;103(5 Suppl):107S-11S.
- (168) Yoshikawa T, Streilein JW. Genetic basis of the effects of ultraviolet light B on cutaneous immunity. Evidence that polymorphism at the *Tnfa* and *Lps* loci governs susceptibility. *Immunogenetics* **1990**;32(6):398-405.
- (169) Handel-Fernandez ME, Kurimoto I, Streilein JW, Vincek V. Genetic mapping and physical cloning of UVB susceptibility region in mice. *J Invest Dermatol* **1999 Sep**;113(2):224-9.
- (170) de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* **1999 May 1**;13(7):768-85.
- (171) Berneburg M, Lowe JE, Nardo T, et al. UV damage causes uncontrolled DNA breakage in cells from patients with combined features of XP-D and Cockayne syndrome. *EMBO J* **2000 Mar 1**;19(5):1157-66.
- (172) Boonstra A, van Oudenaren A, Baert M, et al. Differential ultraviolet-B-induced immunomodulation in XPA, XPC, and CSB DNA repair-deficient mice. *J Invest Dermatol* **2001 Jul**;117(1):141-6.
- (173) Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **1997 Feb 7**;88(3):323-31.
- (174) Herzinger T, Funk JO, Hillmer K, Eick D, Wolf DA, Kind P. Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the *cdc2* cell cycle kinase. *Oncogene* **1995 Nov 16**;11(10):2151-6.
- (175) Bode AM, Dong Z. Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci STKE* **2003 Feb 28**;2003(167):RE2.
- (176) Zambetti GP, Levine AJ. A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *FASEB J* **1993 Jul**;7(10):855-65.

- (177) Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993 May** 1;90(9):4216-20.
- (178) Smit NP, Vink AA, Kolb RM, et al. Melanin offers protection against induction of cyclobutane pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts by UVB in cultured human melanocytes. *Photochem Photobiol* **2001 Sep**;74(3):424-30.
- (179) Bykov VJ, Marcusson JA, Hemminki K. Protective effects of tanning on cutaneous DNA damage in situ. *Dermatology* **2001**;202(1):22-6.
- (180) Haussinger D. The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem J* **1996 Feb** 1;313 (Pt 3):697-710.
- (181) Warskulat U, Reinen A, Grether-Beck S, Krutmann J, Haussinger D. The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis. *J Invest Dermatol* **2004 Oct**;123(3):516-21.
- (182) Janeke G, Siefken W, Carstensen S, et al. Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration. *J Invest Dermatol* **2003 Aug**;121(2):354-61.
- (183) Huxtable RJ. Physiological actions of taurine. *Physiol Rev* **1992 Jan**;72(1):101-63.
- (184) Denmarcay H. Ueber die Natur der Galle. 27 ed. **1838**. p. 270-91.
- (185) Wright CE, Tallan HH, Lin YY, Gaull GE. Taurine: biological update. *Annu Rev Biochem* **1986**;55:427-53.
- (186) Worden JA, Stipanuk MH. A comparison by species, age and sex of cysteinesulfinate decarboxylase activity and taurine concentration in liver and brain of animals. *Comp Biochem Physiol B* **1985**;82(2):233-9.
- (187) Huxtable RJ. Sources and turnover rates of taurine in nursing and weaned rat pups. *J Nutr* **1981 Jul**;111(7):1275-86.
- (188) Huxtable RJ, Lippincott SE. Diet and biosynthesis as sources of taurine in the mouse. *J Nutr* **1982 May**;112(5):1003-10.
- (189) Rozen R, Scriver CR. Renal transport of taurine adapts to perturbed taurine homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1982 Mar**;79(6):2101-5.
- (190) Zelikovic I, Chesney RW, Friedman AL, Ahlfors CE. Taurine depletion in very low birth weight infants receiving prolonged total parenteral nutrition: role of renal immaturity. *J Pediatr* **1990 Feb**;116(2):301-6.
- (191) Gaull GE, Rassin DK, Raiha NC, Heinonen K. Milk protein quantity and quality in low-birth-weight infants. III. Effects on sulfur amino acids in plasma and urine. *J Pediatr* **1977 Mar**;90(3):348-55.
- (192) Gray GE, Landel AM, Meguid MM. Taurine-supplemented total parenteral nutrition and taurine status of malnourished cancer patients. *Nutrition* **1994 Jan**;10(1):11-5.
- (193) Paauw JD, Davis AT. Taurine concentrations in serum of critically injured patients and age- and sex-matched healthy control subjects. *Am J Clin Nutr* **1990 Oct**;52(4):657-60.

- (194) Vente JP, von Meyenfeldt MF, van Eijk HM, et al. Plasma-amino acid profiles in sepsis and stress. *Ann Surg* **1989 Jan**;209(1):57-62.
- (195) Ament ME, Geggel HS, Heckenlively JR, Martin DA, Kopple J. Taurine supplementation in infants receiving long-term total parenteral nutrition. *J Am Coll Nutr* **1986**;5(2):127-35.
- (196) Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM. Taurine deficiency in the developing cat: persistence of the cerebellar external granule cell layer. *Prog Clin Biol Res* **1985**;179:43-52.
- (197) Sturman JA, Moretz RC, French JH, Wisniewski HM. Postnatal taurine deficiency in the kitten results in a persistence of the cerebellar external granule cell layer: correction by taurine feeding. *J Neurosci Res* **1985**;13(4):521-8.
- (198) Pasantes-Morales H, Wright CE, Gaull GE. Taurine protection of lymphoblastoid cells from iron-ascorbate induced damage. *Biochem Pharmacol* **1985 Jun 15**;34(12):2205-7.
- (199) vom DS, Monnighoff I, Haussinger D. Decrease of plasma taurine in Gaucher disease and its sustained correction during enzyme replacement therapy. *Amino Acids* **2000**;19(3-4):585-92.
- (200) Komarov AM, Reddy MN. Effect of septic shock on nitrate, free amino acids, and urea in murine plasma and urine. *Clin Biochem* **1998 Mar**;31(2):107-11.
- (201) Heller-Stilb B, van Roeyen C, Rascher K, et al. Disruption of the taurine transporter gene (*taut*) leads to retinal degeneration in mice. *FASEB J* **2002 Feb**;16(2):231-3.
- (202) Timbrell JA, Seabra V, Waterfield CJ. The in vivo and in vitro protective properties of taurine. *Gen Pharmacol* **1995 May**;26(3):453-62.
- (203) Warskulat U, Zhang F, Haussinger D. Taurine is an osmolyte in rat liver macrophages (Kupffer cells). *J Hepatol* **1997 Jun**;26(6):1340-7.
- (204) Nakamura T, Ogasawara M, Koyama I, Nemoto M, Yoshida T. The protective effect of taurine on the biomembrane against damage produced by oxygen radicals. *Biol Pharm Bull* **1993 Oct**;16(10):970-2.
- (205) Emudianughe TS, Caldwell J, Smith RL. The utilization of exogenous taurine for the conjugation of xenobiotic acids in the ferret. *Xenobiotica* **1983 Mar**;13(3):133-8.
- (206) Hayes KC, Carey RE, Schmidt SY. Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat. *Science* **1975 May 30**;188(4191):949-51.
- (207) Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes D. Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition* **1998 Jul**;14(7-8):599-604.
- (208) Uchida S, Kwon HM, Yamauchi A, Preston AS, Marumo F, Handler JS. Molecular cloning of the cDNA for an MDCK cell Na(+)- and Cl(-)-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992 Sep 1**;89(17):8230-4.
- (209) Smith KE, Borden LA, Wang CH, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL. Cloning and expression of a high affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* **1992 Oct**;42(4):563-9.

- (210) Ramamoorthy S, Leibach FH, Mahesh VB, et al. Functional characterization and chromosomal localization of a cloned taurine transporter from human placenta. *Biochem J* **1994 Jun 15**;300 (Pt 3):893-900.
- (211) Grafe F, Wohlrab W, Neubert RH, Brandsch M. Functional characterization of sodium- and chloride-dependent taurine transport in human keratinocytes. *Eur J Pharm Biopharm* **2004 Mar**;57(2):337-41.
- (212) Lang F, Busch GL, Ritter M, et al. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. *Physiol Rev* **1998 Jan**;78(1):247-306.
- (213) Warskulat U, Flogel U, Jacoby C, et al. Taurine transporter knockout depletes muscle taurine levels and results in severe skeletal muscle impairment but leaves cardiac function uncompromised. *FASEB J* **2004 Mar**;18(3):577-9.
- (214) Warskulat U, Borsch E, Reinehr R, et al. Chronic liver disease is triggered by taurine transporter knockout in the mouse. *FASEB J* **2006 Jan 18**.
- (215) Huang DY, Boini KM, Lang PA, et al. Impaired ability to increase water excretion in mice lacking the taurine transporter gene TAUT. *Pflugers Arch* **2006 Feb**;451(5):668-77.
- (216) Sze DY, Jardetzky O. Determination of metabolite and nucleotide concentrations in proliferating lymphocytes by ¹H-NMR of acid extracts. *Biochim Biophys Acta* **1990 Sep 1**;1054(2):181-97.
- (217) Flogel U, Decking UK, Godecke A, Schrader J. Contribution of NO to ischemia-reperfusion injury in the saline-perfused heart: a study in endothelial NO synthase knockout mice. *J Mol Cell Cardiol* **1999 Apr**;31(4):827-36.
- (218) 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. *J Exp Med* **2005 Jan 17**;201(2):173-9.
- (219) Granstein RD, Askari M, Whitaker D, Murphy GF. Epidermal cells in activation of suppressor lymphocytes: further characterization. *J Immunol* **1987 Jun 15**;138(12):4055-62.
- (220) FOLCH J, LEES M, Sloane- Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **1957 May**;226(1):497-509.
- (221) Patrick MH. Studies on thymine-derived UV photoproducts in DNA--I. Formation and biological role of pyrimidine adducts in DNA. *Photochem Photobiol* **1977 May**;25(4):357-72.
- (222) Messina SA, Dawson RJr. Attenuation of oxidative damage to DNA by taurine and taurine analogs. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2000, **2002**. p. 355-67.
- (223) Schwarz A, Stander S, Berneburg M, et al. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol* **2002 Jan**;4(1):26-31.
- (224) Huxtable RJ. Expanding the circle 1975-1999: sulfur biochemistry and insights on the biological functions of taurine. *Adv Exp Med Biol* **2000**;483:1-25.

- (225) Barber LA, Spandau DF, Rathman SC, et al. Expression of the platelet-activating factor receptor results in enhanced ultraviolet B radiation-induced apoptosis in a human epidermal cell line. *J Biol Chem* **1998 Jul 24**;273(30):18891-7.
- (226) Pei Y, Barber LA, Murphy RC, et al. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. *J Immunol* **1998 Sep 15**;161(4):1954-61.
- (227) Travers JB, Harrison KA, Johnson CA, Clay KL, Morelli JG. Platelet-activating factor biosynthesis induced by various stimuli in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* **1996 Jul**;107(1):88-94.
- (228) Lobo MV, Alonso FJ, Latorre A, Martin dR. Taurine levels and localisation in the stratified squamous epithelia. *Histochem Cell Biol* **2001 Apr**;115(4):341-7.
- (229) Freeman SE, Gange RW, Matzinger EA, Sutherland BM. Higher pyrimidine dimer yields in skin of normal humans with higher UVB sensitivity. *J Invest Dermatol* **1986 Feb**;86(1):34-6.
- (230) McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Biologically active oxidized phospholipids. *J Biol Chem* **1999 Sep 3**;274(36):25189-92.
- (231) Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* **2000**;69:419-45.
- (232) Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J* **1993 Jun 15**;292 (Pt 3):617-29.
- (233) Travers JB, Huff JC, Rola-Pleszczynski M, Gelfand EW, Morelli JG, Murphy RC. Identification of functional platelet-activating factor receptors on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **1995 Dec**;105(6):816-23.
- (234) Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* **2003**;40(6):643-72.
- (235) Shreedhar V, Giese T, Sung VW, Ullrich SE. A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol* **1998 May 15**;160(8):3783-9.
- (236) Muller G, Saloga J, Germann T, et al. Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. *J Clin Invest* **1994 Nov**;94(5):1799-805.
- (237) Schwarz A, Grabbe S, Aragane Y, et al. Interleukin-12 prevents ultraviolet B-induced local immunosuppression and overcomes UVB-induced tolerance. *J Invest Dermatol* **1996 Jul**;106(6):1187-91.
- (238) Katiyar SK, Challa A, McCormick TS, Cooper KD, Mukhtar H. Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis* **1999 Dec**;20(11):2117-24.
- (239) Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* **1997 Dec 15**;159(10):4772-80.

- (240) Simon JC, Tigelaar RE, Bergstresser PR, Edelbaum D, Cruz PD, Jr. Ultraviolet B radiation converts Langerhans cells from immunogenic to tolerogenic antigen-presenting cells. Induction of specific clonal anergy in CD4+ T helper 1 cells. *J Immunol* **1991 Feb 15**;146(2):485-91.
- (241) Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* **1999 Apr 1**;93(5):1634-42.
- (242) Bour H, Peyron E, Gaucherand M, et al. Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur J Immunol* **1995 Nov**;25(11):3006-10.
- (243) Krasteva M, Kehren J, Horand F, et al. Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J Immunol* **1998 Feb 1**;160(3):1181-90.
- (244) Saint-Mezard P, Berard F, Dubois B, Kaiserlian D, Nicolas JF. The role of CD4+ and CD8+ T cells in contact hypersensitivity and allergic contact dermatitis. *Eur J Dermatol* **2004 May**;14(3):131-8.
- (245) Hammerberg C, Duraiswamy N, Cooper KD. Active induction of unresponsiveness (tolerance) to DNFB by in vivo ultraviolet-exposed epidermal cells is dependent upon infiltrating class II MHC+ CD11bbright monocytic/macrophagic cells. *J Immunol* **1994 Dec 1**;153(11):4915-24.
- (246) Hammerberg C, Duraiswamy N, Cooper KD. Reversal of immunosuppression inducible through ultraviolet-exposed skin by in vivo anti-CD11b treatment. *J Immunol* **1996**;157(12):5254-61.
- (247) Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. CD11b+ cells are the major source of oxidative stress in UV radiation-irradiated skin: possible role in photoaging and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* **2003 Apr**;77(3):259-64.
- (248) Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **1982 Sep 24**;217(4566):1214-22.
- (249) Warner RR, Myers MC, Taylor DA. Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile. *J Invest Dermatol* **1988 Feb**;90(2):218-24.
- (250) Cantafora A, Mantovani A, Masella R, Mechelli L, Alvaro D. Effect of taurine administration on liver lipids in guinea pig. *Experientia* **1986 Apr 15**;42(4):407-8.
- (251) Guertin F, Roy CC, Lepage G, Yousef I, Tuchweber B. Liver membrane composition after short-term parenteral nutrition with and without taurine in guinea pigs: the effect to taurine. *Proc Soc Exp Biol Med* **1993 Sep**;203(4):418-23.
- (252) Lombardini JB. Taurine: retinal function. *Brain Res Brain Res Rev* **1991 May**;16(2):151-69.
- (253) Banks MA, Porter DW, Martin WG, Castranova V. Taurine protects against oxidant injury to rat alveolar pneumocytes. *Adv Exp Med Biol* **1992**;315:341-54.

- (254) Pasantés-Morales H, Cruz C. Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. *J Neurosci Res* **1984**;11(3):303-11.
- (255) Nakashima T, Takino T, Kuriyama K. Therapeutic and prophylactic effects of taurine administration on experimental liver injury. *Prog Clin Biol Res* **1983**;125:449-59.
- (256) Alvarez JG, Storey BT. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol Reprod* **1983 Oct**;29(3):548-55.
- (257) Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Mukhtar H. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis* **2001 Mar**;22(2):287-94.
- (258) Franconi F, Stendardi I, Matucci R, et al. Inotropic effect of taurine in guinea-pig ventricular strips. *Eur J Pharmacol* **1984 Jul 20**;102(3-4):511-4.
- (259) Welty JD, McBroom MJ. Effects of verapamil and taurine administration on heart taurine and calcium in BIO 14.6 cardiomyopathic hamsters. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* **1985 Jul**;49(1):141-4.
- (260) Kramer JH, Chovan JP, Schaffer SW. Effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure. *Am J Physiol* **1981 Feb**;240(2):H238-H246.
- (261) Schieven GL, Kiriwara JM, Gilliland LK, Uckun FM, Ledbetter JA. Ultraviolet radiation rapidly induces tyrosine phosphorylation and calcium signaling in lymphocytes. *Mol Biol Cell* **1993 May**;4(5):523-30.
- (262) Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes. *Biochem J* **1996 Dec 15**;320 (Pt 3):997-1003.
- (263) Fisher GJ, Talwar HS, Ryder NS, Voorhees JJ. Differential activation of human skin cells by platelet activating factor: stimulation of phosphoinositide turnover and arachidonic acid mobilization in keratinocytes but not in fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **1989 Sep 29**;163(3):1344-50.
- (264) Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **1986 Jul 18**;233(4761):305-12.
- (265) Militante JD, Lombardini JB. Treatment of hypertension with oral taurine: experimental and clinical studies. *Amino Acids* **2002**;23(4):381-93.
- (266) Di Leo MA, Santini SA, Cercone S, et al. Chronic taurine supplementation ameliorates oxidative stress and Na⁺ K⁺ ATPase impairment in the retina of diabetic rats. *Amino Acids* **2002**;23(4):401-6.
- (267) Trepte S, Winkler P. Reconstruction of erythemal UV irradiance and dose at Hohenpeissenberg (1968-2001) considering trends of total ozone, cloudiness and turbidity. *Theoret Appl Climatol* **2004**;77:159-71.

IX. Lebenslauf

von Nicole Schade

Geburtsdatum 2. August 1968
 Geburtsort Bockum-Hövel, jetzt Hamm (Westfalen)
 Familienstand ledig

Schulausbildung 1974 – 1978 Grundschule Talschule, Bockum-Hövel
 1978 – 1987 Galilei-Gymnasium Hamm, Hamm (Westfalen)

Schulabschluss 1987 Abitur

Ausbildung 1988 – 1990 Universität zu Köln, Köln
 Studium der Germanistik, Anglistik und Afrikanistik
 1990 – 1992 Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf
 Lehramtsstudium Biologie
 1992 – 1996 Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf
 Diplomstudium Biologie

Diplomprüfung 1996 Hauptfach: Zoologie
 Nebenfach 1: Immunologie
 Nebenfach 2: Physik

Diplomarbeit 1997 – 1998 Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und
 Parasitologie, Düsseldorf unter Prof. Dr. rer. nat. Heinz Mehlhorn
 Thema: Morphologisch-vergleichende Untersuchungen zur
 Oberflächenstruktur von *Tetrahymena pyriformis* und *Ichthyophthirius*
multifiliis.

Praktikum 1990 Tierärztliche Klinik Münster-Telgte, Telgte

Tätigkeiten 1995 – 1998 Wissenschaftliche Hilfskraft, Heinrich Heine Universität
 Düsseldorf, Düsseldorf
 1996 – 1998 GfK-Protokolleurin, Fernsehsender Nickelodeon,
 Abteilung Sendetechnik
 1998 – 2002 freiberufliche Tätigkeit als Wissenschaftsjournalistin

Aufbaukurse Dez. 1999 Lehrgang „Wissenschaftsjournalismus“, Henri-Nannen-
 Schule Berlin, Berlin
 Okt. 2000 Lehrgang „Online Redaktion“, Medienakademie Köln
 GmbH, Köln

- Dissertation seit Juni 2002 Institut für Umweltmedizinische Forschung an der
Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Abteilung Immunologie,
Düsseldorf
Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Esser
Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Mehlhorn
Thema: Ein hoher Taurinlevel in der Haut ist ein natürlicher zellulärer
Schutzmechanismus gegen Ultraviolett B-induzierte Immunsuppression
in Mäusen.
- Kongresse
Vorträge
31. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung,
Dresden, 26. – 28. Februar, 2004
Schade N., Felsner I., Warskulat U., Schwarz A., Schwarz T., Grether-
Beck S., Esser C., Häussinger D. and Krutmann J.:
„The osmolyte taurine plays a critical role in ultraviolet-B radiation
induced immunosuppression.“
65. Treffen der „Society for Investigative Dermatology“, Providence,
Rhode Island, USA, 28. April – 1. Mai, 2004
Schade N., Felsner I., Warskulat U., Schwarz A., Schwarz T., Grether-
Beck S., Esser C., Häussinger D. and Krutmann J.:
„The osmolyte taurine is critically involved in photoprotection against
ultraviolet B radiation-induced immunosuppression.“
67. Treffen der „Society for Investigative Dermatology“, Philadelphia,
Pennsylvania, USA, 3. – 6. Mai, 2006
Nicole Schade, Charlotte Esser, Ulrich Warskulat, Ulrich Flogel, Agatha
Schwarz, Thomas Schwarz, Daniel Yarosh, Susanne Grether-Beck,
Dieter Haussinger and Jean Krutmann:
„Skin taurine levels determine the sensitivity to UVB radiation-induced
membrane damage leading to immunosuppression.“
- Posterpräsentationen
- Internationale Konferenz für „Molecular Research in Environmental
Medicine“, Düsseldorf, 18. – 20. März, 2004
Nicole Schade, Ingo Felsner, Ulrich Warskulat, Agatha Schwarz,
Thomas Schwarz, Susanne Grether-Beck, Charlotte Esser, Dieter
Häussinger and Jean Krutmann:
„The osmolyte taurine plays a critical role in ultraviolet B radiation-
induced immunosuppression.“
65. Treffen der „Society for Investigative Dermatology, Providence,
Rhode Island, USA, 28. April – 1. Mai, 2004
Schade N., Felsner I., Warskulat U., Schwarz A., Schwarz T., Grether-
Beck S., Esser C., Häussinger D. and Krutmann J.:
„The osmolyte taurine is critically involved in photoprotection against
ultraviolet B radiation-induced immunosuppression.“

67. Treffen der „Society for Investigative Dermatology“, Philadelphia, Pennsylvania, USA, 3. – 6. Mai, 2006
Nicole Schade, Charlotte Esser, Ulrich Warskulat, Ulrich Floegel, Agatha Schwarz, Thomas Schwarz, Daniel Yarosh, Susanne Grether-Beck, Dieter Haeussinger and Jean Krutmann:
„Skin taurine levels determine the sensitivity to UVB radiation-induced membrane damage leading to immunosuppression.“
- Eingeladene Seminare
14. Internationaler Kongress für Photobiologie, Jeju, Korea, 10. – 15. Juni, 2004
Schade N., Felsner I., Warskulat U., Schwarz A., Schwarz T., Grether-Beck S., Esser C., Häussinger D. and Krutmann J.:
„The osmolyte taurine plays a critical role in ultraviolet-B radiation induced immunosuppression.“
11. Kongress der Europäischen Gesellschaft für Photobiologie, Aix-les-Bains, Frankreich, 3. – 8. September, 2005
Schade N., Felsner I., Warskulat U., Schwarz A., Schwarz T., Grether-Beck S., Esser C., Häussinger D. and Krutmann J.:
„The osmolyte taurine plays a critical role in ultraviolet-B radiation induced immunosuppression.“
- Veröffentlichungen
- Schade N., Esser C. and Krutmann J.
Ultraviolet B radiation-induced immunosuppression: molecular mechanisms and cellular alterations.
Photochemical and Photobiological Sciences, 4: 699 – 708, 2005
(review)

X. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Charlotte Esser für die gute wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und die Möglichkeit, das Thema nach eigenen Ideen bearbeiten zu können.

Prof. Dr. Heinz Mehlhorn vom Institut für Zoomorphologie, Zellbiologie und Parasitologie der Universität Düsseldorf danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und dessen Begutachtung.

Prof. Dr. Jean Krutmann danke ich dafür, dass er mir die Zucht der *taut*-defizienten Mäuse und die Arbeit mit diesen Tieren anvertraut hat. Mein Dank gilt ihm außerdem dafür, dass er mir ermöglicht hat, während meiner Dissertation viele internationale Kongresse besuchen zu können.

PD Dr. Susanne Grether-Beck danke ich für die gute Kooperation und Hilfsbereitschaft bei der HPTLC und dafür, dass ich in ihrem gut organisierten Labor meine Zellkulturexperimente durchführen konnte.

PD Dr. Ulrich Warskulat vom Institut für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Universität Düsseldorf danke ich für die Hilfsbereitschaft bei Fragen zur Zucht und Pflege der *taut*-defizienten Mäuse und seine Unterstützung bei den Taurinmessungen.

Dr. Ulrich Flögel vom Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie der Universität Düsseldorf danke ich für die NMR-Spektroskopiemessungen.

Ich danke dem gesamten Team des Tierhauses für die gute Pflege der Mäuse und die gute, hilfsbereite Atmosphäre, die sich nach dem Wechsel der Tierhausleitung entwickelt hat.

Ich danke Swantje Steinwachs und Alla Velgach für ihre zuverlässige technische Assistenz bei allen Experimenten und Arbeiten rund um die Maus.

Daniela Brammertz danke ich für ihre großartige technische Assistenz bei der HPTLC und ihre Zuverlässigkeit.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter des IUF, insbesondere an meine Kollegen Markus, Vladimir, Bettina, Susanne, Andreas, Tommi und Kasi für ihre stete Hilfsbereitschaft und die Verbreitung der guten Stimmung im Laboralltag. Maryam danke ich zusätzlich für die diversen gemeinsamen Shoppingtouren nach der Arbeit. Großen Dank schulde ich vor allem Marc für seine vielen wissenschaftlichen Antworten auf meine Fragen, für die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Gespräche und seine Solidarität.

Ganz besonders danke ich meiner Familie, allen voran meinem Freund Dr. rer. nat. Thomas für seine vielen wissenschaftlichen Anregungen und virtuose Hilfe bei Computerproblemen. Aber noch viel mehr danke ich ihm für seine Aufbaukraft, seinen Rückhalt, seine zuverlässige Unterstützung und das äußerst fruchtbare Zusammenleben.

XI. Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Ein hoher Taurinlevel in der Haut ist ein natürlicher zellulärer Schutzmechanismus gegen Ultraviolett B-induzierte Immunsuppression in Mäusen“ selbständig verfasst und neben den angegebenen Quellen keine weiteren Hilfsmittel verwendet habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 15. Mai 2006