

Abschließender Sachbericht

Titel des Vorhabens: Funktion des angeborenen Immunsystems bei umweltinduzierter Hautalterung

Leibniz-Einrichtung: IUF Leibniz Institut für umweltmedizinische Forschung,
Düsseldorf
Aktenzeichen: SAW-2012
Projektlaufzeit: 01.04.2012-30.4.2016
Ansprechpartner: PD Dr. Weighardt

Inhaltverzeichnis

Executive summary:

Allgemeine Angaben

Ausgangsfragen und Zielsetzung des Vorhabens

Entwicklung der durchgeführten Arbeiten

Ergebnisse und Diskussion

Stellungnahme, ob Ergebnisse des Vorhabens wirtschaftlich verwertbar sind und ob eine solche Verwertung erfolgt oder zu erwarten ist; Angaben zu möglichen Patenten oder Industriekooperationen

Angabe der Beiträge von möglichen Kooperationspartnern im In- und Ausland, die zu den Ergebnissen des Vorhabens beigetragen haben

Qualifikationsarbeiten, die im Zusammenhang mit dem Vorhaben entstanden sind;

Liste der Publikationen aus dem Vorhaben

Darstellung der Maßnahmen zur Sicherung und Verfügbarmachung der im Vorhaben produzierten Forschungsdaten

Liste möglicher Pressemitteilungen und Medienberichte

Allgemeiner, anonymisierter Text für Projekte mit Tierversuchen

Executive summary:

In diesem Projekt wurde die Funktion des angeborenen Immunsystems bei extrinsischer Hautalterung untersucht. MyD88 ist ein Signalprotein im angeborenen Immunsystem, das nach TLR und IL-1 Bindung aktiviert wird. Da MyD88-induzierte Signaltransduktion eine Rolle bei akuter UVB-Bestrahlung zukommt, wurde im Folgenden untersucht, welche Funktion MyD88 bei chronischer UVB-Bestrahlung, die extrinsische Hautalterung oder Photoaging induziert, hat. Wir konnten zeigen, dass MyD88-defiziente Mäuse weniger lichtbedingte Veränderungen der Haut nach chronischer UVB-Bestrahlung aufwiesen, als WT Mäuse. Interessanterweise war jedoch der UVB-bedingte DNA-Schaden in MyD88-defizienten Mäusen verstärkt. Untersuchungen an Mauslinien, in denen die Expression von MyD88 in einer einzelnen Zellpopulation wieder hergestellt wurde zeigten, dass neben Makrophagen, dendritischen Zellen und Keratinozyten, vor allem die Expression von MyD88 in Mastzellen zur Hautschädigung bei Photoaging beiträgt. Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α , der ein Zielgen von MyD88 ist, da er nach TLR-Aktivierung stabilisiert wird, reguliert den Zellmetabolismus als Antwort auf Hypoxie oder Entzündungsreaktionen. Mäuse, deren Keratinozyten defizient für HIF-1 α sind (HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$) wurden nach akuter und chronischer UVB-Bestrahlung analysiert. Die Defizienz von HIF-1 α in Keratinozyten führte in beiden Modellen zu einer starken Schädigung der Haut, einhergehend mit erhöhtem transepidermale Wasserungsverlust und vermehrtem Auftreten von DNA-Schäden. Dies weist darauf hin, dass HIF-1 α in der Epidermis schützend vor UVB-vermittelten Schädigungen wirkt. Interessanterweise war die UVB-bedingte Pigmentierungsreaktion, die als schützend vor DNA-Schäden angesehen wird, in HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ Mäusen verstärkt. Da wir zeigen konnten, dass die Defizienz von HIF-1 α zur erhöhten Expression des Arylhydrocarbon Rezeptors (AhR) führt, der als UVB-Sensor gilt, könnte dies ein Hinweis auf den unterliegenden Mechanismus sein. Da der AhRR ein Targetgen des AhR ist und wie der AhR und auch HIF-1 α den Cofaktor Arnt zur DNA-Bindung benutzt, wurde diese Mauslinie in den UVB-Bestrahlungs-Modellen untersucht. Zunächst wurde die Expression des AhRR in von uns generierten AhRR-defizienten Mäusen untersucht. Wir konnten zeigen, dass der AhRR vor allem in Immunzellen der Haut exprimiert wird. Akute Bestrahlung mit UVB führte zu einer leicht verstärkten Entzündungsreaktion der Haut AhRR-defizienter Mäuse. Im Photoaging-Protokoll konnte eine verminderte Pigmentierung der Haut detektiert werden. Da in HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ Tieren eine erhöhte Pigmentierung nachgewiesen werden konnte, und AhR- und HIF-1 α Aktivierung sich beeinflussen können, wird diese Interaktion weiter untersucht. Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass dem angeborenen Immunsystem bei extrinsischer Hautalterung eine Funktion zukommt und dass das AhR/AhRR-System bei Entzündungen eine Rolle spielt.

Allgemeine Angaben

Vorhaben: Funktion des angeborenen Immunsystems bei umweltinduzierter Hautalterung
Nr./Geschäftszeichen: IUF-2012

Antragstellende Leibniz-Einrichtung: IUF Leibniz Institut für umweltmedizinische Forschung, Düsseldorf

Förderlinie: Qualitätssicherung

Ausgangsfragen und Zielsetzung des Vorhabens:

Im Vorhaben sollte die Wechselwirkung des angeborenen Immunsystems mit extrinsischer Hautalterung aufgeschlüsselt werden. Es ist bekannt, dass UVB Strahlung akut eine Entzündung in der Haut auslösen kann, die einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems ähnelt. Im ersten Teil des Vorhabens wollten wir untersuchen, ob UVB Strahlung als steriles Gefahrensignal (DAMP danger associated molecular pattern) wirken kann und ob das angeborene Immunsystem eine Rolle bei UVB-induzierter Hautalterung spielt. Dazu sollten Mäuse, die defizient für den Signaladaptor MyD88, der TLR und IL-1 induzierte Signaltransduktion vermittelt, in einem Mausmodell der Lichtalterung untersucht werden. Weiterführend sollte mit Hilfe von uns generierter konditionaler knock-in Mauslinien die Funktion von MyD88 in einzelnen Zellpopulationen der Haut analysiert werden. Der Transkriptionsfaktors HIF1- α ist ein wichtiges Zielgen von MyD88-induzierter Signaltransduktion, der die metabolische Anpassung von Zellen reguliert. Wir wollten weiterführend analysieren, ob HIF-1 α eine Funktion bei Licht-induzierter Hautalterung zukommt. Da das Immunsystem bei chronologischem Altern nachlässt und so zu erhöhter Infektanfälligkeit führt, sollte im zweiten Teil des Vorhabens untersucht werden, ob die Funktion des angeborenen Immunsystems auch in vorzeitig gealterter Haut verändert ist. Der Transkriptionsfaktor AhR wird durch Photokonversion von Tryptophanderivaten in der Haut durch UVB aktiviert und führt zur Induktion von Entzündungsmediatoren. Im dritten Teil des Vorhabens wollten wir daher analysieren, inwieweit eine verstärkte AhR-Aktivierung in AhRR-defizienten Mäusen zu vorzeitiger Hautalterung beiträgt und ob dies die Funktion des angeborenen Immunsystems in extrinsisch gealterter Haut verändert.

Entwicklung der durchgeführten Arbeiten

Im Teil 1 des Vorhabens sollte analysiert werden ob akute UVB-Bestrahlung von MyD88-abhängigen Signalwegen das angeborene Immunsystem der Haut aktivieren kann und ob diese Aktivierung des angeborenen Immunsystems zur vorzeitigen Hautalterung beiträgt. Wir konnten in Vorarbeiten zeigen, dass MyD88 die Entzündungsreaktion nach akuter UVB-Bestrahlung beeinflusst. Hier wurde nun ein Modell der chronischen UVB-Bestrahlung entwickelt, das extrinsischer Hautalterung beim Menschen ähneln soll, und die Rolle von MyD88 in global MyD88-defizienten Mäusen, sowie in Mauslinien, die exklusiv MyD88 in Makrophagen, dendritischen Zellen (DC) oder Keratinozyten exprimieren, untersucht. Wir konnten nachweisen, dass auch im chronischen Modell das angeborene Immunsystem entscheidend zur Hautalterung beiträgt. Da die UVB- und MyD88-abhängige Akkumulation von Mastzellen weder durch Expression von MyD88 in Keratinozyten, Makrophagen noch in dendritischen Zellen komplett wiederhergestellt wurde, wurde eine Mauslinie, die MyD88 exklusiv in Mastzellen exprimiert, generiert. Wir konnten zeigen, dass vor allem die Expression von MyD88 in Mastzellen zur Ausbildung von extrinsischer Hautalterung beitrug. In weiteren Experimenten wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors und MyD88-Zielgens HIF-1 α bei akuter und chronischer Hautalterung untersucht. Die Defizienz von HIF-1 α in

Keratinocyten führte in beiden Modellen zu einer verstärkten Hautschädigung und zu verstärkte DNA-Schäden nach UVB Bestrahlung. Dies könnte zu vermehrter Tumorbildung führen. Interessanterweise war die Bräunungsreaktion der Haut signifikant verstärkt in Keratinocyten-spezifischen HIF-1 α -defizienten Mäusen. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass HIF1- α defiziente Keratinocyten verstärkt den AhR exprimierten. Diese Interaktion zwischen HIF1- α und dem AhR könnte die verstärkte Bräunungsreaktion erklären und wird von uns weiterverfolgt.

Im Teil 2 sollte analysiert werden, ob die Funktion des angeborenen Immunsystems in vorzeitig gealterter Haut verändert ist. Durch den Umzug der Arbeitsgruppe ans LIMES Institut der Universität Bonn sollten die dafür nötigen Experimente an dem neu zu einrichtenden S2-Bereich des LIMES GRC durchgeführt werden. Da die Anlage erst 2015 genehmigt wurde, konnten diese Experimente bisher noch nicht durchgeführt werden.

Im dritten Teil wurde untersucht, inwieweit verstärkte AhR-Aktivierung in AhRR-defizienten Mäusen zu vorzeitiger Hautalterung beiträgt und ob dies die Funktion des angeborenen Immunsystems in extrinsisch gealterter Haut beeinflusst. Bei diesen Untersuchungen wurde zunächst die Expression und Verteilung von AhRR-exprimierenden Zellen in der Haut grundlegend untersucht, und analysiert ob die Expression des AhRR in allen Zellen abhängig vom AhR war. Dafür wurden, neben unseren neu generierten AhRR-defizienten Mäusen auch AhRxAhRR doppelt defiziente Mäuse generiert. Wir konnten zeigen, dass der AhRR vor allem in Immunzellen stark exprimiert war. Neben dendritischen Zellen exprimierten auch epidermale und dermale invariante $\gamma\delta$ T-Zellen den AhRR. Die Zahl der $\gamma\delta$ T-Zellen war in AhRR-defizienten Tieren stark verringert. Daraufhin wurden die Tiere im akuten und chronischen Modell der UVB-Bestrahlung analysiert. Hier konnte eine leicht verstärkte Entzündungsreaktion, aber auch eine verminderte Bräunungsreaktion der Haut nach UVB-Bestrahlung beobachtet werden. Diese verminderte Pigmentierung wurde auch in AhR-defizienten Mäusen detektiert, und war in AhRxAhRR doppelt defizienten Mäusen noch geringer. Interessanterweise war die Pigmentierung in den HIF-1 α -defizienten Mäusen nach UVB-Bestrahlung stärker. Diese Effekte der Pigmentierung der Haut und die Regulation des AhR/AhRR Systems, und seine Wechselwirkung mit HIF-1 α in der Haut werden zurzeit noch weiter untersucht.

Ergebnisse des Projekts und Diskussion

Im ersten Teil des Vorhabens haben wir analysiert, ob Signalwege des angeborenen Immunsystems die Entzündungsreaktion nach UVB-Strahlung beeinflussen und auch in die Entstehung von Lichtalterung der Haut eingreifen.

In Vorarbeiten konnten wir zeigen, dass MyD88-defiziente Mäuse nach akuter UVB-Bestrahlung eine signifikant geringere Entzündungsreaktion aufwiesen als Wildtyp-Kontrollmäuse. Dies äußerte sich in einer signifikant reduzierten Verdickung der Epidermis, einer reduzierten Infiltrierung der Dermis mit Leukozyten und einer signifikant reduzierten Zytokinproduktion in der Haut. Die UV-bedingte Entzündungsreaktion war vor allem abhängig von der Expression von MyD88 in Makrophagen und Neutrophilen, aber auch die Expression von MyD88 in Keratinozyten war an der Entzündungsreaktion beteiligt (1). Interessanterweise waren DNA-Schaden, gemessen an der Menge der Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) in der Haut nach UVB-Bestrahlung signifikant höher in MyD88-defizienten Mäusen verglichen zu WT Mäusen. Diese Daten zeigen, dass Signalwege des angeborenen Immunsystems die Entzündungsreaktion nach UVB-Bestrahlung steuern, diese Signale aber zusätzlich die DNA-damage response zu inhibieren scheinen. Im Weiteren wurde ein Modell zur chronischen UVB-Bestrahlung der Tiere etabliert, das die Entstehung von extrinsischer Hautalterung nachahmen sollte. Dazu wurden die Tiere über einen Zeitraum von 6 Wochen mit einer niedrigeren UVB-Dosis, verglichen zum akuten Bestrahlungsmodell, aber dennoch ansteigenden Dosen über die Zeit bestrahlt. Das so durchgeführte Bestrahlungsprotokoll führte, im Gegensatz zu akuter Bestrahlung, zu keiner Entzündungsreaktion gemessen am Neutrophilen-Influx in die Dermis und der Produktion inflammatorischer Mediatoren in der Haut. Jedoch waren Anzeichen chronischer Hautreizung/Alterung, wie eine Bräunungsreaktion und das Auftreten verdickter Epidermis (Lichtschwiele) (2-4) nachweisbar. Auch die vermehrte Akkumulation von Mastzellen in der Dermis gilt als Zeichen der Hautalterung (5,6). Ein weiteres Kriterium der Hautalterung ist die Veränderung der extrazellulären Matrix der Dermis, hier insbesondere der Abbau der Kollagenfasern und die Umordnung elastischer Fasern (2-4). Während Mäuse nach chronischer UVB-Bestrahlung deutlich verkürzte und stärker gewundene elastische Fasern in der Dermis zeigten, konnten wir keine signifikanten Unterschiede in der Menge des dermalen Kollagens nachweisen. Hierbei kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Färbemethode nicht ausreichend sensitiv war, um diese Veränderungen zu detektieren, oder es im Mausmodell hier nicht nachgestellt werden konnte. Insgesamt lässt sich festhalten, dass das chronische Bestrahlungsmodell keine akute Entzündung der Haut auslöst, aber mehrere Anzeichen extrinsischer Hautalterung induziert.

In diesem Modell wurden zunächst global MyD88-defiziente Mäuse mit Wildtyp-Tieren verglichen. MyD88-defiziente Mäuse wiesen eine signifikant weniger ausgeprägte Lichtschwiele als Wildtyp-Mäuse auf, ebenso blieb die Akkumulation der Mastzellen in der Dermis aus (**Abb. 1a-c**). Auch war die UVB-bedingte Veränderung der elastischen Fasern in der Dermis MyD88-defizienter Tiere weniger stark ausgeprägt als in WT-Tieren (**Abb. 1d**). Die lichtbedingte Pigmentierung der Haut war dagegen unabhängig von MyD88-induzierter Signaltransduktion (**Abb. 1e**). Interessanterweise wiesen auch in diesem Photoaging-Modell MyD88-defiziente Mäuse höhere CPD-Mengen als WT Mäuse auf (**Abb. 1f,g**). Akute oder subakute UVB-Bestrahlung führt zu einer Reduktion von Langerhanszellen und $\gamma\delta$ T-Zellen aus der Epidermis (7,8) (**Abb. 1h,i**). Wir konnten zeigen, dass in einem Modell der atopischen Dermatitis in Mäusen die Auswanderung der Langerhanszellen abhängig von MyD88 war (9).

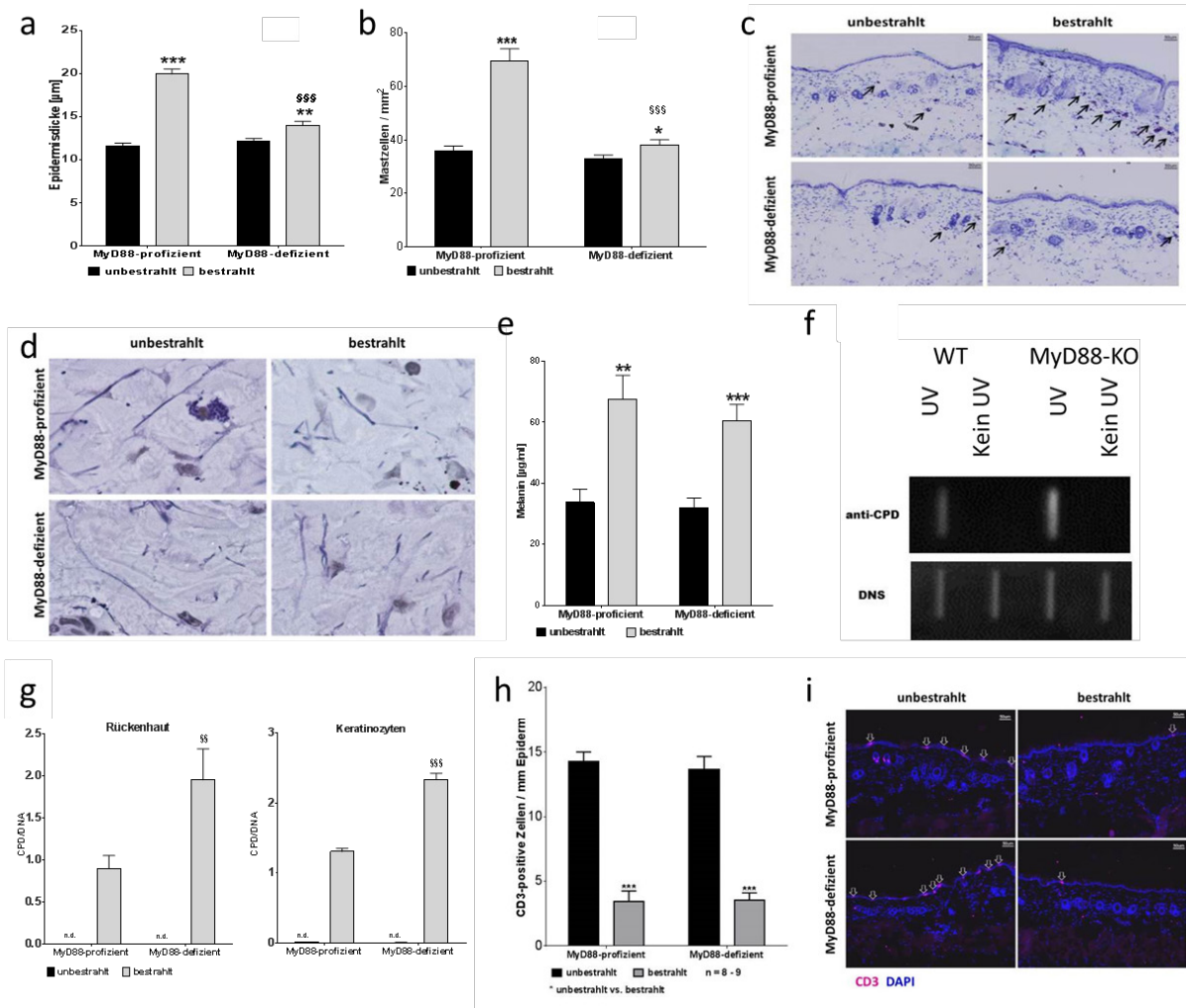


Abbildung 1: Einfluss von MyD88 auf extrinsische Lichtalterung

a) Epidermisdicke, b) Anzahl der Mastzellen in der Epidermis von Mäusen, die 6 Wochen mit UVB bestrahlt worden waren ($n=27-29$). c) repräsentative Abbildung der Haut nach Toluidinblaufärbung zur Detektion der Mastzellen in der Dermis. d) repräsentative Abbildung der Haut zur Detektion der elastischen Fasern in der Dermis, e) Melaningehalt der Haut ($n=10-12$), f) repräsentativer South Western blot zur Detektion von CPD, g) Gehalt an CPD in der Haut ($n=10-12$) und in ex vivo isolierten Keratinocyten ($n=3$) nach UVB-Bestrahlung h) Anzahl CD3 positiver T Zellen in der Epidermis von Mäusen ($n=8-9$), die 6 Wochen mit UVB bestrahlt worden waren. i) repräsentative Abbildung der Haut zur Detektion der T-Zellen in der Epidermis Daten wurden als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * bestrahlt vs unbestrahlt, § MyD88-WT vs MyD88-KO.

Auch im Modell für extrinsische Hautalterung konnte eine geringere Anzahl beider Zelltypen nach 6-wöchiger chronischer Bestrahlung nachgewiesen werden. Jedoch war dies beider Immunzellpopulationen unabhängig von MyD88. Dies könnte an der unterschiedlichen Aktivierung von Zellen im Vergleich zur Aktivierung der Zellen durch Allergene liegen. UVB-Strahlung führt, im Gegensatz zur Aktivierung durch Allergene, auch zur Induktion von Apoptose in Langerhanszellen, könnte es neben einer Auswanderung der Langerhanszellen auch vermehrt zu Zelltod kommen, was auch zum Unterschied zwischen den beiden Modellen beitragen könnte. Interessanterweise konnte eine verstärkte Zellzahl in drainierenden Lymphknoten der WT Mäuse, jedoch nicht in MyD88-defizienten Mäusen, nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass eine leichte Immunreaktion nach chronischer Bestrahlung von der Expression von MyD88 abhängen könnte. Um genauer zu untersuchen, in welchen Zelltypen Signalwege des angeborenen Immunsystems zur Entstehung von extrinsischer Hautalterung beitragen, wurden durch Cre-LoxP-vermittelte Rekombination Mäuse generiert, die MyD88 in einzelnen Zellpopulationen exprimieren, während der Rest des Organismus MyD88-defizient blieb. Dazu wurden Mäuse generiert, die

MyD88 entweder in Makropagen und neutrophilen Granulozyten, (1,10) oder in Keratinozyten (1,9), CCL17-positiven DC oder Mastzellen exprimieren. Um die beiden letztgenannten Linien zu generieren wurden die MyD88^{LSL} Mäuse mit CCL17-Cre Mäusen (11) und Mcpt5-Cre Mäuse (12) gekreuzt und die spezifische Expression von MyD88 in diesen Zellpopulationen nachgewiesen. Alle Mauslinien wurden wie oben beschrieben im Modell der chronischen Hautalterung bestrahlt und analysiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass MyD88-Expression in einzelnen Zellpopulationen einen unterschiedlichen Effekt auf die Entstehung von extrinsischer Hautalterung hatte. (**Abb. 2 und Tabelle1**).

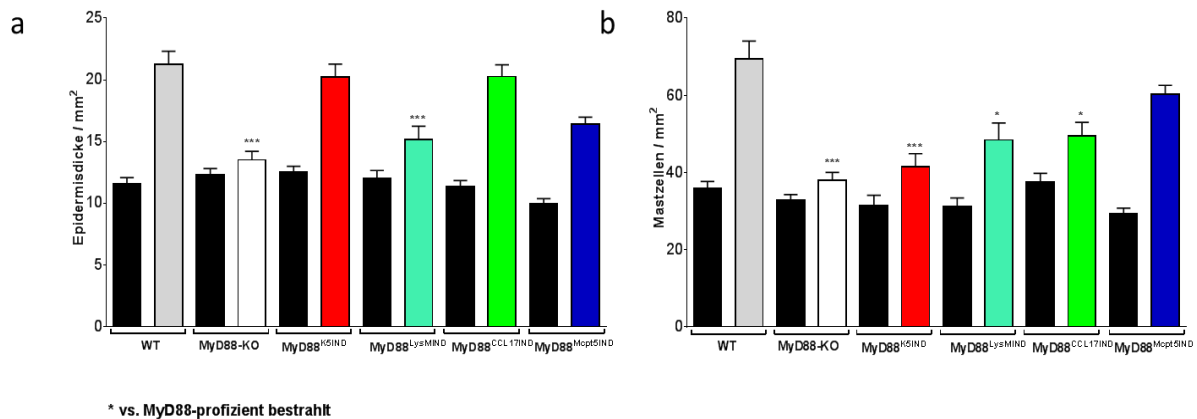


Abbildung 2: Einfluss von MyD88-Defizienz und Reexpression in einzelnen Zellpopulationen auf Epidermisdicke und Mastzell-Akkumulation nach chronischer UVB-Bestrahlung

a) Analyse der Epidermisdicke und b) Anzahl der Mastzellen in WT Mäusen, MyD88-defizienten Mäusen, und Mäusen, die MyD88 nur in Makrophagen, Keratinozyten, CCL17-positiven DC oder Mastzellen aufwiesen. Die Tiere wurden nicht bestrahlt (schwarze Balken) oder 6 Wochen mit UVB-bestrahlt (bunte Balken) n= 8-15, Daten wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.

	MyD88 ^{LysMIND}	MyD88 ^{K5IND}	MyD88 ^{CCL17IND}	MyD88 ^{Mcpt5IND}
Erhöhter CPD Gehalt	-	+	-	+
Verdickung der Epidermis	-	+	+	+
Mastzell-Akkumulation	+/-	-	+/-	+

Tabelle 1: Einfluss der Reexpression von MyD88 in Makrophagen, Keratinozyten, CCL17-positiven DC und Mastzellen auf die MyD88-abhängigen Veränderungen nach chronischer UVB-Bestrahlung im Mausmodell.

Die Expression von MyD88 in Keratinozyten trägt zur Ausbildung der Lichtschwiele bei. Dieses Ergebnis ist gut erklärbar, da in diesem Mausmodell MyD88 in den basalen Keratinozyten exprimiert wird und diese nach UVB-Bestrahlung proliferieren. Wir konnten nachweisen, dass dies abhängig von Signalwegen des angeborenen Immunsystems war. Interessanterweise steht dies wieder im Gegensatz zur Proliferation von Keratinozyten nach epikutaner Applikation von Allergenen. Hier war die Expression von MyD88 in basalen Keratinozyten allein nicht ausreichend, um Keratinozytenproliferation auszulösen (9). Die Expression von MyD88 in CCL17-positiven DC, dies sind in der Haut die Langerhanszellen der Epidermis, trägt ebenfalls zur Induktion der Lichtschwiele bei. In unserem Allergiemodell konnten wir zeigen, dass Keratinozyten MyD88-abhängig Langerhanszellen aktivieren, im UVB-Modell scheinen auch die Langerhanszellen Keratinozyten aktivieren zu können. Da in der bestrahlten Haut keine Entzündungsmediatoren wie beispielsweise GM-CSF oder IL-6 nachgewiesen werden konnten, muss der Kontakt über andere Mediatoren vermittelt sein. Eine Möglichkeit wäre, dass CCL17, das von LC produziert wird, die Expression von

Aquaporin 3 in Keratinozyten induziert und so die Keratinozytenproliferation verstärkt (13). Außerdem ist beschrieben, dass Langerhanszellen lokal über die Aktivierung von „innate lymphoid cells“ (ILC) die Keratinozytenproliferation und damit Tumorwachstum steuern (14). Die Expression von MyD88 in Makrophagen hingegen, spielte bei der Keratinozytenproliferation keine Rolle. Die Akkumulation von Mastzellen nach chronischer UVB-Bestrahlung konnte durch Expression von MyD88 in DC, und auch in Mäusen, die MyD88 in Makrophagen und Neutrophilen, sowie in Keratinozyten, exprimierten, im Vergleich zu WT Mäusen nur bedingt wiederhergestellt werden. Um herauszufinden, ob dies ein Mastzell-intrinsischer Effekt sein könnte, wurden Mäuse generiert, die MyD88 exklusiv in Mastzellen exprimieren. Hier konnten wir nachweisen, dass die Anzahl der dermalen Mastzellen in dieser Mauslinie komplett der der WT-Mäuse entsprach. Zell-intrinsische MyD88-Signaltransduktion scheint demnach für die UVB-bedingte Mastozytose verantwortlich zu sein. Um herauszufinden, ob Mastzellen MyD88-abhängig proliferieren oder migrieren können, werden zurzeit Mastzellen *in vitro* generiert und untersucht. Interessanterweise war MyD88-Signaltransduktion in Mastzellen auch an der Ausprägung der Lichtschwiele beteiligt, so dass auch Signale der Mastzellen die Proliferation von Keratinozyten zu regulieren scheinen. In weiteren Arbeiten muss untersucht werden, welche Signale des angeborenen Immunsystems in Mastzellen extrinsische Hautalterung beeinflussen.

Interessanterweise führte die Defizienz von MyD88 zu einer verstärkten DNA-Schädigung *in vivo*. Keratinozyten der Epidermis sind die ersten Zellen, die akut mit UVB in Kontakt kommen. Auch *ex vivo* kultivierte murine Keratinozyten aus MyD88-defizienten Mäusen wiesen höhere CPD-Werte auf. Im *In-vivo*-Modell führte die Expression von MyD88 in Makrophagen, dendritischen Zellen und Mastzellen wieder zu einer Verminderung der CPD-Werte, die ein Level, wie es in WT Mäusen nachweisbar war, erreichte. Es scheint, als würden Zellen des Immunsystems Faktoren sezernieren, die vor verstärkten DNA-Schäden schützen. Es ist beschrieben, dass Zytokine, wie IL-12 oder IL-18 vor UVB-induzierten DNA-Schäden schützen (15-17). Da diese Mediatoren von Immunzellen wie Makrophagen, DC und auch Mastzellen produziert werden, wäre dies ein denkbarer Mechanismus. Wir konnten jedoch weder IL-12 noch IL-18 in der bestrahlten Maushaut nachweisen. Ebenso konnten wir keine verstärkte Produktion von IL-12 in UVB-bestrahlten knochenmarksabgeleiteten DC detektieren, so dass hier weitere Untersuchungen durchgeführt werden müssen. Interessanterweise führt die alleinige Expression von MyD88 in Keratinozyten zu noch stärkeren DNA-Schäden. Dies könnte daran liegen, dass der Schutz gegen zu starken DNA-Schaden durch MyD88 in Immunzellen vermittelt wird. Im Falle dieser Mauslinie fehlt dieser Schutzmechanismus, gleichzeitig könnte die verstärkte Proliferation der Keratinozyten aber zu stärkerer Anfälligkeit gegenüber DNA-Schäden führen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass MyD88 neben der Entzündungsreaktion nach akuter UVB-Bestrahlung auch die entzündungs-unabhängigen Hautveränderungen in chronisch bestrahlten Mäusen reguliert. Interessanterweise spielt hier die MyD88-abhängige Signaltransduktion in Mastzellen eine prominente Rolle. Außerdem konnten wir nachweisen, dass MyD88-abhängige Signaltransduktion zusätzlich die Schädigung der DNA nach UVB-Bestrahlung beeinflusst.

In weiteren Arbeiten wurde die Funktion des Transkriptionsfaktors HIF-1 α , der ein TLR- und MyD88-Zielgen ist, im Modell der akuten Bestrahlung mit UVB und bei Hautalterung untersucht. HIF-1 α reguliert die Anpassung von Zellen an veränderte metabolische Bedingungen, insbesondere Hypoxie, die physiologisch oder pathologisch bedingt sein kann. HIF-1 α wird auch bei Entzündungen oder in Tumoren stabilisiert. In der Haut ist HIF-1 α konstitutiv in Immunzellen, Endothelzellen, aber auch in basalen Keratinozyten exprimiert. HIF-1 α -Expression in Keratinozyten hat eine Funktion bei Hautinfektionen und Wundheilung (18,19). Außerdem zeigen *in vitro*-Experimente einen Einfluss von HIF-1 α auf die DNA-Reparatur nach UVB-Bestrahlung (20). Ausgehend von diesen Untersuchungen untersuchten wir hier Mäuse, die eine Defizienz von HIF-1 α in Keratinozyten (HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$) haben, bei akuter und chronischer UVB-Bestrahlung *in vivo*. Im akuten UVB-Modell zeigten

HIF-1 α^{AKC} -Mäuse eine starke Zerstörung der Epidermis, einhergehend mit einem signifikant verstärkten transepidermale Wassererlust (TEWL) und schwächeren Leukozyteninfiltrat sowie leicht erhöhte initiale DNA-Schäden und verlangsamte Reparatur in der Haut verglichen zu WT-Mäusen (**Abb. 3a-c**). Dies weist darauf hin, dass HIF-1 α in Keratinozyten vor einer Hautschädigung durch UVB-Strahlung schützt, vergleichbar mit dem Schutz vor Entzündungen (18,19). Verstärkte DNA-Schäden, sowie eine HIF-1 α abhängige Expression von DNA-Reparaturenzymen konnte auch an primären Keratinozyten *in vitro* nachgewiesen werden (**Abb. 3 c,d**).

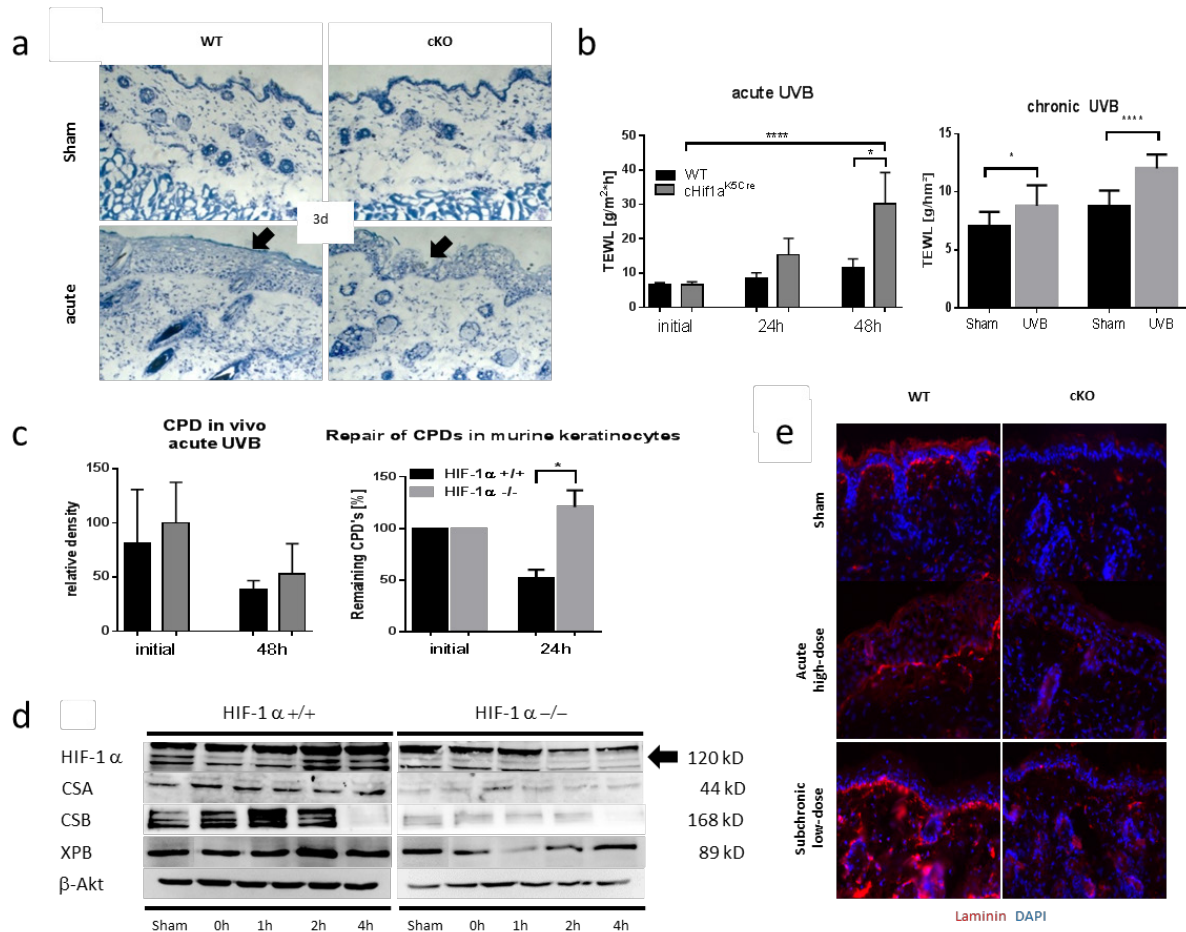


Abbildung 3: Einfluss von HIF-1 α Expression in Keratinozyten auf die Haut nach akuter und chronischer UVB-Bestrahlung

a) repräsentative Abbildung der Hautschädigung nach akuter UVB-Bestrahlung. B) Analyse des TEWL nach akuter und chronischer UVB-Bestrahlung (n=5-15), c) CPD-Gehalt in der Haut und in ex vivo isolierten Keratinozyten (n= 5-10). D) Expression von DNA-Reparaturproteinen in bestrahlten Keratinozyten. S) Expression von Laminin in der Haut nach akuter und chronischer UVB-Bestrahlung. Daten wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.

Auch im chronischen Bestrahlungsmodell war eine verstärkte Schädigung der Haut histologisch, und erhöhter TEWL nachzuweisen (**Abb. 3 b**). Der Einfluss von HIF-1 α auf die Gewebeintegrität korreliert mit reduzierter Lamininexpression in HIF-1 α^{AKC} -Mäusen, was darauf hinweist, dass HIF-1 α einen Einfluss auf die Funktion der Basallamina in der Haut hat (**Abb. 3e**). Dieser als „Aging-Phänotyp“ beschriebene Effekt wurde in naiven Mäusen von Rezvani et al. (18) bereits beobachtet, in unseren Experimenten trat dies jedoch nur nach UVB-Bestrahlung auf. Der Unterschied könnte in unterschiedlichen Haltungsbedingungen und/oder dem Mikrobiom der Tiere begründet sein. Überdies wurde dort der K14-Promotor zur cre-lox-vermittelten Deletion von HIF-1 α verwendet, welcher im Vergleich zum von uns

verwendeten K5 stärker aktiv ist und daher stärkere Effekte haben könnte. In HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäusen könnte die verstärkte DNA-Schädigung, wie auch der verstärkte Gewebeschaden zur Tumorbildung beitragen. In der Tat zeigen chronisch bestrahlte HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen verstärkt histologisch darstellbare Präkanzerosen und erhöhte p53-Spiegel in der Haut, was als Indikator für Tumorigenese gilt (Sondenheimer, Krutmann, unveröffentlichte Daten). Die in diesen Mäusen durchlässigere Basallamina könnte überdies ein invasives Wachstum von epidermalen Tumoren erleichtern.

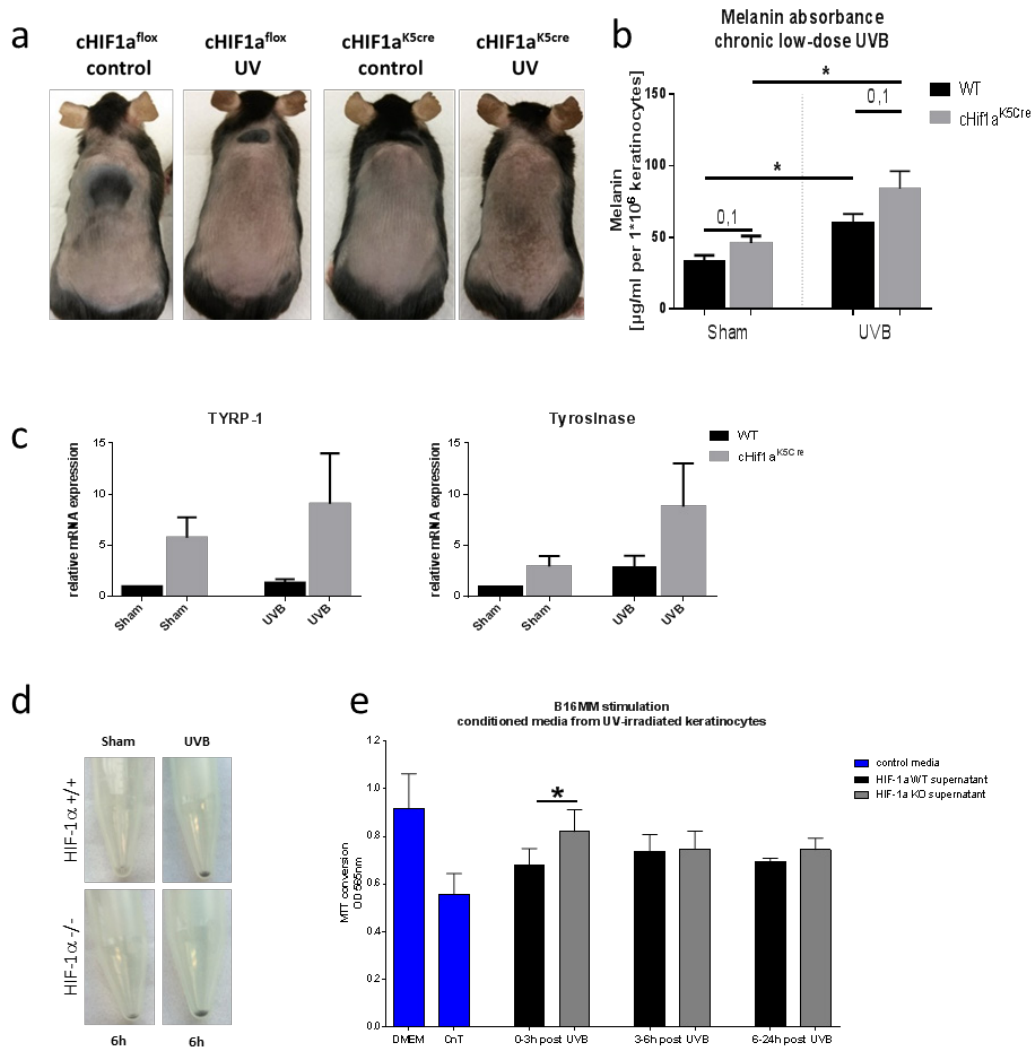


Abbildung 4: Einfluss von HIF-1 α -Expression in Keratinozyten Pigmentierung der Haut nach akuter und chronischer UVB-Bestrahlung

a) repräsentative Abbildung der Pigmentierung der Rückenhaut nach chronischer UVB-Bestrahlung b) Melaningehalt (n=4-10), c) Expression von Tyrp-1 und Tyrosinase in der Haut von chronisch bestrahlten WT und HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäusen (n=6). D) repräsentative Abbildung der Pigmentierung in Melanomzellen *in vitro*, e) Analyse der Pigmentierung in Melanomzellen *in vitro* (n=3). Daten wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.

Diese Daten belegen klar, dass die Expression von HIF-1 α in Keratinozyten vor UVB-induzierten Schädigungen der Haut schützt. Nach chronischer UVB-Bestrahlung zeigten HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäuse eine stark erhöhte Pigmentierung im Vergleich zu WT-Mäusen, was eine Folge der stärkeren UV-Empfindlichkeit sein könnte (**Abb. 4a,b**). Dies korreliert mit erhöhter Tyrosinase-Expression und -Aktivität, sowie mit erhöhter Expression von Tyrp1 in Hautproben und isolierten Keratinozyten (**Abb. 4c**). *In vitro* konnte dieser Effekt durch einen Pigmentierungsassay nachgebildet werden. Dazu wurden primäre Mauskeratinozyten von

WT- sowie HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäusen kultiviert, mit UVB bestrahlt und einige Stunden nach der Bestrahlung der Zellkulturüberstand auf murinen B16 Melanomzellen für mehrere Tage inkubiert. Anschließend wurde die Proliferation/ Viabilität sowie die Tyrosinaseaktivität der so behandelten Melanomzellen dargestellt. Beides war in den Zellen, die mit dem Überstand von bestrahlten HIF-1 α -defizienten Keratinozyten stimuliert worden waren, am stärksten erhöht (**Abb. 4d,e**). Weiterhin wurde eine erhöhte AhR-Expression in HIF-1 α -defizienten Keratinozyten, insbesondere unter Hypoxie gefunden (Daten nicht gezeigt). Da AhR-Aktivierung zu verstärkter Bräunungsreaktion führt (21,22), könnte die erhöhte AhR-Expression bei Defizienz von HIF-1 α die Bräunungsreaktion regulieren. Die Pigmentierung trägt zusammen mit der Lichtschwiele wesentlich zum Schutz vor UVB-induzierten DNA-Schäden bei, da das Melanin in Keratinozyten um Zellkerne eingelagert wird und UVB-Strahlung absorbiert (6,23). Hier konnten wir allerdings zeigen, dass HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäuse trotz erhöhter Bräunungsreaktion stärkere Hautschädigung aufwiesen als WT-Mäuse.

WT-Mäuse hingegen wiesen nach chronischer UVB-Bestrahlung stärker ausgeprägte Hautalterungszeichen wie subkutanen Fettverlust und Faltenbildung auf als HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäuse. HIF-1 α ist in Keratinozyten für die Produktion von VEGF und vielen weiteren Entzündungsmediatoren notwendig, so fanden wir *in vitro* eine starke HIF-1 α -Abhängigkeit der Sekretion von Zytokinen wie TNF und KC, für die bekannt ist, dass sie subkutanen Fettverlust bei der Hautalterung fördern. Weiterhin haben wir die Aktivierung des Immunsystems nach chronischer UV-Bestrahlung analysiert. Wir fanden, dass HIF-1 α in Keratinozyten für die Rekrutierung von Makrophagen in die Dermis notwendig war und dass HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäuse nach chronischer UV-Bestrahlung vermehrte regulatorische T- und B-Zellen in Haut-drainierenden Lymphknoten aufwiesen. Immunsuppression ist ein wichtiger Bestandteil der Lichtalterung, und beide Zelltypen werden mit dem Auftreten von hellem Hautkrebs in Verbindung gebracht. Deswegen werden hier weiterführende Studien zur Aktivität dieser immunsuppressiven Zellpopulationen durchgeführt. UV-induzierte Signalwege, die durch HIF-1 α -Aktivität in Keratinozyten vermittelt werden, fördern somit sterile Entzündungsreaktionen der Haut und damit einhergehende Hautalterungsparameter, schützen dagegen aber u. a. durch Induktion der DNA-Reparatur vor UV-induzierter Kanzerogenese, welche bei HIF-1 $\alpha^{\Delta KC}$ -Mäusen trotz erhöhter Pigmentierung verstärkt auftritt.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass eine Defizienz von HIF-1 α DNA- und Gewebeschäden nach UVB-Bestrahlung fördert und dass diese zu Tumoren führenden Veränderungen trotz einer verstärkten Bräunungsreaktion auftraten.

Im dritten Teil des Vorhabens wurde die Funktion des AhRR bei UVB-induzierten Hautreaktionen untersucht. Der AhR ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, der nicht nur essentiell an der Verstoffwechslung von Chemikalien aus der Umwelt beteiligt ist, sondern auch eine wichtige Funktion im Immunsystem einnimmt. So ist der AhR in vielen Zelltypen der Haut exprimiert (24) und spielt eine Rolle in der Vermittlung entzündlicher Hauterkrankungen, wie Kontakthypersensitivität, atopischer Dermatitis und Psoriasis (25-27) und ist an der Aufrechterhaltung der Hautbarriere (27,28) beteiligt. Ein hoch affiner Ligand des AhR, FICZ, wird licht-abhängig aus Tryptophan in der Haut gebildet (29,30) so dass der AhR als Sensor für Licht gilt. Tatsächlich spielt AhR-abhängige Signaltransduktion eine Rolle bei der Bräunung der Haut (21) und bei UVB-induzierter Apoptose von Keratinozyten *in vitro* (31). Die Aktivität des AhR wird durch den AhRR reguliert, der ein AhR-Zielgen ist und über einen Rückkopplungsmechanismus den AhR inhibiert. Um die genaue Funktion des AhRR untersuchen zu können haben wir AhRR-Reporter und AhRR-KO Mäuse generiert. Dazu wurde eine EGFP-Kassette unter der Kontrolle des AhRR-Promotors exprimiert (32). Diese Mauslinie weist eine erhöhte AhR-Aktivität auf und kann so als Modell für AhR-Aktivierung genutzt werden. Um zu analysieren, welche Funktion der AhRR in der Haut hat, wurde die Expression des AhRR in AhRR-Reporter-Mäusen detailliert untersucht (**Abb5**).

In immun-histologischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der AhRR in Immunzellen der Haut, vor allem den epidermalen Langerhanszellen und

epidermalen $\gamma\delta$ T Zellen, und in der Dermis ebenfalls von DC und $\gamma\delta$ T Zellen stark exprimiert ist (32) und unpublizierte Daten) (**Abb. 5a,b**). Nicht-Immunzellen wie Keratinozyten oder dermale Fibroblasten zeigten eine weitaus schwächere Expression des AhRR auf. Die Expressionsanalyse von AhR-KOxAhRR-Reporter-mäusen zeigte, dass die Expression des AhRR zu weiten Teilen AhR-abhängig war, wie erwartet. Interessanterweise war aber immer noch eine restliche AhRR-Expression nachzuweisen, was darauf hindeutet, dass der AhRR auch durch andere Signalwege gesteuert werden kann. Baba et al. konnten zeigen, dass sich im Promotor des AhRR auch GC-Bereiche und Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B befinden (33).

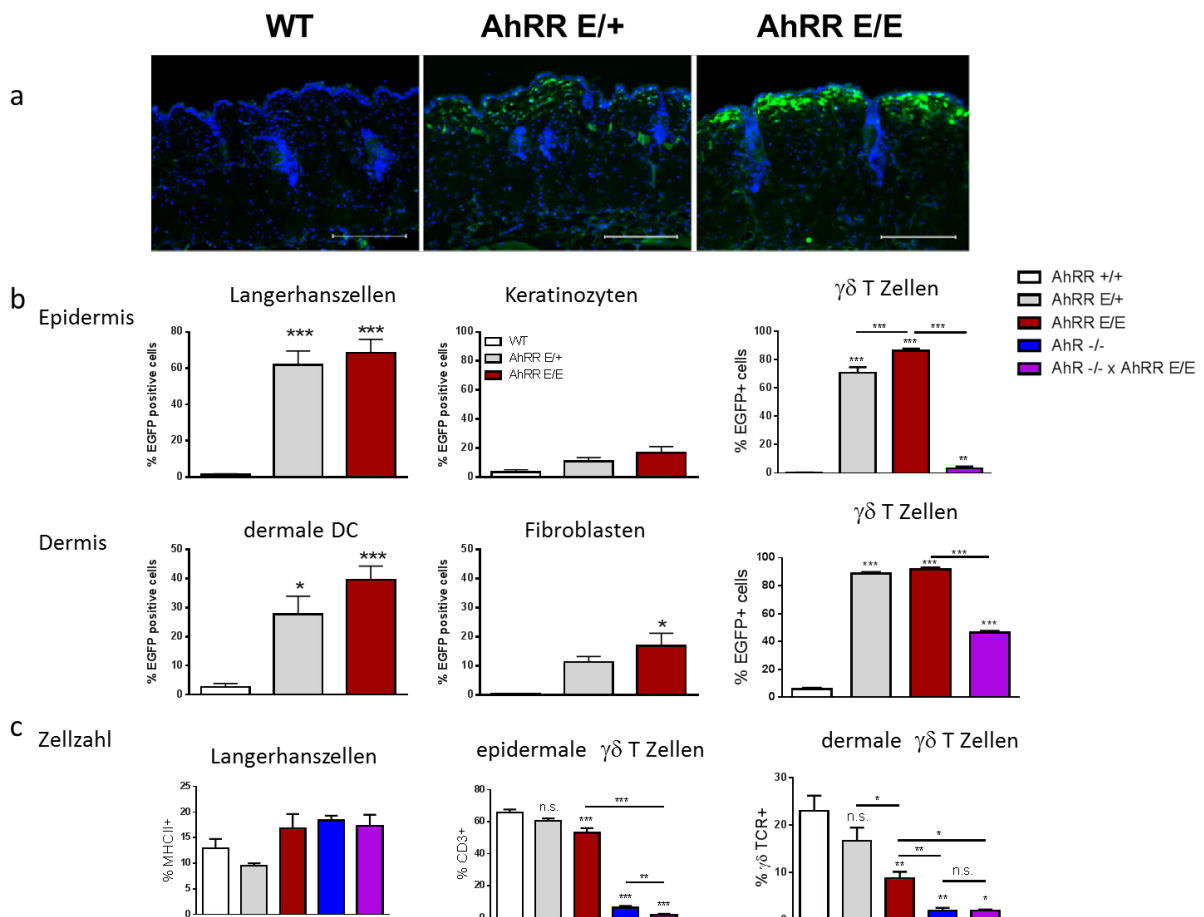


Abbildung 5: Expression des AhR in der Haut

a) repräsentative Abbildung der Expression des AhRR in der Haut b) Analyse der Expression des AhRR in epidermalen und dermalen Zellpopulationen (n=4-8). c) Anzahl von Langerhanszellen, epidermalen und dermalen $\gamma\delta$ T-Zellen in WT, AhRR-defizienten, AhR-defizienten und AhRxAhRR-doppelt defizienten Tieren (n=6-8). Daten wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.

Während die Defizienz des AhRR in Langerhanszellen und dDC die Anzahl dieser Zellen nicht beeinflusste, war die Anzahl der $\gamma\delta$ T Zellen in Epidermis und Dermis verringert. Invariante $\gamma\delta$ T Zellen sind wichtig für die Aufrechterhaltung der Barrierefunktion der Haut und spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung (6,34). Interessanterweise ist die Anzahl der $\gamma\delta$ T Zellen in AhR-defizienten Mäusen auch stark reduziert ((35) und **Abb 5 c**), und auch in AhR-KOxAhRRKO Mäusen war deren Anzahl signifikant verringert. Um die Funktion des AhRR in vivo zu analysieren, wurden AhRR-defiziente Mäuse zunächst im akuten UVB-Modell wie oben beschrieben, untersucht. Die licht-bedingte Verdickung der Epidermis war jedoch in WT und AhRR-KO Mäusen gleichermaßen ausgeprägt. Es konnte jedoch eine leicht verstärkte Entzündungsreaktion in AhRR-defizienten Mäusen beobachtet

werden. Die Expression des Chemokines KC, des Zytokins TSLP, sowie damit korrelierend, eine leicht verstärkte Expression von MPO und ein leicht erhöhter TEWL konnte in AhRR-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Tieren detektiert werden (**Abb 6 a,b**).

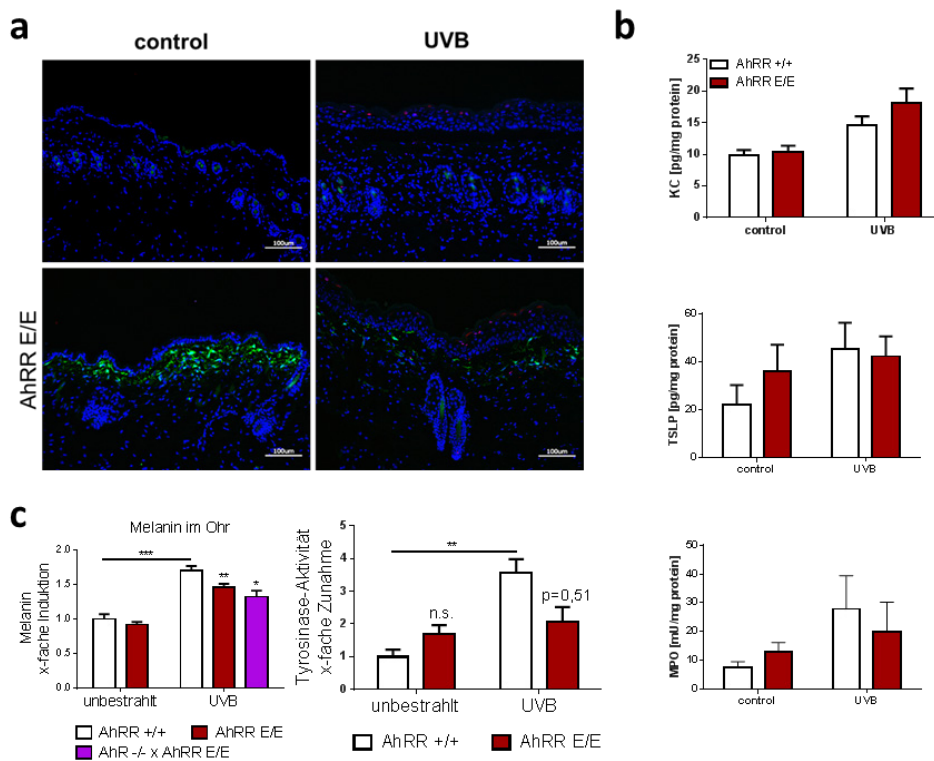


Abbildung 6: Einfluss des AhRR auf UVB-Bestrahlung in vivo

a) repräsentative Abbildung der Expression des AhRR und b) Analyse der Entzündungsreaktion der Haut nach akuter Bestrahlung (n=12-14) c) Melaningehalt, und Tyrosinaseaktivität in der Haut von chronisch bestrahlten WT AhRR-defizienten und AhR-AhRR-doppelt defizienten-Mäusen (n=10-12) Daten wurden als Mittelwert +/- SEM dargestellt.

Im Modell der chronischen UVB-Bestrahlung war ebenfalls die Induktion der Lichtschwiele, die Induktion von CPD und deren Reparatur unverändert, einzig war eine Reduktion der Bräunungsreaktion, einhergehend mit reduzierter Tyrosinaseaktivität *in vivo* und *in vitro*, nachweisbar (**Abb. 6 c**). Unsere Daten zeigen, dass die Bräunung in AhRxAhRR-doppelt defizienten Mäusen noch weiter verringert war, was vermuten lässt, dass hier der AhR und der AhRR möglicherweise auf unterschiedliche Art in die Bräunungsreaktion der Haut eingreifen. Auch vor dem Hintergrund, dass die Defizienz von HIF-1 α in Keratinozyten die AhR-Aktivität und auch die Bräunungsreaktion verstärkt, wollen wir diese Beobachtungen weiterführend untersuchen.

Zusammenfassend konnten wir in diesem Vorhaben zeigen, dass zum einen Signaltransduktion des angeborenen Immunsystems über MyD88 extrinsische Hautalterung steuert, und dass vor allem MyD88-induzierte Signaltransduktion in Mastzellen dazu beisteuert. Während die Defizienz von MyD88 zu reduzierter Hautalterung beiträgt, verstärkt die Defizienz von HIF-1 α in Keratinozyten, einem Transkriptionsfaktor, der unter anderem durch TLR-Signaling stabilisiert wird, die Haut- und DNA-Schaden nach UVB-Bestrahlung. Die Defizienz von HIF-1 α in Keratinozyten verstärkt außerdem die Pigmentierungsreaktion der Haut, während diese in AhR- und auch AhRR-defizienten Mäusen geringer ist. Da der AhR, AhRR und HIF denselben Co-faktor zur DNA-Bindung benötigen, und wir zeigen

konnten, dass die Defizienz von HIF-1 α zur Aufregulation des AhR führte, wollen wir diesen Zusammenhang weiter mechanistisch aufklären.

Referenzen

1. Bald, T., T. Quast, J. Landsberg, M. Rogava, N. Glodde, D. Lopez-Ramos, J. Kohlmeyer, S. Riesenberger, D. Boorn-Konijnenberg, C. Homig-Holzel, R. Reuten, B. Schadow, **H. Weighardt**, D. Wenzel, I. Helfrich, D. Schadendorf, W. Bloch, M. E. Bianchi, C. Lugassy, R. L. Barnhill, M. Koch, B. K. Fleischmann, I. Forster, W. Kastenmuller, W. Kolanus, M. Holzel, E. Gaffal, and T. Tuting. 2014. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* 507: 109-113.
2. El-Domyati, M., S. Attia, F. Saleh, D. Brown, D. E. Birk, F. Gasparro, H. Ahmad, and J. Uitto. 2002. Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp. Dermatol* 11: 398-405.
3. Gilchrist, B. A. 2013. Photoaging. *J. Invest Dermatol* 133: E2-E6.
4. Naylor, E. C., R. E. Watson, and M. J. Sherratt. 2011. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 69: 249-256.
5. Kligman, L. H., and G. F. Murphy. 1996. Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor. *Photochem. Photobiol.* 63: 123-127.
6. Kim, M. S., Y. K. Kim, D. H. Lee, J. E. Seo, K. H. Cho, H. C. Eun, and J. H. Chung. 2009. Acute exposure of human skin to ultraviolet or infrared radiation or heat stimuli increases mast cell numbers and tryptase expression in human skin in vivo. *Br. J. Dermatol* 160: 393-402.
7. Timares, L., S. K. Katiyar, and C. A. Elmets. 2008. DNA damage, apoptosis and langerhans cells--Activators of UV-induced immune tolerance. *Photochem. Photobiol.* 84: 422-436.
8. MacLeod, A. S., R. Rudolph, R. Corriden, I. Ye, O. Garijo, and W. L. Havran. 2014. Skin-resident T cells sense ultraviolet radiation-induced injury and contribute to DNA repair. *J. Immunol.* 192: 5695-5702.
9. Didovic, S., F. V. Opitz, B. Holzmann, I. Forster, and **H. Weighardt**. 2016. Requirement of MyD88 signaling in keratinocytes for Langerhans cell migration and initiation of atopic dermatitis-like symptoms in mice. *Eur. J. Immunol.* 46: 981-992.
10. Gais, P., D. Reim, G. Jusek, T. Rossmann-Bloek, **H. Weighardt**, K. Pfeffer, F. Altmayr, K. P. Janssen, and B. Holzmann. 2012. Cutting edge: Divergent cell-specific functions of MyD88 for inflammatory responses and organ injury in septic peritonitis. *J. Immunol.* 188: 5833-5837.
11. Kohler, T., B. Reizis, R. S. Johnson, **H. Weighardt**, and I. Forster. 2012. Influence of hypoxia-inducible factor 1 α on dendritic cell differentiation and migration. *Eur. J. Immunol.* 42: 1226-1236.
12. Scholten, J., K. Hartmann, A. Gerbaulet, T. Krieg, W. Muller, G. Testa, and A. Roers. 2008. Mast cell-specific Cre/loxP-mediated recombination in vivo. *Transgenic Res.* 17: 307-315.
13. Nakahigashi, K., K. Kabashima, A. Ikoma, A. S. Verkman, Y. Miyachi, and M. Hara-Chikuma. 2011. Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *J. Invest Dermatol* 131: 865-873.
14. Lewis, J. M., C. D. Burgler, M. Freudzon, K. Golubets, J. F. Gibson, R. B. Filler, and M. Girardi. 2015. Langerhans Cells Facilitate UVB-Induced Epidermal Carcinogenesis. *J. Invest Dermatol* 135: 2824-2833.
15. Ahmad, I., E. Simanyi, P. Guroji, I. A. Tamimi, H. J. Delarosa, A. Nagar, P. Nagar, S. K. Katiyar, C. A. Elmets, and N. Yusuf. 2013. Toll-Like Receptor-4 Deficiency Enhances Repair of UVR-Induced Cutaneous DNA Damage by Nucleotide Excision Repair Mechanism. *J. Invest Dermatol.*
16. Schwarz, A., A. Maeda, S. Stander, S. H. van, and T. Schwarz. 2006. IL-18 reduces ultraviolet radiation-induced DNA damage and thereby affects photoimmunosuppression. *J. Immunol.* 176: 2896-2901.
17. Schwarz, A., S. Stander, M. Berneburg, M. Bohm, D. Kulms, S. H. van, K. Grosse-Heitmeyer, J. Krutmann, and T. Schwarz. 2002. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat. Cell Biol.* 4: 26-31.
18. Rezvani, H. R., N. Ali, M. Serrano-Sanchez, P. Dubus, C. Varon, C. Ged, C. Pain, M. Cario-Andre, J. Seneschal, A. Taieb, V. H. de, and F. Mazurier. 2011. Loss of epidermal hypoxia-inducible factor-1 α accelerates epidermal aging and affects re-epithelialization in human and mouse. *J. Cell Sci.* 124: 4172-4183.

19. Peyssonnaud, C., A. T. Boutin, A. S. Zinkernagel, V. Datta, V. Nizet, and R. S. Johnson. 2008. Critical role of HIF-1alpha in keratinocyte defense against bacterial infection. *J. Invest Dermatol.* 128: 1964-1968.
20. Rezvani, H. R., W. Mahfouf, N. Ali, C. Chemin, C. Ged, A. L. Kim, V. H. de, A. Taieb, D. R. Bickers, and F. Mazurier. 2010. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates the expression of nucleotide excision repair proteins in keratinocytes. *Nucleic Acids Res.* 38: 797-809.
21. Jux, B., S. Kadow, S. Luecke, A. Rannug, J. Krutmann, and C. Esser. 2011. The aryl hydrocarbon receptor mediates UVB radiation-induced skin tanning. *J. Invest Dermatol* 131: 203-210.
22. Luecke, S., M. Backlund, B. Jux, C. Esser, J. Krutmann, and A. Rannug. 2010. The aryl hydrocarbon receptor (AHR), a novel regulator of human melanogenesis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23: 828-833.
23. Kollias, N., R. M. Sayre, L. Zeise, and M. R. Chedekel. 1991. Photoprotection by melanin. *J. Photochem. Photobiol. B* 9: 135-160.
24. Esser, C., I. Bargen, **H. Weighardt**, T. Haarmann-Stemmann, and J. Krutmann. 2013. Functions of the aryl hydrocarbon receptor in the skin. *Semin. Immunopathol.*
25. Di Meglio, P., J. H. Duarte, H. Ahlfors, N. D. Owens, Y. Li, F. Villanova, I. Tosi, K. Hirota, F. O. Nestle, U. Mrowietz, M. J. Gilchrist, and B. Stockinger. 2014. Activation of the aryl hydrocarbon receptor dampens the severity of inflammatory skin conditions. *Immunity.* 40: 989-1001.
26. Jux, B., S. Kadow, and C. Esser. 2009. Langerhans cell maturation and contact hypersensitivity are impaired in aryl hydrocarbon receptor-null mice. *J. Immunol.* 182: 6709-6717.
27. van den Bogaard, E. H., J. G. Bergboer, M. Vonk-Bergers, I. M. van Vlijmen-Willems, S. V. Hato, P. G. van der Valk, J. M. Schroder, I. Joosten, P. L. Zeeuwen, and J. Schalkwijk. 2013. Coal tar induces AHR-dependent skin barrier repair in atopic dermatitis. *J. Clin. Invest* 123: 917-927.
28. Haas, K., **H. Weighardt**, R. Deenen, K. Köhrer, B. E. Clausen, S. P. Zahner, P. Boukamp, W. Bloch, J. Krutmann, and C. Esser. 2016. Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity. *Journal of Investigative Dermatology.*
29. Rannug, A., and E. Fritsche. 2006. The aryl hydrocarbon receptor and light. *Biol. Chem.* 387: 1149-1157.
30. Rannug, A., U. Rannug, H. S. Rosenkranz, L. Winqvist, R. Westerholm, E. Agurell, and A. K. Grafstrom. 1987. Certain photooxidized derivatives of tryptophan bind with very high affinity to the Ah receptor and are likely to be endogenous signal substances. *J. Biol. Chem.* 262: 15422-15427.
31. Frauenstein, K., U. Sydlik, J. Tigges, M. Majora, C. Wiek, H. Hanenberg, J. Abel, C. Esser, E. Fritsche, J. Krutmann, and T. Haarmann-Stemmann. 2013. Evidence for a novel anti-apoptotic pathway in human keratinocytes involving the aryl hydrocarbon receptor, E2F1, and checkpoint kinase 1. *Cell Death. Differ.* 20: 1425-1434.
32. Brandstatter, O., O. Schanz, J. Vorac, J. König, T. Mori, T. Maruyama, M. Korkowski, T. Haarmann-Stemmann, von Smolinski D., J. L. Schultze, J. Abel, C. Esser, H. Takeyama, **H. Weighardt**, and I. Forster. 2016. Balancing intestinal and systemic inflammation through cell type-specific expression of the aryl hydrocarbon receptor repressor. *Sci. Rep.* 6: 26091.
33. Baba, T., J. Mimura, K. Gradin, A. Kuroiwa, T. Watanabe, Y. Matsuda, J. Inazawa, K. Sogawa, and Y. Fujii-Kuriyama. 2001. Structure and expression of the Ah receptor repressor gene. *J. Biol. Chem.* 276: 33101-33110.
34. MacLeod, A. S., and W. L. Havran. 2011. Functions of skin-resident gammadelta T cells. *Cell Mol. Life Sci.* 68: 2399-2408.
35. Kadow, S., B. Jux, S. P. Zahner, B. Wingerath, S. Chmill, B. E. Clausen, J. Hengstler, and C. Esser. 2011. Aryl hydrocarbon receptor is critical for homeostasis of invariant gammadelta T cells in the murine epidermis. *J. Immunol* 187: 3104-3110.

Stellungnahme, ob Ergebnisse des Vorhabens wirtschaftlich verwertbar sind und ob eine solche Verwertung erfolgt oder zu erwarten ist; Angaben zu möglichen Patenten oder Industriekooperationen;

Eine wirtschaftliche Verwertung der Ergebnisse ist derzeit nicht vorgesehen.

Angabe der Beiträge von möglichen Kooperationspartnern im In- und Ausland, die zu den Ergebnissen des Vorhabens beigetragen haben;

C. Esser, Düsseldorf, Deutschland: AhR und $\gamma\delta$ T-Zellen, Rolle des AhR bei Aufrechterhaltung der Hautbarriere

J Takeda, Osaka, Japan: K5Cre-Mäuse

A. Roers, Dresden, Deutschland: Mcpt5Cre-Mäuse

J. Matthews, Oslo, Norwegen: Immortalisierung von WT und AhRR-defizienten Fibroblastenlinien

Qualifikationsarbeiten, die im Zusammenhang mit dem Vorhaben entstanden sind;

Opitz, Friederike: Wechselwirkung des angeborenen Immunsystems mit extrinsischer Hautalterung. Dissertation Universität Bonn (Abschluss des Dissertationsverfahrens 2016)

Jäger, Paulina: Funktion des AhRR bei UVB-induzierten Veränderungen der Haut. Dissertation Universität Bonn (Abschluss des Dissertationsverfahrens 2016)

Martens, Marie Christine: 2014: Role of the AhR and AhRR during acute UVB irradiation Bachelorarbeit (B.Sc. LIMES-Institut der Universität Bonn)

Meiser, Philippa: 2015: Contribution of MyD88 signaling to DNA damage after acute and chronic UVB irradiation of the skin. Bachelorarbeit (B.Sc. LIMES-Institut der Universität Bonn)

Liste der Publikationen aus dem Vorhaben;

MacPherson, L., S. Ahmed, L. Tamblyn, J. Krutmann, I. Förster, H. Weighardt, and J. Matthews. 2014. Aryl hydrocarbon receptor repressor and TIPARP (ARTD14) use similar, but also distinct mechanisms to repress aryl hydrocarbon receptor signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 15: 7939-7957.

Brandstatter, O., O. Schanz, J. Vorac, J. König, T. Mori, T. Maruyama, M. Korkowski, T. Haarmann-Stemann, von Smolinski D., J. L. Schultze, J. Abel, C. Esser, H. Takeyama, H. Weighardt*, and I. Förster. 2016*. Balancing intestinal and systemic inflammation through cell type-specific expression of the aryl hydrocarbon receptor repressor. *Sci. Rep.* 6: 26091.
*equal cotribution

Haas, K., H. Weighardt, R. Deenen, K. Köhrer, B. E. Clausen, S. P. Zahner, P. Boukamp, W. Bloch, J. Krutmann, and C. Esser. 2016. Aryl hydrocarbon receptor in keratinocytes is essential for murine skin barrier integrity. *Journal of Investigative Dermatology*. 2016 Jul 16 doi: 10.1016/j.jid.2016.06.627. [Epub ahead of print]

Weitere Manuskripte: Aus dem Vorhaben werden zurzeit die Daten über die Funktion des angeborenen Immunsystems bei extrinsischer Hautalterung und die zur Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1a bei UVB-induzierten Hautschädigungen zu Manuskripten zur Publikation zusammengefasst.

Darstellung der Maßnahmen zur Sicherung und Verfügbarmachung der im Vorhaben produzierten Forschungsdaten;

Entfällt

Liste möglicher Pressemitteilungen und Medienberichte.

Pressemitteilung zu Brandstätter et al. 2016: <https://www.uni-bonn.de/neues/109-2016> Fine-Tuning für die Abwehrzellen im Darm

Allgemeiner, anonymisierter Text für Projekte mit Tierversuchen

Ein zu häufiges Aussetzen der Haut mit UVB-Strahlung kann beim Menschen zu vorzeitiger Hautalterung und Tumorbildung führen. Hautalterung beinhaltet eine Schwächung der Hautbarriere und somit ein erhöhtes Infektionsrisiko. Da ältere Menschen auch ein schwächeres Immunsystem haben, trägt dies auch zu häufigeren Komplikationen einer Hautinfektion bei, besonders in einer Krankenhausumgebung mit Antibiotika-resistenten Keimen. Darüber hinaus reguliert die Haut viele biologische Prozesse im ganzen Körper, die durch die Alterung der Haut beeinflusst werden können. Da eine Exposition mit hohen Dosen von UVB zu Entzündungsreaktionen führt, die einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems ähnelt, wurde im Vorhaben untersucht, ob Signalwege des angeborenen Immunsystems auch bei licht-induzierter Hautalterung beteiligt sind. Wir konnten zeigen, dass Signaltransduktion, wie sie auch bei Infektionen auftritt, die Pathologie der Hautalterung beeinflusst. Außerdem wirkt die Expression eines Transkriptionsfaktors, der metabolische Prozesse im Körper reguliert, schützend vor licht-bedingten Veränderungen der Haut. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass die Aktivierung von Signalwegen, die den Abbau von Umweltchemikalien steuern, die Entzündungsreaktion und die Bräunungsreaktion, die einen natürlichen Schutzes vor Zell- und DNA-Schaden durch UV-Strahlung bietet, reguliert. Da die Lebenserwartung der Bevölkerung stetig steigt, ist die Erforschung von natürlichen und induzierten Alterungsprozessen von großer Bedeutung für die Erhaltung der Lebensqualität älterer Menschen. Mit unseren Untersuchungen erhoffen wir uns Einblicke in die Regulation von Licht-induzierten Alterungsprozessen zu gewinnen, um geeignete Präventions- oder Therapieansätze entwickeln zu können.