

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie  
der Universität zu Köln

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Krieg

**Funktionen von CD95 (Fas) in der Epidermis  
beim allergischen Kontaktekzem und bei der UV-induzierten Dermatitis**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde

Der Hohen Medizinischen Fakultät

Der Universität zu Köln

vorgelegt von

Alina Hedrych-Ozimina

aus Danzig

promoviert am

28. September 2011

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. Dr. phil. I. Haase  
2. Berichterstatterin: Frau Dr. rer. nat. C. Niemann

### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen bzw. Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Privatdozent Dr. med. Dr. phil. I. Haase  
Dipl. Biol. Ruth Pofahl

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Köln, 06.02.2011

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind von mir mit Unterstützung von Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. phil. Ingo Haase und Frau Dipl. Biol. Ruth Pofahl und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Dipl. Biol. Ruth Pofahl, Frau Ing. Biol. Doreen Markur, Frau Semra Frimpong und Frau Biotechn. Renate Knaup durchgeführt worden.

## **Danksagung**

Mein großer Dank für die hilfreiche Unterstützung bei der Erstellung meiner Doktorarbeit geht vor allem an meinen Doktorvater **Privatdozent Dr. med. Dr. phil. Ingo Haase**, der mich als Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe engagiert, das Dissertationsthema überlassen und ständig mit seinem Wissen unterstützt hat.

Hiermit möchte ich mich auch herzlich bei **Frau Dipl. Biol. Ruth Pofahl** bedanken, die mir sehr viel Geduld entgegen brachte und mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen der Arbeit sorgte, als auch das Manuskript sprachlich korrigierte.

Ein besonderer Dank geht aber auch an meine anderen Kollegen aus der AG Haase: **Ing. Biol. Doreen Markur, Frau Semra Frimpong, Frau Biotechn. Renate Knaup, Dr. rer. nat. Athanasios Stratis, Dr. rer. nat. Michael Tschardtke**, die mir mit ihren Erfahrungen immer tatkräftig zur Seite standen.

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an **Frau Dipl. Bibl. Arnhild Kanthack**, Leiterin des Zentrum für Internationale Beziehungen der Medizinischen Fakultät und gleichzeitig eine gute Freundin von mir, richten, die mir das Dissertationsangebot übermittelt und mich vor allem stetig ermuntert hat.

An dieser Stelle danke ich den besten Freund von mir **Dr. med. Michael Sieniawski**, der mich nicht nur tatkräftig unterstützte, sondern mich stets aufbaute und für die erforderliche Abwechslung sorgte.

Auch geht mein Dank an **meine Eltern Irena und Wojciech Hedrych** und an **meinen Mann Maciej Hedrych-Ozimina**, die mich immer bestärkt haben, wenn ich an mir gezweifelt habe. Daher widme ich ihnen diese Arbeit.

**Meinem Mann**

**Meinen Eltern**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>12</b>
-----------------------------------	-----------

### **1. Einleitung**

#### **1.1 Fas-Protein (CD- 95)**

1.1.1 Fas und sein Signalweg.....	13
1.1.2 Die Rolle von Fas im Organismus.....	15
1.1.3 Die Rolle von Fas in der Epidermis.....	16
1.1.4 Epidermis-spezifische Fas-Knock-Out-Mäuse.....	17

#### **1.2 Apoptose**

1.2.1 Begriff der Apoptose.....	19
1.2.2 Signalwege der Apoptose.....	20
1.2.3 Antiapoptotische Mechanismen.....	22
1.2.4 Apoptose von Keratinozyten.....	22
1.2.5 Überlebenswege der Keratinozyten.....	24

#### **1.3 Akute allergische Kontaktdermatitis**

1.3.1 Formenkreis der Ekzemkrankheiten.....	27
1.3.2 Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis.....	27
1.3.3 Makroskopische und mikroskopische Erscheinungen bei akuter allergischer Kontaktdermatitis.....	28
1.3.4 Die Rolle von T-Lymphozyten in allergischer Kontaktdermatitis.....	30
1.3.5 Die Rolle von Fas in allergischer Kontaktdermatitis.....	31

#### **1.4 UV-induzierte Dermatitis**

1.4.1 Pathogenese und Symptome der UV-induzierten Dermatitis.....	33
1.4.2 Apoptose von Keratinozyten bei der UV-induzierten Dermatitis.....	34
1.4.3 Die Rolle von Fas in der UV-induzierten Dermatitis.....	38

<b>1.5 Fragestellung.....</b>	<b>39</b>
-------------------------------	-----------

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1 Materialien**

2.1.1 Versuchstiere.....	41
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	41
2.1.3 Lösungen und Lösungsmittelgemische.....	42
2.1.4 Geräte.....	45

### **2.2 Methoden**

#### **2.2.1 Typisierung der Mäuse**

<b>2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Mausschwanzbiopsien.....</b>	<b>46</b>
--	-----------

<b>2.2.1.2 PCR-Protokolle.....</b>	<b>46</b>
------------------------------------	-----------

2.2.1.2.1 Fas floxed/floxed.....	47
2.2.1.2.2 Fas deleted.....	47
2.2.1.2.3 Keratin 14 Cre.....	47

#### **2.2.2 Nachweis der Epidermis-spezifischen Defizienz von Fas-Protein**

2.2.2.1 Trennung von Epidermis und Dermis.....	48
2.2.2.2 Herstellung von Protein-Proben.....	48
2.2.2.3 Immunoblot zur Detektion von Fas in erwachsenen Mäusen.....	48
2.2.2.4 Beladungskontrolle (Immunoblot gegen Aktin, erwachsene Mäuse).....	49
2.2.2.5 Immunoblot zur Detektion von Fas in neugeborenen Mäusen.....	49
2.2.2.6 Beladungskontrolle (Immunoblot gegen Aktin, neugeborene Mäuse).....	50

## **2.2.3 Analyse des Phänotyps der Epidermis-spezifischen Fas-Knock-Out-Mäusen**

2.2.3.1 Hautpräparate und HE-Färbung.....	50
2.2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung gegen Epidermis-Differenzierungsmarker.....	50

## **2.2.4 Allergische Kontaktdermatitis**

### **2.2.4.1 Sensibilisierung und Auslösung der Reaktion.....51**

2.2.4.1.1 Sensibilisierungsphase.....	51
2.2.4.1.2 Effektorphase.....	51

### **2.2.4.2 Ohrpräparate.....52**

### **2.2.4.3 Bestimmung der Anzahl der apoptotischen Keratinozyten bei allergischer Kontaktdermatitis.....52**

2.2.4.3.1 Immunhistochemische Färbung gegen aktive Caspase-3.....	53
2.2.4.3.2 TUNEL-Fluoreszenzfärbung.....	53

### **2.2.4.4 Bestimmung der Anzahl proliferierender Zellen bei allergischer Kontaktdermatitis.....54**

2.2.4.4.1 Immunfluoreszenzfärbung gegen Ki-67.....	55
2.2.4.4.2 Immunhistochemische Färbung gegen BrdU.....	55

### **2.2.4.5 Expression und Aktivität antiapoptotischer Signale in der Epidermis bei allergischer Kontaktdermatitis**

2.2.4.5.1 Immunfluoreszenzfärbung gegen Bcl-xl.....	56
2.2.4.5.2 Immunfluoreszenzfärbung gegen pAKT.....	57
2.2.4.5.3 Immunfluoreszenzfärbung gegen pERK (Phospho-p44/42MAPK).....	57

## **2.2.5 UVB-induzierte Dermatitis**

2.2.5.1 UVB-Bestrahlung der Mäuse.....	57
2.2.5.2 Hautpräparate.....	58
2.2.5.3 Bestimmung der Zahl von Sonnenbrandzellen (sun burn cells) in der UVB-bestrahlten Haut.....	58

## **2.2.6 Experimente mit kultivierten Keratinozyten**

<b>2.2.6.1 Isolierung der primären murinen Keratinozyten.....</b>	<b>58</b>
---	-----------

### **2.2.6.2 Zellkultur**

2.2.6.2.1 Beschichtung der Schalen.....	59
2.2.6.2.2 Züchtung der 3T3-Fibroblasten.....	59
2.2.6.2.3 Vorbereitung des konditionierten FAD-Mediums.....	59

### **2.2.6.3 Bestimmung der Proliferation von kultivierten Keratinozyten**

2.2.6.3.1 Wachstumskurven.....	60
2.2.6.3.2 BrdU-Färbung der Zellen.....	60

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Nachweis der Epidermis-spezifischen Deletion des Fas-Proteins**

3.1.1. PCR-Analyse.....	62
3.1.2. Western-blot-Analyse.....	63

### **3.2 Spontaner Phänotyp der Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse**

3.2.1 Phänotyp – makroskopisch.....	64
3.2.2 Phänotyp – mikroskopisch.....	65

<b>3.3 Allergische Kontaktdermatitis.....</b>	<b>70</b>
<b>3.3.1 Zunahme der Ohrdicke.....</b>	<b>70</b>
<b>3.3.2 Ausmaß der Keratinozyten-Apoptose bei allergischer Kontaktdermatitis</b>	
3.3.2.1 Anzahl der Caspase-3-positiven Keratinozyten.....	73
3.3.2.2 TUNEL-positive Zellen.....	76
<b>3.3.3 Ausmaß der Keratinozyten-Proliferation bei allergischer Kontaktdermatitis</b>	
3.3.3.1 Anzahl der Ki-67-positiven Keratinozyten.....	77
3.3.3.2 BrdU-positive Zellen.....	79
<b>3.3.4 Expression der Überlebens-assoziierten Proteine in der Epidermis bei allergischer Kontaktdermatitis.....</b>	<b>80</b>
3.3.4.1 Bcl-xl.....	80
3.3.4.2 p-Akt.....	81
3.3.4.3 p-ERK.....	82
<b>3.4 UVB-induzierte Dermatitis</b>	
3.4.1 Anzahl der Sonnenbrandzellen (sun burn cells).....	83
<b>3.5 Bestimmung des Wachstumspotentials der kultivierten Keratinozyten</b>	
3.5.1 Wachstumskurven.....	85
3.5.2 BrdU-Färbung der Zellen.....	87
<b>4. Diskussion</b>	
<b>4.1 Epidermis-spezifische Deletion von Fas.....</b>	<b>89</b>

## **4.2 Phänotyp der Epidermis-spezifischen Fas-Knock-Out-Mäuse**

4.2.1 Phänotyp – makroskopisch.....	90
4.2.2 Phänotyp – mikroskopisch.....	90

## **4.3 Allergische Kontaktdermatitis**

4.3.1 Anstieg der Ohrdicke.....	91
4.3.2 Ausmaß der Keratinozyten-Apoptose bei allergischer Kontaktdermatitis.....	92
4.3.3 Ausmaß der Keratinozyten-Proliferation bei allergischer Kontaktdermatitis.....	95
4.3.4 Expression der Überlebens-assoziierten Proteine in der Epidermis bei allergischer Kontaktdermatitis.....	95

## **4.4 UVB-induzierte Dermatitis**

4.4.1 Anzahl der Sonnenbrandzellen.....	96
---	----

## **4.5 Bestimmung des Wachstums von kultivierten Keratinozyten.....97**

## **4.6 Beantwortung der Fragestellungen.....98**

## **Zusammenfassung.....100**

## **Literaturverzeichnis.....101**

## **Vorabveröffentlichung.....116**

## **Lebenslauf.....125**

## **Abkürzungsverzeichnis – Liste der wichtigsten Abkürzungen**

Abb. – Abbildung

Apo – engl. Apoptosis receptor, Apoptose-Rezeptor

BrdU - Bromdesoxyuridin

BSA – engl. Bovine Serum Albumine, Rindersärumalbumin

bp – engl. base pairs, Basenpaare

ct – engl. control, Kontrolle

DAPI - 4',6-di-Amidin-2-phenylindoldihydrochlorid

DNA – engl. Deoxynucleotidic acid, Desoxynukleotidsäure

DR – engl. Death Receptor, Todrezeptor

EDTA – engl. Ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiaminessigsäure

FasL – Fas-Ligand

FGB - Fischhaut-Gelatine-Puffer

fl - floxed

HE – Hematoxylin-Eosin

KD – Kontaktdermatitis

KO – Knock-out

NK – engl. Natural Killer

p-Akt – phosphorylierte Akt-Kinase

PBS – engl. Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Salzlösung

p-ERK - phosphorylierte ER-Kinase (engl. extracellular signal-regulated kinases)

PFA – Paraformaldehyd

PMSF – Phenylmethylsulfonylfluorid

ROS – engl. Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffverbindungen

rpm – engl. round per minute, Umdrehungen pro Minute

RT – Raumtemperatur

SDS - Sodiumdodecylsulfat

Sek. – Sekunde/n

SSC – engl. Standard Saline Citrate

St. – Stunde/n

TBS – engl. Tris Buffered Saline

TBST - engl. Tris Buffered Saline/0.1% Tween 20

TNF – engl. Tumor Necrosis Factor

WT - Wildtyp

## 1. Einleitung

### 1.1 Fas-Protein (CD- 95)

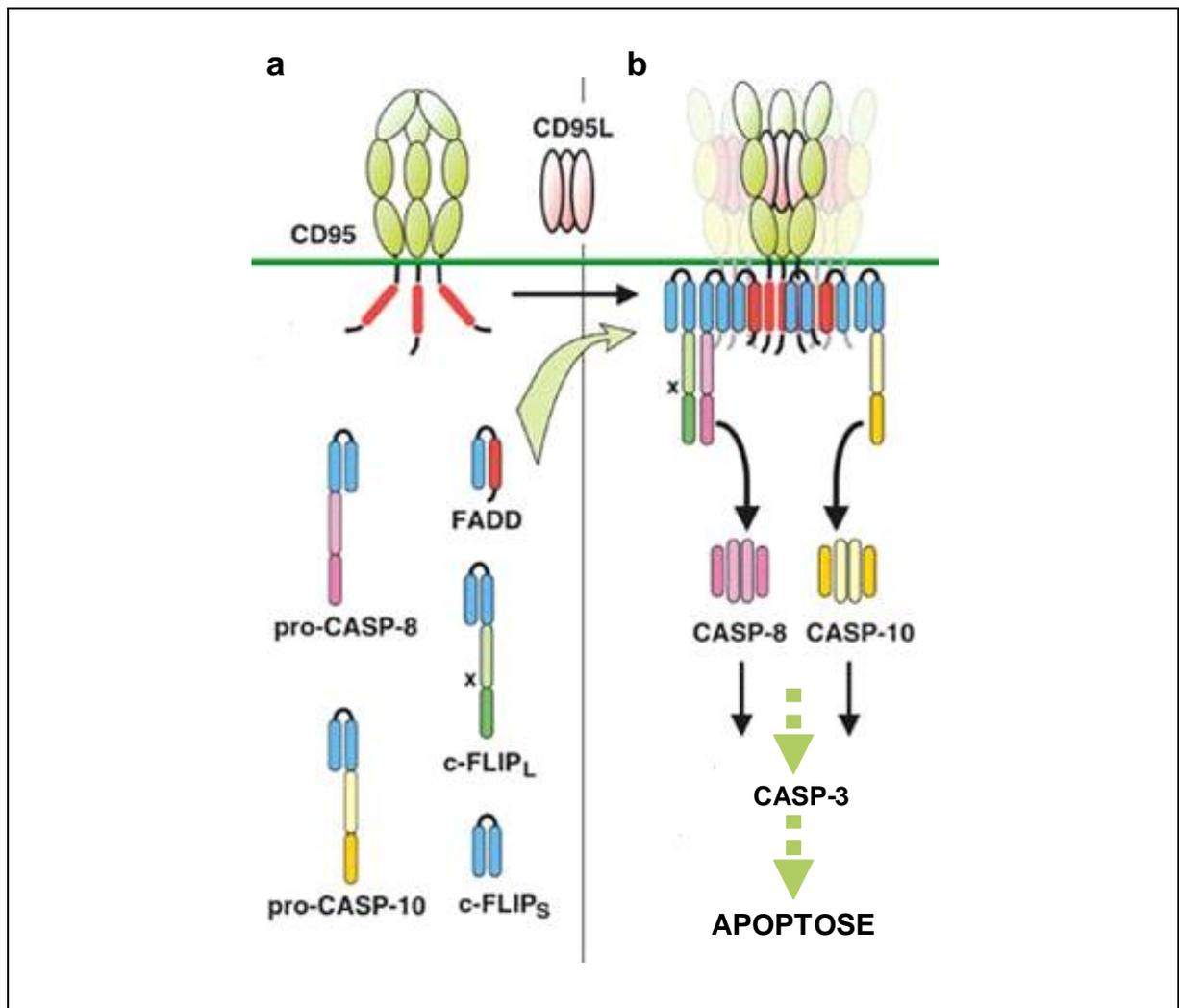
#### 1.1.1 Fas und sein Signalweg

Fas ist ein 45kDa-schweres Protein und gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren, die sich durch extrazelluläre, Cystein-reiche Domänen und intrazelluläre, Signal-vermittelnde Todesdomänen (engl. death domains) auszeichnen. Zu dieser Gruppe gehören auch: TNFR 1/DR 1, DR 3/Apo-3, TRAILR 1/DR 4/Apo-2, TRAILR 2/DR 5 und DR 6 [45, 16].

Fas wird auch CD-95 oder Apo-1, seltener DR 2 genannt. Es wird auf der Zelloberfläche als prä-assoziertes Homotrimer exprimiert. Der natürlich vorkommende Fas-Ligand (FasL) tritt in zwei Formen auf: auf der Zelloberfläche und als freies Molekül. Die Verbindung des Rezeptors mit seinem Liganden (FasL) oder einem aktivierenden Antikörper führt zu Trimerisierung des Rezeptors und Bildung eines Protein-Aggregats, das DISC (engl. death-inducing signalling complex) genannt wird.

Der Aufbau des DISC beginnt durch Interaktionen der Todesdomänen (engl. death domains) von aktivem Fas mit den intrazellulären Proteinen FADD (engl. Fas-associated death domain containing protein) und MORT 1 (engl. mediator of receptor-induced cytotoxicity 1). Als Folge kommt es zur Bindung der sog. Todes-Effektordomänen (engl. death effector domains) von FADD an die Procaspasen: 8 und 10. An der Bildung des DISC nimmt auch das Regulator-Protein c-FLIP (engl. cellular FLICE-like inhibitory protein) teil, das in bestimmten Fällen Apoptose blockieren kann. Mit der folgenden Umwandlung der Procaspase-8 in Caspase-8 und Procaspase-10 in Caspase-10 beginnt eine Kaskade der Interaktionen multipler Proteine. In der Folge wird Caspase-3 aktiviert und führt zur Apoptose der Zelle [87], (Abb.1.1).

Trotz seines Namens ist FADD für die Fas-induzierte Apoptose nicht spezifisch, sondern kann auch durch einen anderen proapoptotisch wirksamen Rezeptor, TNFR, engagiert werden und führt dann zur Apoptose nach dem gleichen Signalmuster. Die dominant-negative Version von FADD blockiert sowohl Fas-, als auch TNFR-vermittelte Apoptose [126, 20].



**Abb. 1.1** Signalweg von Fas; a – Hauptmoleküle: CD95 (Fas), CD95L (Fas-Ligand), pro-CASP-8 (Procaspase-8), pro-CASP-10 (Procaspase-10), c-FLIP<sub>L</sub> und c-FLIP<sub>S</sub> (FLIP-Homologe); b – Bildung von DISC, Aktivierung der Caspasen-8 und -10.

[nach Peter M.E., Krammer P.H.: *The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond*, *Cell Death Differ.* 10, 26-35 (2003), modifiziert]

Das Protein FLAME-1 (engl. FADD-like anti-apoptotic molecule 1) enthält das FDH-Fragment (engl. FAD-DED homology), das Homologien zur Todes-Effektordomäne aufweist. Es interagiert sowohl mit Caspasen-8 und -10, als auch FADD und blockiert die FAS- und TNFR1-vermittelte Apoptose [109].

### 1.1.2 Die Rolle von Fas im Organismus

Fas ist reichlich in verschiedenen Geweben und Organen vorhanden, wo es unterschiedliche biologische Rollen spielt. Die Anwesenheit von Fas wurde vorwiegend in Thymus, Leber, Lunge, Herz, Darm und Haut nachgewiesen, während Fas-Ligand hauptsächlich von T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird, aber auch in immunprivilegierten Stellen wie Hoden oder Gebärmutter [32, 75, 117, 37].

Fas spielt eine wichtige Rolle während der Embryogenese, z.B. in den sich entwickelnden Extremitäten, im Atmungssystem, Nervensystem und im Thymus. Es ist erwiesen, dass dieses Protein auch an der Regulation des Zellumsatzes in sich regenerierenden Geweben wie z.B. Darm- oder Bronchienepithel beteiligt ist.

Fas ist besonders wichtig bei der Elimination von selbstreaktiven und unnötigen aktivierten Lymphozyten und UV-induzierter Immunsuppression, als auch bei der Aufrechterhaltung des Immunprivilegs in Auge, Gehirn, Hoden und Gebärmutter [24, 46, 104]. Das Immunprivileg in diesen Organen besteht in einer hohen Expression von FasL, was eine rasche Elimination von eindringenden Fas-positiven Entzündungszellen ermöglicht. Auge und Gehirn werden dadurch vor Ausbreitung einer Entzündung geschützt. Im Hoden und Gebärmutter spielt das Phänomen eine große Rolle bei der Erhaltung genetisch unterschiedlicher Zellen wie Spermien oder Zellen eines Embryos, die eine Immunantwort im Wirtorganismus verursachen können [24, 13, 36, 78, 28]. FasL-vermittelte Apoptose gehört neben dem Perforin/ Granzym-Weg, zu den zwei Hauptwegen der Zytotoxizität, die durch CD8-positive T-Lymphozyten und NK-Zellen vermittelt wird [51, 117, 116].

Menschen, die Mutationen des Fas-Gens tragen, sind an chronischer pseudomaligner Immunproliferation (Canale-Smith-Syndrom, engl. ALPS - autoimmune lymphoproliferative syndrome) erkrankt - eine Erkrankung, die mit chronischer Lymphadenopathie, Splenomegalie und Autoimmunphänomenen einhergeht [75, 24, 76, 30, 96]. Die *lpr*-Mäuse (engl. *lpr* - lymphoproliferation), bei welchen eine natürliche funktionell inaktivierende Fas-Mutation vorhanden ist, leiden unter einer schweren lymphoproliferativen Krankheit mit Akkumulation von abnormalen T-Lymphozyten, Hypergammaglobulinämie und auch Splenomegalie [75]. Die Erkrankung ist auch in einzelnen Aspekten dem *Lupus erythromatosus* (LE) bei Menschen ähnlich [33, 75, 79, 122]. Nach Furukawa wurden folgende Symptome des LE festgestellt: Autoimmunität, sog. Lupus-Nephritis und typische Hautveränderungen mit Immunglobulin-Ablagerungen

in der dermo-epidermalen Junktionszone [33]. Der Mechanismus oben genannter Störungen besteht in der fehlenden Elimination von selbstreaktiven Lymphozyten [124]. Eine ähnliche Störung entsteht auch bei den natürlichen FasL-Mutanten - *gld*-Mäusen (engl. *gld* - generalized lymphoproliferative disease) und bei den durch genetische Modifikation entstandenen Fas-Null-Mäusen [75].

Obwohl der Verlust der Fas-Funktionen zur Lymphozytose führt, verursacht die Blockade des Fas-Signalwegs durch das CD95-Fc-Fusionsmolekül eine verminderte Proliferationsrate von stimulierten T-Zellen. Außerdem zeigen T-Zellen in FADD-defizienten Mäusen einen Defekt in der Proliferation [87, 4, 77, 129]. Das heißt, dass Fas wahrscheinlich auch eine Rolle bei der Regulierung der Proliferation - und nicht nur der Apoptose von T-Zellen spielt.

Fas/Fas-Ligand-Interaktionen scheinen bei vielen pathologischen Prozessen bedeutsam zu sein z.B. bei *Helicobacter pylori*-induzierter Gastritis, AIDS, Virus-induzierter Hepatitis, Thyreoiditis vom Hashimoto-Typ und verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen [91, 24].

### **1.1.3 Die Rolle von Fas in der Epidermis**

Die natürliche Rolle von Fas in der Epidermis ist bis jetzt unklar. Menschen und Mäuse mit Fas-Mutation zeigen keine Störungen in der Hautentwicklung und epidermaler Differenzierung, was darauf hinweist, dass Fas für die Entwicklung und Homöostase der Haut nicht gebraucht wird [32, 126].

Die gesunde Epidermis zeigt eine sehr schwach ausgeprägte gleichzeitige Fas- und FasL-Expression. Trotz dieser Koexpression von dem Rezeptor und seinem Liganden findet in der gesunden Haut kaum Apoptose statt. Kultivierte Keratinozyten exprimieren sowohl Fas-Protein, als auch Fas- Ligand [45, 101, 102, 83, 124, 84, 126, 29, 65, 119]. Trotzdem sind normale Keratinozyten gegen Fas-induzierte Apoptose relativ unempfindlich, wahrscheinlich weil die Basisexpression von Fas zu niedrig ist [118, 71, 124, 9, 126]. IFN- $\gamma$  erhöht die Fas-Expression in Keratinozyten und ermöglicht vermutlich dadurch Fas-vermittelte Apoptose [118, 102, 71, 112].

Einige Studien über die Funktion von Fas in epidermalen Keratinozyten kommen zu der Auffassung, dass Fas für die Beseitigung von durch UV-Licht geschädigten Keratinozyten verantwortlich ist [45, 101, 126].

Fas-vermittelte Apoptose von Keratinozyten scheint auch eine Rolle in der Entwicklung von Hautkrankheiten zu spielen. Eine verstärkte Expression von Fas in Keratinozyten wurde bei den Erkrankungen: *Erythema multiforme*, *Herpes zoster*, *Lupus erythromatosus*, *Lichen planus*, *Pemphigus vulgaris*, Bullöses Pemphigoid, T-Zell-Leukämie/Lymphom, atopische Dermatitis und Kontaktdermatitis beobachtet [118, 71, 102, 124]. In diesen Fällen wird Keratinozyten-Apoptose mit hoher Wahrscheinlichkeit durch zytotoxische T-Lymphozyten hervorgerufen [29, 71, 116, 124, 9, 126].

Fas-Ligand und TNF- $\alpha$  spielen möglicherweise dadurch eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der toxischen epidermalen Nekrolyse (TEN) und der GVHD-Krankheit (engl. graft-versus-host disease), dass sie Keratinozyten-Apoptose hervorrufen. Eine Immuntherapie, die spezifisch FasL und TNF- $\alpha$  blockiert wird hierfür als therapeutischer Ansatz diskutiert [106, 91, 116, 124].

FasL in Keratinozyten wurde mit der Apoptose von T-Lymphozyten bei UV-induzierter Immunsuppression und bei der Fototherapie entzündlicher Hautkrankheiten wie z.B. Psoriasis in Verbindung gebracht [124, 116, 46, 104, 62, 85, 32]. Der Mechanismus ist ähnlich wie im Immunprivileg (s. Kapitel 1.1.2).

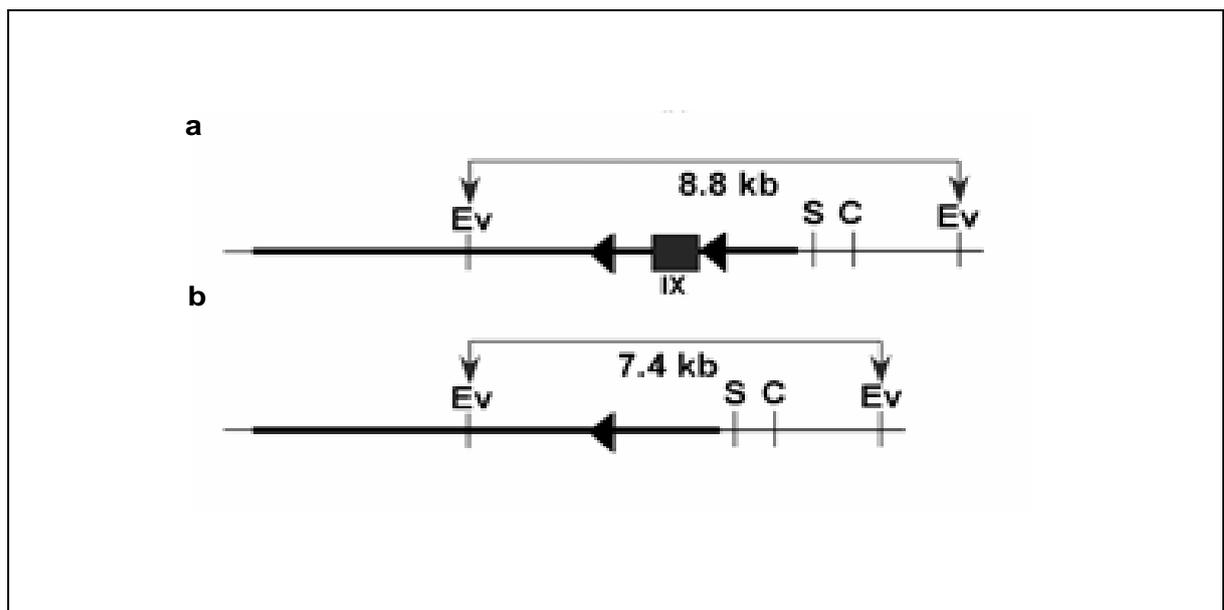
Auch bei der Entstehung semimaligner und maligner Tumoren der Haut spielt das Fas/FasL-System möglicherweise eine Rolle. Die Expression von FasL ist in Papillomen und Spindelzellkarzinom der Haut vermindert [39, 84]. Ebenso ist Fas in Basaliomen komplett abwesend und in Spindelzellkarzinomen herabreguliert [29]. Basalzellkarzinomzellen exprimieren FasL und kein Fas, weswegen sie wahrscheinlich Fas-positive T-Zellen vernichten können und gegenüber Fas-induzierter Apoptose resistent sind, was die Tumorentwicklung erleichtert [116].

#### **1.1.4 Epidermis-spezifische Fas-Knock-out-Mäuse**

Der Begriff „Knock-out“ bedeutet eine genetische Modifikation, die ein Gen ausschaltet, d.h. dass das jeweilige Genprodukt nicht exprimiert wird oder, bei einem „funktionellen Knock-out“, inaktiv ist. Die Methode der Erschaffung von Knock-out-Mäusen wurde in den 80er-Jahren von Capecchi, Smithies und Evans beschrieben, wofür sie im Jahre 2007 einen Nobel Preis bekamen. Diese Methode besteht in der Einführung eines modifizierten DNS-Fragmentes in das Genom von Embryonalzellen durch einen Vorgang, der als homologe Rekombination bezeichnet wird [42, 120].

Hao und Kollegen generierten die erste Gewebe-spezifische Fas-Knock-out-Maus. Bei der Maus wurden sog. *loxP*-Sequenzen in das Fas-Gen eingeführt. Exon IX, das die Todesdomäne kodiert, wurde von zwei solchen Sequenzen umgeben. Der Genotyp wurde als „Fas floxed“ (Fas fl) bezeichnet. Die Präsenz der *loxP*-Sequenzen ermöglicht das Ausschneiden des Exons IX durch die Gewebe-spezifische Cre-Rekombinase. Die Deletion des Exons IX schaltet die Funktion von Fas komplett aus [44], (Abb.1.2).

Für unsere Untersuchungen haben wir eine Epidermis-spezifische Fas-Knock-out-Maus generiert. Die Homozygoten für „Fas floxed“ wurden mit transgenen Mäusen verpaart, die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Keratin-14-Promoters exprimieren. Das heißt, dass das Enzym nur in Keratinozyten, eventuell in anderen Keratin-14 exprimierenden Zellen, vorhanden ist. Das Fas-Gen wird in dem Fall nur in diesen Zellen deletiert [86, 42, 43].



**Abb. 1.2** Deletion des Exons IX im Fas-Gen, a – Exon IX umgeben von *loxP*-Sequenzen, b - Ausschneiden des Exons IX durch die Gewebe-spezifische Cre-Rekombinase. (Restriktionsstellen: Ev - EcoRV, S – SphI, C - ClaI)

[nach Hao Z., Hampel B., Yagita H., Rajewski K.: T Cell-specific Ablation of Fas Leads to Fas Ligand-mediated Lymphocyte Depletion and Inflammatory Pulmonary Fibrosis, *J. Exp. Med.* 199, 1355-1365 (2004), modifiziert]

Diese genetische Modifikation ermöglicht selektive Untersuchungen des Fas-Proteins in Keratinozyten. Die Nebeneffekte, die bei der totalen Elimination von Fas auftreten, wie Lymphoproliferation oder Nephritis, werden in dem Fall ausgeschlossen.

## **1.2 Apoptose**

### **1.2.1 Begriff der Apoptose**

Apoptose wurde zum ersten Mal im Jahre 1972 von Kerr beschrieben als Bezeichnung für eine besondere Morphologie sterbender Zellen, die dabei Schrumpfung des Zytoplasmas zeigen [56, 57].

Die Funktion der Apoptose besteht in der Elimination von unnötigen, alten, beschädigten, Virus-infizierten oder kanzerösen Zellen, ohne eine entzündliche Reaktion hervorzurufen. Während der Apoptose kommt es zur Kondensation und Fragmentation des Zellkerns mit Degradation der chromosomalen DNA zu 200 bp großen Fragmenten, Schrumpfung des Zytoplasmas und am Ende zur Formung sog. apoptotischer Körperchen, die durch andere Zellen, hauptsächlich Makrophagen, phagozytiert werden können.

Im Gegensatz zur Nekrose ist Apoptose ein natürlicher Schutz- und Regulationsmechanismus des Körpers und löst normalerweise keine Entzündung aus. Die apoptotischen Vorgänge sind genetisch programmiert und treten aktiv auf, d.h. ein bestimmtes Signal wird gebraucht, um sie auszulösen [116, 94].

Nekrose ist dagegen ein passiver Prozess, der durch unterschiedliche äußere Noxen hervorgerufen wird. Deswegen betrifft Nekrose normalerweise Gruppen von Zellen und nicht einzelne Zellen, wie es bei der Apoptose beschrieben wurde. Die nekrotischen Zellen zeigen aufgeblähtes Zellplasma und Brüche der Zellmembran, was zu Freisetzung des Zellinhalts und Initiation einer Entzündung führt. Bei apoptotischen Zellen wurde dagegen eine Verkleinerung des Zellvolumens gefunden, die Zellmembran verliert ihre Kontinuität nicht.

Das gleichzeitige Auftreten von Apoptose und Entzündung ist jedoch nicht ausgeschlossen und wird häufig beobachtet. Apoptose ist zwar nicht in der Lage, eine Entzündung hervorzurufen, kann aber während der entzündlichen Prozesse provoziert werden. Als Beispiel können hier Virus-Hepatitis, Thyreoiditis vom Hashimoto-Typ, als auch Kontaktdermatitis dienen. Die eindringenden Entzündungszellen sind Quellen der apoptotischen Signale für Zellen des Gewebes [106, 91].

### 1.2.2 Signalwege der Apoptose

Horvitz, Suston und Brenner arbeiteten an der Charakterisierung apoptotischer Mechanismen beim Wurm *Caenorhabditis elegans* und bekamen dafür im Jahre 2002 einen Nobelpreis. Sie wiesen nach, dass sich Apoptose in Abhängigkeit von Molekülen wie Aktivator-Molekül (EGL-1), Inhibitor-Molekül (ced-9), Adapter-Molekül (ced-4) und Effektor-Molekül (ced-3) vollzieht [91].

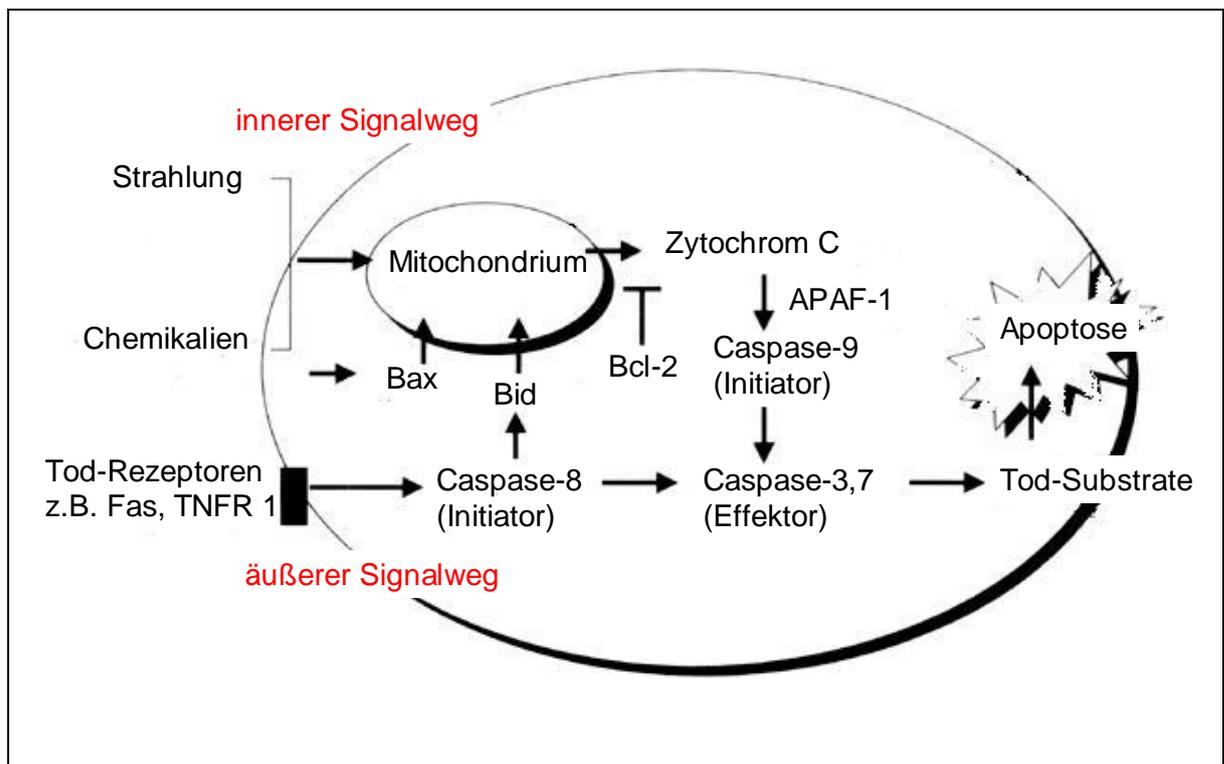
Es gibt verschiedene Mechanismen, die Apoptose initiieren können. Sie führen am Schluss zur Aktivierung von Enzymen, die Caspasen genannt werden, und dadurch zum Tod der Zelle mit der oben beschriebenen Morphologie. Caspasen gehören zur Familie der ICE-Zystein-Proteasen (engl. interleukin-1 $\beta$  converting enzymes), die konstitutiv in der Zelle als Proenzyme vorkommen und bei Apoptose in einer Kaskade voneinander aktiviert oder autoaktiviert werden. Caspase-3 und Caspase-7 sind die letzten Caspasen in der Kaskade und kommen gemeinsam in verschiedenen apoptotischen Signalwegen vor. Sie führen die Proteolyse so genannter Todessubstrate durch. Dazu gehören Kernmembranproteine wie Lamine, Zytoskelettproteine, z.B. Aktin sowie Proteine, die in der DNA-Reparatur und Replikation eine Rolle spielen, wie z.B. PARP (engl. poly-ADP-ribose polymerase).

Die Studien von Piwocka und anderen haben jedoch gezeigt, dass in Ausnahmefällen ein programmierter Zelltod auch ohne Beteiligung von Caspasen möglich ist [89, 67, 70, 61, 59].

Es wurden zwei Hauptwege definiert, die zur Apoptose führen (Abb. 1.3). Der sog. äußere Signalweg (engl. extrinsic pathway) wird durch sog. Todesrezeptoren (engl. death receptors) wie z.B. Fas, TNFR 1 (engl. tumor necrosis factor receptor 1), TRAILR 1 und 2 (engl. TNF-related apoptosis inducing ligand receptor 1, 2) vermittelt. Nach der Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor an der Zellmembran kommt es zur Rekrutierung zahlreicher Adaptermoleküle, was die Aktivierung von Caspase-8, der ersten Caspase in diesem apoptotischen Signalweg, ermöglicht.

Der alternative Weg der Apoptose, der sog. innere Weg (engl. intrinsic pathway), braucht keine spezifischen Moleküle und wird direkt von Faktoren wie UV-Licht, ionisierender Strahlung, reaktiven Sauerstoffradikalen oder zytotoxischen Medikamenten stimuliert, also von Faktoren, die zu einer Schädigung der Zelle, grundsätzlich der DNA, führen. In diesen Weg sind hauptsächlich Mitochondrien involviert, die Cytochrom C in das Zytoplasma ausschütten. Cytochrom C bindet den Kofaktor APAF-1 (engl. apoptotic

protease activating factor 1), gefolgt von der Aktivierung von Caspase-9 und anderer Caspasen. Mitochondrien sind auch in der Lage, den sog. AIF (engl. apoptosis inducing factor) abzugeben, der im Zellkern Caspasen-unabhängig Apoptose initiiert. Sie können zusätzlich auch das Smac/DIABLO-Protein freisetzen, das die sog. IAPs (engl. inhibitors of apoptosis proteins) blockieren kann.



**Abb. 1.3** Zwei Hauptsignalwege der Apoptose: äußerer und innerer Signalweg (genaue Beschreibung im Text). [nach Yin X.-M.: Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways, *Cell Res.* 10, 161–167(2000), modifiziert]

Der innere und der äußere Signalweg der Apoptose funktionieren nicht völlig getrennt voneinander, sondern sie weisen gemeinsame Schnittstellen auf. So kann aktive Caspase-8 den inneren Weg der Apoptose dadurch stimulieren, dass sie die Umwandlung des Bid-Proteins in seine aktive Form t-Bid (engl. truncated Bid - prozessiertes Bid) durchführt. Das Fragment t-Bid bewirkt schließlich die Abgabe des Cytochroms C aus Mitochondrien. Diese zusätzliche Schleife der Interaktionen zwischen den apoptotischen Mediatoren beider Wege ist wichtig für die Amplifikation der Reaktion, besonders bei UV-induzierter Apoptose [91].

### **1.2.3 Antiapoptotische Mechanismen**

Zellen sind in der Lage, dem apoptotischen Programm durch antiapoptotische Mechanismen zu entgehen. Mitglieder der Bcl-2-Familie (engl. B-cell lymphoma) wie Bcl-2, Bcl-w und Bcl-xl, als auch die oben erwähnten Inhibitoren der Apoptose (engl. IAPs), z.B. Survivin, sind wichtige Proteine, die das Zellüberleben regulieren.

Die oben erwähnten Bcl-2-Homologen stabilisieren die mitochondriale Membran und binden den Faktor APAF-1, wodurch sie den inneren Weg der Apoptose blockieren. Andere Mitglieder der Bcl-2-Familie: Bax, Bik, Bak, Bad und Bcl-xs fördern dagegen die apoptotischen Prozesse [91, 63, 74, 126]. IAPs wie xIAP, c-IAP1, c-IAP2 und Survivin wirken durch Bindung und Blockierung der Caspasen: 3, 7 und 8 [74].

FLIP ist ein Inhibitor der Caspase-8 und kann apoptotischen Prozessen entgegenwirken, die von den Todesrezeptoren abhängig sind [87].

Ein anderes, Ubiquitin-ähnliches Protein – Sentrin – schützt bei Überexpression vor der Fas- und TNFR-ausgelösten Apoptose. Der Mechanismus ist unklar. Sentrin kann wahrscheinlich wie Ubiquitin verschiedene Proteine binden und dadurch modifizieren [52].

Überlebenssignale können auch durch Interzellularräumproteine wie z.B. Laminine, die Integrine an der Zelloberfläche binden, vermittelt werden. Laminine und andere Proteine der extrazellulären Matrix wirken durch Bindung der Integrine an der Zelloberfläche [91, 116, 16].

### **1.2.4 Apoptose von Keratinozyten**

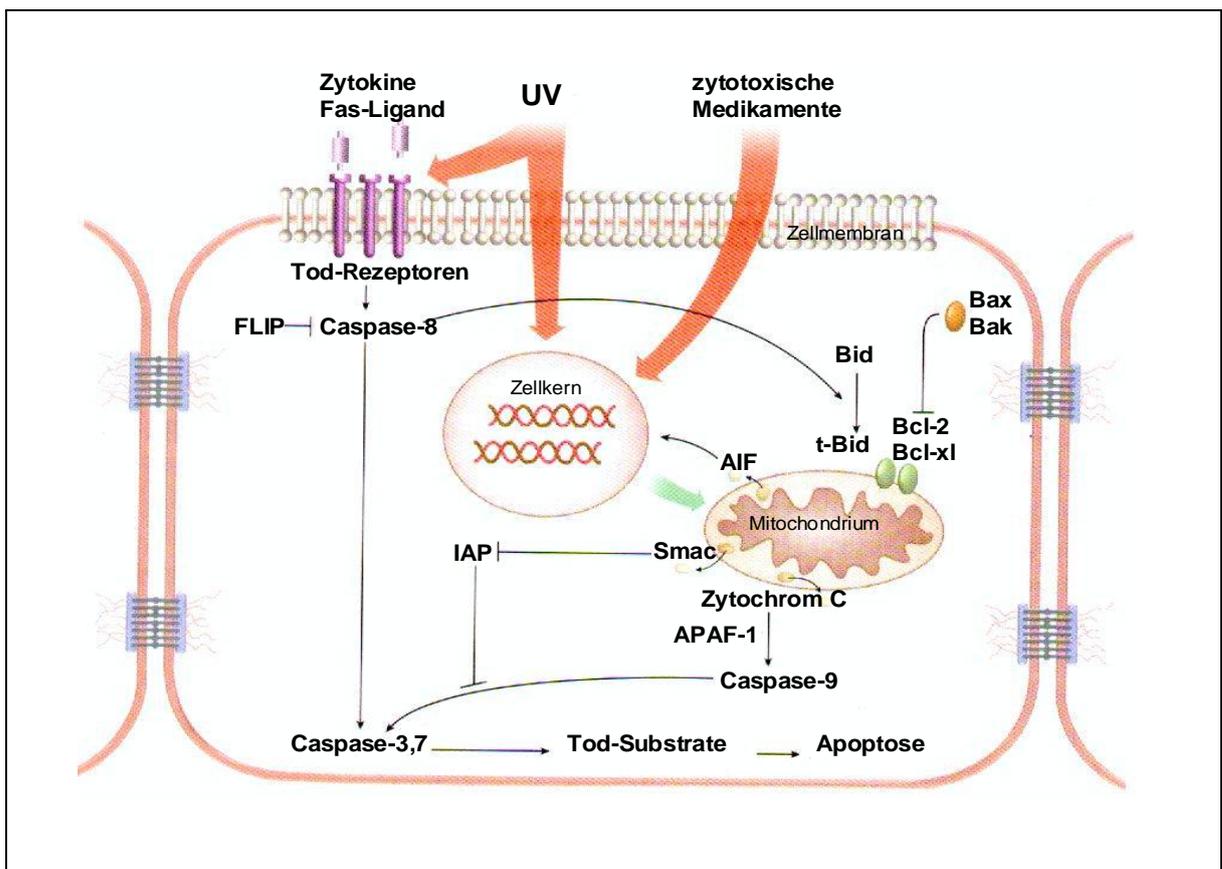
Apoptose von Keratinozyten tritt bei der Entwicklung der Epidermis während der Embryogenese auf. Später ermöglicht sie die Eliminierung von kritisch beschädigten Zellen, die nach Exposition mit Chemikalien oder UV-Licht entstanden sind, was das optimale Funktionieren der Epidermisbarriere sichert [94].

Es gibt unterschiedliche Ergebnisse zur Aktivierung der Caspasen während der Keratinozytendifferenzierung. Es ist nicht möglich, den Differenzierungsprozess von Keratinozyten mit der TUNEL-Färbung nachzuweisen [91, 69]. Die letzten Versuche von Lippens und Kollegen zeigen, dass vermutlich die einzige Caspase, die in differenzierenden Keratinozyten aktiv ist, Caspase-14 ist. Sie scheint spezifisch für den Prozess zu sein. Andere Caspasen sind dagegen für Apoptose spezifisch [91, 69].

Manche Störungen der Apoptose von Keratinozyten, die an Mausmodellen untersucht wurden, beeinflussen stark die normale Entwicklung der Epidermis, so verursacht z.B. eine Überexpression von Bcl-2 eine fokale epidermale Hyperplasie und abnormale Expression von Keratin-6 [91].

Apoptose ist in der Epidermis wahrscheinlich für die Eliminierung von präkanzerösen Zellen verantwortlich, die nach UV-Exposition oder nach oxidativem Stress durch Einwirkung reaktiver Sauerstoff-Verbindungen (engl. ROS – reactive oxygen species) entstanden sind. Sie wird aber auch bei pathologischen Zuständen beobachtet, z.B. bei Dermatitis [94].

Apoptose in Keratinozyten kann sowohl über den inneren als auch über den äußeren Signalweg verlaufen. UV-Strahlen und zytotoxische Medikamente sind Hauptfaktoren in dem inneren Signalweg. Verschiedene Zytokine, z.B. TNF- $\alpha$  oder Fas-Ligand initiieren apoptotische Vorgänge nach dem sog. äußeren Mechanismus. Sie können unter anderem von Entzündungszellen produziert werden (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4** Apoptotische Signalwege in Keratinozyten (Beschreibung im Text).

[nach Raj D., Brash D.E., Grossman D.: Keratinocyte Apoptosis in Epidermal Development and Disease, *J. Invest. Dermatol.* 126, 243-257 (2006), modifiziert]

Es wird immer wieder diskutiert, ob der Tod der differenzierten Keratinozyten im *Stratum corneum* eine Sonderform der Apoptose ist. Während der Keratinozytendifferenzierung und Apoptose wurden DNA-Degradation, Kernverlust und schließlich Zelltod beobachtet [69]. Es wurde freies Cytochrom C im Zytoplasma nachgewiesen [91, 7].

Die letzten Experimente zeigten dagegen, dass es sich eher um zwei ganz unabhängige Prozesse handelt. Die Apoptose erfolgt schnell, dauert ca. 48-72 Stunden, während die Differenzierung Wochen braucht, damit notwendige Proteine synthetisiert werden können. Apoptotische Keratinozyten schrumpfen, bilden Fragmente – oben erwähnte apoptotische Körperchen – und werden als unnötige Zellen sofort von Makrophagen oder Nachbarzellen phagozytiert. Differenzierte Keratinozyten dagegen flachen ab, bilden eine funktional wichtige Struktur, das *Stratum corneum*, und werden als ganze Zellen, Corneozyten, abgeschuppt. Der Verlust des Kontakts mit der Basalmembran leitet den Differenzierungsprozess ein. Dabei werden aber keine Zeichen der Apoptose beobachtet.

### **1.2.5 Überlebenswege der Keratinozyten**

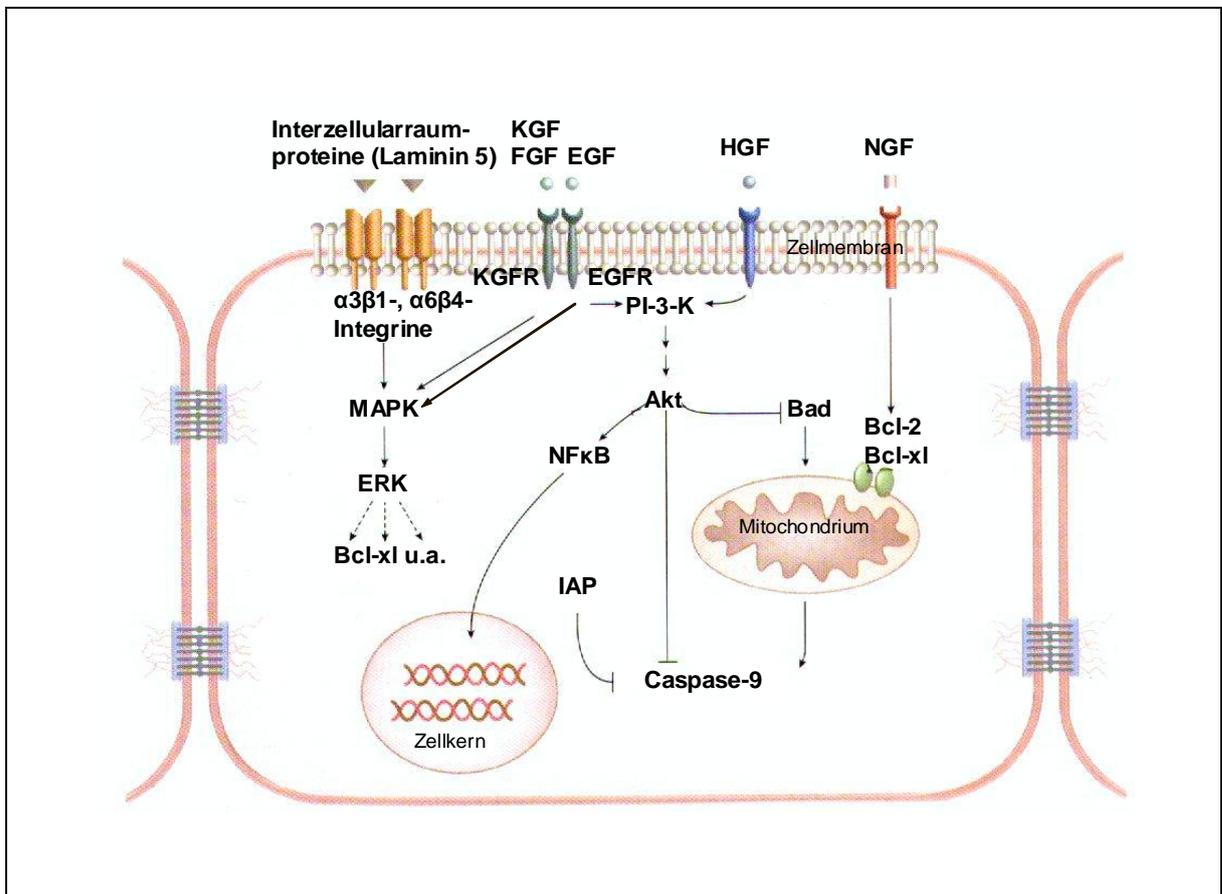
Keratinozyten verfügen über antiapoptotische Mechanismen, die die Epidermis-Barriere nach Einwirkung von verschiedenen Apoptose-auslösenden Faktoren vor Zerstörung schützen. Sie können solche Überlebensproteine exprimieren: Bcl-2, Bcl-xl, FLIP, NFκB [engl. nuclear factor kappa B) und IAPs, z.B. c-IAP1, c-IAP2, XIAP [91, 116, 126]. Survivin ist ein antiapoptotisch wirkendes Protein, das nur in pathologischen Zuständen in Keratinozyten vorkommt, wie aktinische Keratose, Spinalzellkarzinom, *Verucca vulgaris*, seborrhoische Keratose und Psoriasis [18, 93, 38].

Apoptose wird bei Keratinozyten hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren blockiert. Aktivierung des EGF-Rezeptors (engl. epidermal growth factor receptor) durch seine Liganden (z.B. EGF, TGFα oder Amphiregulin) verursacht die Stimulation der sog. MAPK-Kaskade (engl. mitogen-activated protein kinase), gefolgt von einer Aktivierung der ERKs (engl. extracellular signal-regulated kinases) und Expression von Bcl-xl [91, 109, 97], (Abb 1.5).

Das EGFR-Signal aktiviert auch eine andere Überlebenskaskade, die durch PI-3-Kinase (engl. phosphatidylinositol-3 kinase) vermittelt wird. Als Konsequenz kommt es zur Aktivierung der Akt-Kinase, die Caspase-9 und den apoptotischen Faktor Bad inaktiviert. Gleichzeitig aktiviert Akt-Kinase den Transkriptionsfaktor NF-κB, der für die Regulierung der Expression der IAPs und Todesrezeptor-Adapterproteine verantwortlich

ist. Inhibition der EGFR-Aktivierung verursacht Apoptose bei kultivierten Keratinozyten [91, 49, 98]. Die Aktivierung des EGF-Rezeptors und nachfolgende Bcl-xl-Expression vermindert außerdem die Rate der UV-verursachten Apoptose, hat aber keinen Einfluss auf Fas-vermittelte Apoptose [48].

Andere Wachstumsrezeptoren an Keratinozyten wie HGF-Rezeptor (engl. hepatocyte growth factor receptor), NGF-Rezeptor (engl. nerve growth factor receptor) und KGF-Rezeptor (engl. keratinocyte growth factor receptor) nehmen auch am Überlebensprozess teil. HGFR ist am Akt-Signalweg beteiligt und NGFR spielt eine Rolle in der Regulation der Bcl-2 und Bcl-xl Expression [91, 12].



**Abb. 1.5** Antiapoptotische Signalwege in Keratinozyten (Beschreibung im Text).

[nach Raj D., Brash D.E., Grossman D.: Keratinocyte Apoptosis in Epidermal Development and Disease, *J. Invest. Dermatol.* 126, 243-257 (2006), modifiziert]

Wie bereits erwähnt, sind auch Interzellarraumproteine an antiapoptotischen Mechanismen beteiligt. Bindung der α3β1- und α6β4- Integrine der Keratinozytoberfläche

an Laminin 5 führt sowohl zur Aktivierung von FAK (engl. focal adhesion kinase), die antiapoptotische Aktivität besitzt, als auch von ERKs [91, 40], (Abb.1.5). Blockade der  $\beta$ 1-Integrine verursacht dagegen Suppression von Bcl-2 in den epidermalen Stammzellen und ihre Apoptose [126]. Auch interzelluläre Wechselwirkungen können antiapoptotische Wirkung haben: der Verlust des Zell-Zell-Kontakts führt beispielsweise zur Suppression von Bcl-xl und Erhöhung der Apoptoserate [126, 97].

Die Empfindlichkeit der Keratinozyten gegenüber proapoptotischen Faktoren hängt von ihrem Differenzierungsgrad ab. Basale Keratinozyten sind Apoptose-resistent, weil sie noch antiapoptotischen Einflüssen von Wachstumsfaktoren unterliegen und auch antiapoptotisch wirkende Proteine wie z.B.  $\beta$ 1-Integrine und Bcl-2 exprimieren. Deswegen tritt die UV-, ROS- und Lymphozyten-induzierte Apoptose hauptsächlich in mittleren Schichten der Epidermis auf, in denen die Bcl-2-Expression absinkt. Bcl-xl ist dagegen hauptsächlich in mittleren Epidermis-Schichten exprimiert und verhindert wahrscheinlich vorzeitigen Zelltod [126]. Ähnlich wirkt der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, der konstitutiv in Keratinozyten vorkommt und sie vor Apoptose schützt, bevor sie den terminalen Differenzierungsgrad erreichen. Dadurch sind Keratinozyten in normalem Zustand unempfindlich gegen TNF- $\alpha$ - induzierte Apoptose [126].

Hochdifferenzierte Keratinozyten in *Stratum granulosum* sind dagegen hochresistent gegen äußerlich induzierte Apoptose. Solche Zellen können in die G1- und S-Phase des Zellzyklus nicht mehr eintreten, was eine Voraussetzung für die Wirkung des p53-Proteins ist [91, 48].

Keratinozyten unterliegen also ständig gegensätzlichen Signalen, deren Aufgabe es u.a. ist, das Gleichgewicht zwischen Tod und Überleben im Gewebe zu erhalten und dadurch eine terminale Differenzierung mit Bildung des funktionalen *Stratum corneum* zu ermöglichen [69, 7]. Störungen der Apoptose in der Epidermis sind an der Entwicklung verschiedener Krankheitsbilder beteiligt. Gesteigerte Apoptose von Keratinozyten findet sich beim Sonnenbrand sowie bei der toxischen epidermalen Nekrolyse (engl. TEN, toxic epidermal necrolysis) und beim GVHD-Syndrom (engl. graft-versus-host disease) [91]. Eine pathologisch erhöhte Überlebensrate wird dagegen bei Schuppenflechte und Hautkrebs beobachtet [91]. Bei diesen Hautkrankheiten wurde eine gesteigerte Expression von antiapoptotischen Faktoren wie Survivin und Bcl-xl in der Epidermis nachgewiesen [91, 116]. Der Apoptose-hemmende EGFR-Signalweg ist bei Hautkrebs und bei anderen hyperplastischen Zuständen der Epidermis z. B. Psoriasis, *Acanthosis nigricans maligna* häufig aktiviert [91, 40, 41, 5, 123].

### **1.3 Akute allergische Kontaktdermatitis**

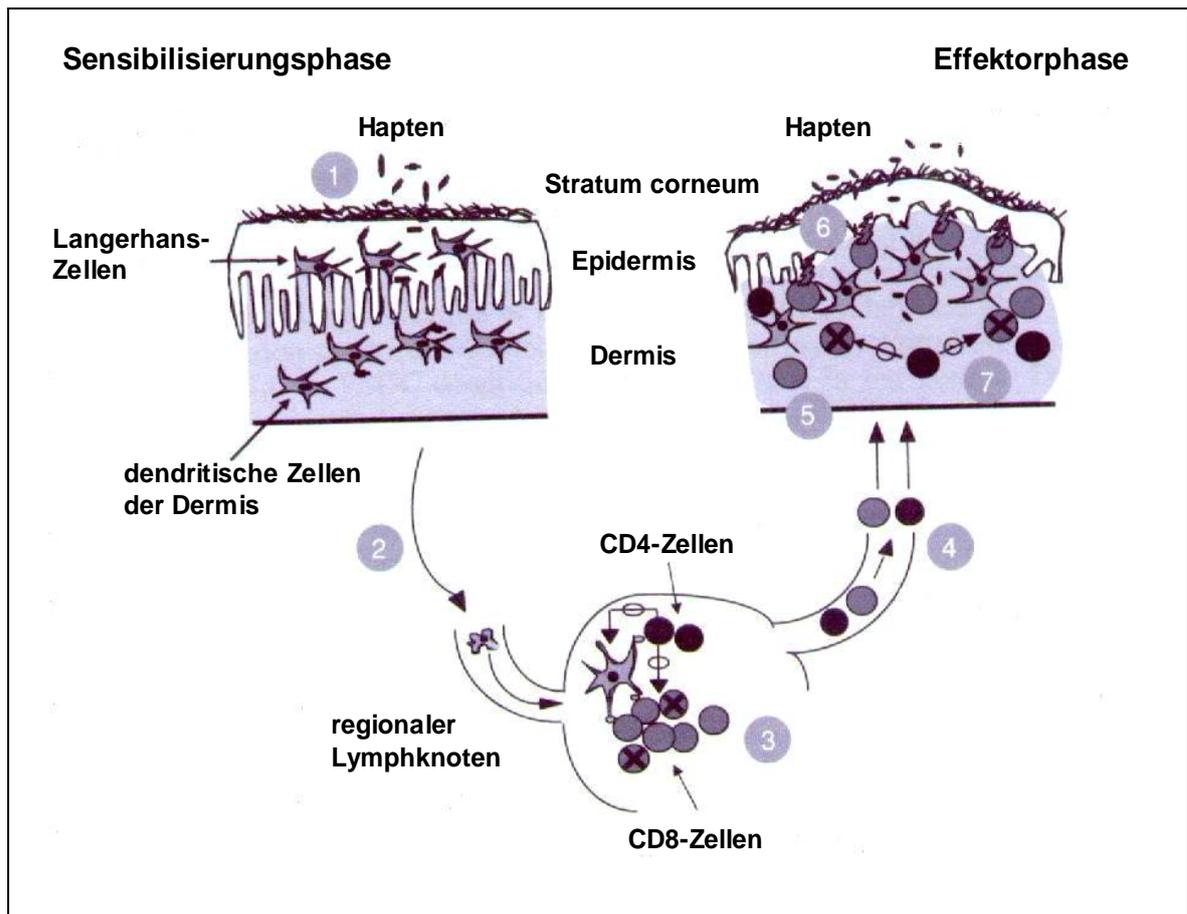
#### **1.3.1 Formenkreis der Ekzemkrankheiten**

Die allergische Kontaktdermatitis gehört zur Gruppe der Ekzemkrankheiten, die mit einem Anteil von ca. 20% die häufigsten Erkrankungen der Haut sind. Ekzeme werden auch als epidermale Intoleranzreaktionen bezeichnet, d.h. nichtinfektiöse und nichtkontagiöse entzündliche Krankheiten, bei denen die Epidermis obligat betroffen ist. Die Ursache ist entweder toxisch oder allergisch; darüber hinaus existieren nicht bekannte Ursachen [92].

#### **1.3.2 Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis**

Die allergische Kontaktdermatitis ist eine ekzematöse Krankheit, die nach wiederholter direkter Exposition der Haut mit einem Allergen auftritt. Nach einer Sensibilisierungsphase erscheinen die Symptome 24 - 72 Stunden nach dem erneuten Kontakt mit einer allergisierenden Substanz. Häufige Allergene sind Metallverbindungen (Nickel- und Chromsalze), wie auch Kosmetika- und Alltagschemikalien. Die Prädisposition ist genetisch bedingt.

Der Mechanismus stellt die allergische Reaktion vom Typ IV in der Klassifikation nach Coombs dar [92]. In der sog. Sensibilisierungsphase wird ein Antigen oder Hapten, das sich vorher mit einem Trägerprotein verbinden muss, durch dendritische Zellen der Haut (z.B. Langerhans-Zellen) aufgenommen und prozessiert. Die Langerhans-Zellen wandern dann zu den regionalen Lymphknoten, wo sie das Antigen den naiven T-Zellen mit Hilfe der MHC-KlasseII-Proteine präsentieren können. Dabei schütten Langerhans-Zellen auch verschiedene Zytokine, z.B. IL-1 aus, die die Proliferation der sensibilisierten Lymphozyten stimulieren. Die Wanderung von dendritischen Zellen aus der Haut zum Lymphknoten wird durch das Chemokin CCL21 reguliert. CCL21 wird in Endothelzellen von Lymphgefäßen und Stromazellen in Lymphknoten exprimiert [100], (Abb. 1.6).

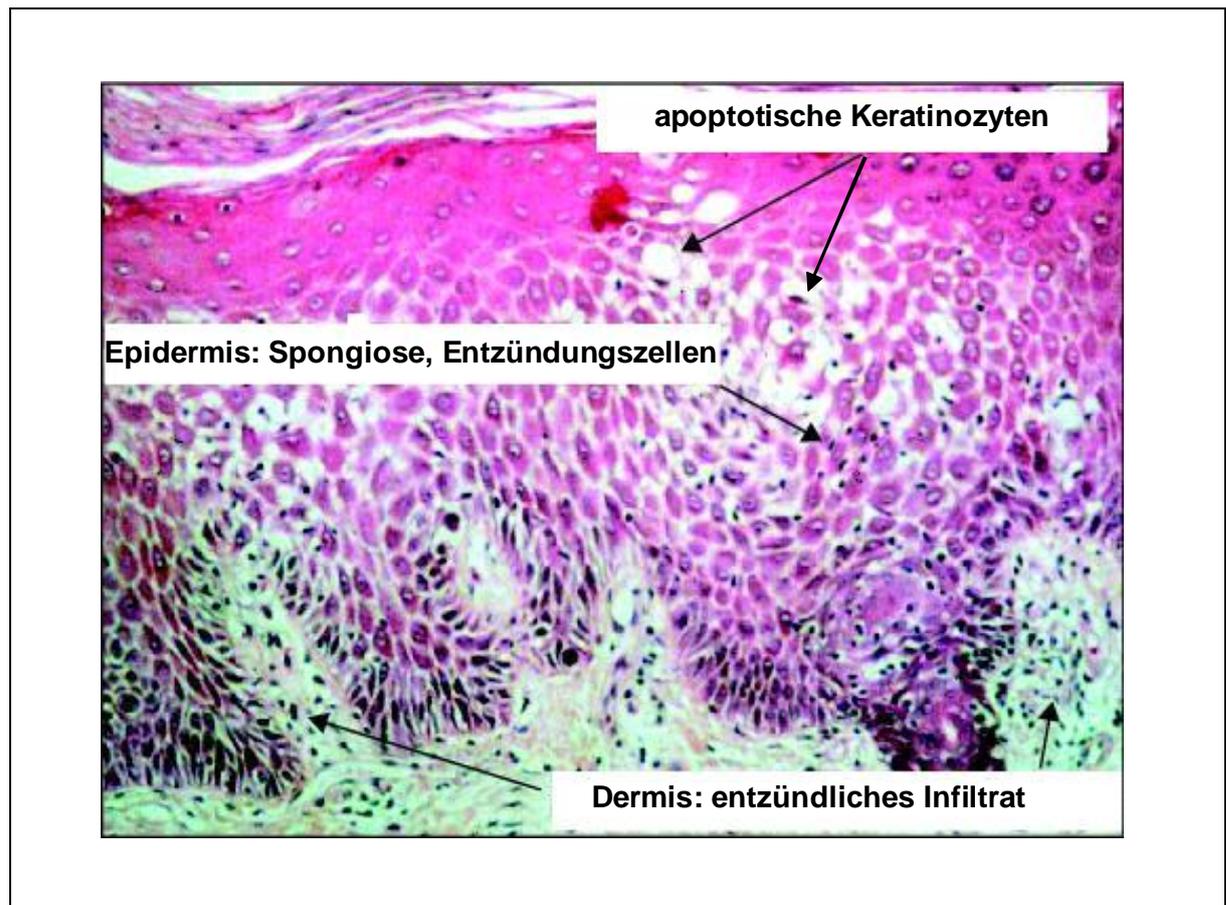


**Abb. 1.6** Pathomechanismus der allergischen Kontaktdermatitis; Sensibilisierungsphase: 1 – dendritische Zellen prozessieren das Hapten, 2 – dendritische Zellen wandern zu dem regionalen Lymphknoten, 3 - dendritische Zellen präsentieren das Antigen den naiven T-Zellen; Effektorphase: 4 – nach dem erneuten Kontakt mit dem Antigen wandern die sensibilisierte T-Zellen in die Haut, 5 - die sensibilisierte T-Zellen dringen in die Haut ein, 6 - die sensibilisierte T-Zellen lösen eine Entzündungsreaktion an der Stelle des Kontaktes mit dem Antigen aus. [nach Saint-Mezard P., Rosieres A., Krasteva M., Berard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J-F.: Allergic contact dermatitis, Eur. J. Dermatol. 14, 284-295 (2004), modifiziert]

### 1.3.3 Makroskopische und mikroskopische Erscheinungen bei akuter allergischer Kontaktdermatitis

Typisch ist die Lokalisation der Symptome an der Kontaktstelle mit dem Allergen, was den Begriff „Kontaktdermatitis“ erklärt. Eine Ausbreitung, besonders bei chronischem Verlauf oder bei Exposition gegenüber Allergenen, die durch die Luft verteilt werden können, ist jedoch möglich.

Im Akutstadium äußert sich die Krankheit makroskopisch durch Bläschenbildung, Rötung, Ödem, Blasen, Nässen mit Krustenbildung und Erosionen. Die Primäreffloreszenz der Kontaktdermatitis ist eine Papulovesikel. Die Patienten klagen über starken Juckreiz. Bei Rückbildung und im chronischen Stadium sind desquamative Veränderungen typisch [106, 50].



**Abb. 1.7** Mikroskopische Erscheinungen bei Kontaktdermatitis: Apoptose von Keratinozyten, Spongiose und interzelluläres Ödem in der Epidermis, lymphozytäres Infiltrat in der Dermis; beachte Hyperproliferation der Keratinozyten. [nach Saint-Mezard P., Rosieres A., Krasteva M., Berard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J-F.: *Allergic contact dermatitis*, *Eur. J. Dermatol.* 14, 284-295 (2004), modifiziert]

In der Histologie der Haut sind folgende Erscheinungen sichtbar: lymphozytäres Infiltrat in der Dermis, oft mit eosinophilen Granulozyten und sog. Spongiose mit Vesikelbildung in der Epidermis, die durch ein interzelluläres Ödem und teilweise auch Apoptose der Keratinozyten hervorgerufen werden. Dadurch kann es zum Durchbruch der

Epidermisschicht und zur Beschädigung der epidermalen Schutzbarriere kommen [106, 50].

Bei chronischem Verlauf sind Akanthose, Parakeratose und Hyperkeratose zu sehen, die als Folge der Hyperproliferation der basalen Keratinozyten entstehen [92, 50], (Abb.1.7).

#### **1.3.4 Die Rolle von T-Lymphozyten in allergischer Kontaktdermatitis**

Gocinski und Tigelaar haben die entscheidende Rolle der CD4- und CD8-Zellen in der Entstehung der Kontaktdermatitis bei Mäusen nachgewiesen. Die allergische Reaktion wurde mit einer allergisierenden Substanz (2,4-di-Nitrofluorobenzol, DNFB) ausgelöst und danach wurde die Ohrschwellung als Parameter der Stärke der Entzündungsreaktion gemessen. Das Ausschalten der CD8-positiven Zellen mit einem monoklonalen Antikörper führte zu einer erheblichen Abschwächung der Reaktion. Nach der Eliminierung der CD4-Zellen wurde dagegen eine Verstärkung der Schwellung beobachtet. Bei Anwendung von Antikörpern gegen beide Zelltypen wurde die Ohrschwellung komplett unterdrückt [35]. Ähnliche Ergebnisse wurden in zwei weiteren Studien erzielt [17, 3]. Daraus folgt, dass CD8-positive Zellen für die Ausprägung der Ekzemreaktion von essenzieller Bedeutung sind, CD4-positive Zellen hingegen wahrscheinlich eine regulatorische, abschwächende Funktion haben.

Bei Kontaktekzemen geht die entzündliche Reaktion einher mit einer nachweisbaren Apoptose epidermaler Keratinozyten. Der Anteil apoptotischer Keratinozyten steigt proportional mit der Zahl der in die Haut einwandernden Lymphozyten. Dabei ist unklar, ob dieser Apoptose eine pathogenetische Bedeutung in diesem Zusammenhang zukommt. Nach Kehren sind zytotoxische Funktionen der CD8-Zellen für die Entwicklung einer Kontaktdermatitis absolut notwendig [55]. Es gibt zwei Hauptmechanismen der Zytotoxizität der CD8-Zellen gegen Keratinozyten. Dies sind einerseits die Fas-vermittelte und andererseits die Perforin/Granzyme-vermittelte Apoptose der Ziel-Zellen [75, 51, 117, 100, 54]. Der Perforin/Granzyme-Weg unterscheidet sich grundsätzlich von der Fas-vermittelten Apoptose. Perforin bildet Poren in der Zellmembran, was das Eindringen der Granzyme in die Zelle ermöglicht. Granzyme sind Serine-Proteasen, die verschiedene Proteine prozessieren können, was letztlich zur Apoptose der Zelle führt [75]. In Hautbiopsien von Patienten mit allergischer Kontaktdermatitis wurden hohe Konzentrationen von Perforin und Granzymen, vor allem im lymphozytären Infiltrat nachgewiesen [128, 117].

Sowohl der Fas-abhängige als auch der Perforin-abhängige Weg scheint in der Entwicklung von Ekzemreaktionen eine Rolle zu spielen. Sie können sich offenbar gegenseitig ersetzen. Mäuse mit gleichzeitiger Deletion von FasL und Perforin zeigen nach Behandlung mit DNFB keine Entwicklung einer Kontaktdermatitis. Bei alternativer Deletion von entweder FasL oder Perforin tritt eine normale Antwort auf DNFB ein, was auf eine mögliche gegenseitige Kompensation der beiden Wege hinweist [55]. Bei Xu entwickelten die *lpr*-Mäuse, die Fas-Mutanten sind, dagegen eine erhebliche Reduzierung der Kontaktdermatitis-Reaktion [127].

*In vitro* Studien von Traidl und Kollegen zeigten jedoch, dass Fas eine Nebenrolle in der Zytotoxizität der T-Zellen spielt. Eine Blockierung des Fas-Wegs mit Brefeldin A, die die Expression von FasL verhindert, vermindert das Ausmaß der Apoptose nur im Falle der T1-Zellen und hat keinen Einfluss im Falle der T2-Zellen [117]. Kataoka und seine Kollegen zogen auf der Basis ihrer Experimenten auch den Schluss, dass der Perforin-basierte Signalweg der Hauptweg der Lymphozytenzytotoxizität ist und Fas-vermittelte Apoptose nur eine Nebenrolle dabei spielt [54]. Außerdem braucht die Fas-abhängige Zytotoxizität die *de novo*-Synthese von FasL in zytotoxischen Zellen [54].

### **1.3.5 Die Rolle von Fas in allergischer Kontaktdermatitis**

*In vitro* Studien zeigten, dass Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) eine vermehrte Expression von Fas in Keratinozyten bewirkt [118, 102, 114, 71, 21]. Die Behandlung mit IFN- $\gamma$  erhöhte die Anzahl von Fas-exprimierenden Keratinozyten in Kultur von 8.4% auf 34.6% [102]. Diese Daten lassen es möglich erscheinen, dass IFN- $\gamma$  auch *in vivo* eine Rolle in der Regulation der Fas-Expression spielt. Dafür sprechen auch Ergebnisse von Trautmann und Kollegen, die ein *in vitro*-Modell eines akuten Kontaktekzems etablierten.

Das Modell besteht aus zwei in ekzematösen Veränderungen gefundenen Zelltypen, humanen Keratinozyten und aktivierten T-Zellen, die zusammen kultiviert werden. In der Kultur kam es bei Kontakt mit aktivierten T-Zellen zur Apoptose der Keratinozyten. Apoptose kam aber nur dann vor, wenn die Keratinozyten mit IFN- $\gamma$  vorbehandelt wurden. [118]. Gleichfalls trat die anti-Fas-Antikörper-induzierte Apoptose der Keratinozyten in einem ähnlichen Experiment von Matsue und Kollegen auch nur nach Behandlung mit IFN- $\gamma$  auf [71]. Die Ergebnisse von Trautmann und Kollegen legen weiterhin nahe, dass Fas für die durch Interaktionen mit aktivierten T-Zellen hervorgerufene Apoptose essenziell ist. So hat die Blockierung des Fas-Proteins mit

einem monoklonalen anti-Fas Antikörper das Auftreten der Keratinozyten-Apoptose in diesem Modell verhindert. Hier scheint also die Fas-vermittelte Apoptose der Hauptmechanismus des Keratinozytentods und des eventuell folgenden Durchbruchs der epidermalen Barriere im Kontaktekzem zu sein [118]. Arbeiten von Farley und Kollegen zeigen außerdem, dass FasL zusätzlich die Expression der Gene von proinflammatorischen Faktoren wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  u.a. verursacht [26, 25]. Diese *in vitro*-Experimente benötigen jedoch eine Bestätigung *in vivo*.

In einer anderen *in vitro*-Studie von Jordanov und Kollegen wurde die Rolle von Fas in der Regeneration der Epidermis bei entzündlichen Prozessen, besonders in der Kontaktdermatitis untersucht. Die Versuche zeigten, dass apoptotische Keratinozyten in der Lage sind, Wachstumsfaktoren zu produzieren. Das konditionierte Medium aus den mit FasL stimulierten Keratinozyten verursachte eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors (engl. epidermal growth factor receptor) und nachfolgende Aktivierung der ERK- und Akt-Kinasen in FasL-stimulierten und auch unstimulierten Keratinozyten. Dies deutet darauf hin, dass die spezifische Aktivierung von Fas die Ausschüttung von EGFR-Liganden verursacht. Die EGFR-Aktivierung in FasL-stimulierten Keratinozyten konnte jedoch den bereits angefangenen Apoptoseprozess nicht verhindern. [47].

Die beschriebenen Ergebnisse wurden von Farley und Kollegen unter Anwendung von einem künstlichen Epidermis-Modell bestätigt. Sie wiesen nach, dass die Aktivierung von Fas in Keratinozyten tatsächlich eine autokrine Freisetzung von EGFR-Liganden und die Aktivierung des EGR-Rezeptors folgt. Gleichzeitig kommt es dabei auch zur Erhöhung der Expression von proentzündlichen Zytokinen [26, 25].

Zurzeit sind drei von Keratinozyten produzierte, autokrin wirkende EGFR-Liganden bekannt: TGF- $\alpha$  (engl. transforming growth factor alpha), HB-EGF (engl. heparin binding epidermal growth factor) und AR (engl. amphiregulin). Letzteres war im Kulturmedium von mit FasL stimulierten Keratinozyten vermehrt vorhanden. Die Blockierung von Amphiregulin mit einem neutralisierenden Antikörper, nicht jedoch von TGF- $\alpha$  oder HB-EGF, konnte die EGFR-Phosphorylierung nach FasL-Behandlung hemmen [47]. Die proliferationsfördernde und differenzierungshemmende Funktion von EGFR-generierten Signalen ist vielfach belegt. Der Sinn einer Ausschüttung von Amphiregulin aus Keratinozyten, die in Apoptose gehen, liegt möglicherweise in der Stimulation von epidermalen Reparaturprozessen in den nicht-apoptotischen Nachbarzellen.

Eine andere Studie von Jost und Kollegen zeigte, dass EGFR-Aktivierung zur gesteigerten Expression von Bcl-xl führt, einem antiapoptotischen Bcl-2-Homolog, und dadurch zur

Hemmung UVB-induzierter Apoptose von Keratinozyten. Die Fas-vermittelte Apoptose konnte jedoch durch EGFR-Aktivierung nicht verhindert werden, was mit dem Ergebnis von Jordanov übereinstimmt [48]. Allerdings ist es möglich, dass wiederum Nachbarzellen durch die Aktivierung anti-apoptotischer Signale vor Apoptose geschützt werden und so für die Regeneration der Epidermis zur Verfügung stehen.

## **1.4 UV-induzierte Dermatitis**

### **1.4.1 Pathogenese und Symptome der UV-induzierten Dermatitis**

Die UV-induzierte Dermatitis (Synonyme: *Dermatitis solaris*, *Erythema solare*, Sonnenbrand) wird durch intensive Bestrahlung der Haut mit Sonnenlicht oder künstlichem UV-Licht hervorgerufen. Die Sonne sendet Licht verschiedener Wellenlängen aus, von denen nur ein Teil eine Dermatitis auslösen kann. Das Potential der Auslösung korreliert mit dem Energiegehalt der Strahlung. So werden von dem relativ langwelligem und energiearmen UVA-Licht (320 - 400 nm) höhere Dosen für die Auslösung einer Dermatitis benötigt, als von dem kurzwelligem, energiereicheren UVB-Licht (290 - 320 nm) [91, 94, 50]. Darüber hinaus ist die für die Auslösung einer Dermatitis benötigte UV-Dosis, die in der Dermatologie auch als MED (mittlere Erythemdosis) angegeben wird, von individuellen Faktoren wie Hautpigmentierung und Dicke der Hornschicht abhängig [19]. Die Symptome einer UV-induzierten Dermatitis sind denen einer Kontaktdermatitis nur teilweise ähnlich, zeigen jedoch auch eine metachrone Polymorphie, d.h. einen phasenhaften Verlauf [19, 50].

4 - 8 Stunden nach der Lichtexposition kommt es zu Rötung und Schwellung (*Stadium erythematosum* und *oedematosum*), die durch Gefäßweitstellung und entzündliches Exsudat bedingt sind. In schweren Fällen entstehen intraepidermale Bläschen und Blasen (*Stadium vesiculosum*), die leicht platzen und von Erosionen, Nässen und Krustenbildung (*Stadium madidans* und *Stadium crustosum*) gefolgt werden. Das Maximum der Symptome tritt nach 12 - 36 Stunden auf. Im Heilungsstadium kommt es zu Regeneration der Epidermis, was makroskopisch als Schuppung zu sehen ist (*Stadium squamosum*) [19, 50].

Anders als bei allergischer Kontaktdermatitis klagen die Patienten über Schmerzen und Brennen. Pruritus ist dagegen typisch für die Rückbildung der Veränderungen. In schweren Fällen können auch systemische Symptome wie Fieber, Schwindel,

Kopfschmerzen auftreten. Hyperpigmentierung ist ein spätes Zeichen einer UV-Strahlenexposition [19] und wird vor allem durch den UVA-Anteil hervorgerufen.

Eine wichtige Rolle in der Pathogenese der UV-induzierten Dermatitis spielen die Keratinozyten der Epidermis, die als erste geschädigt werden und reaktiv Prostaglandine und TNF- $\alpha$  freisetzen. Diese führen in wenigen Stunden zu Entzündungsreaktionen in der Dermis und in schweren Fällen auch zu systemischen Symptomen des Sonnenbrands [19, 60].

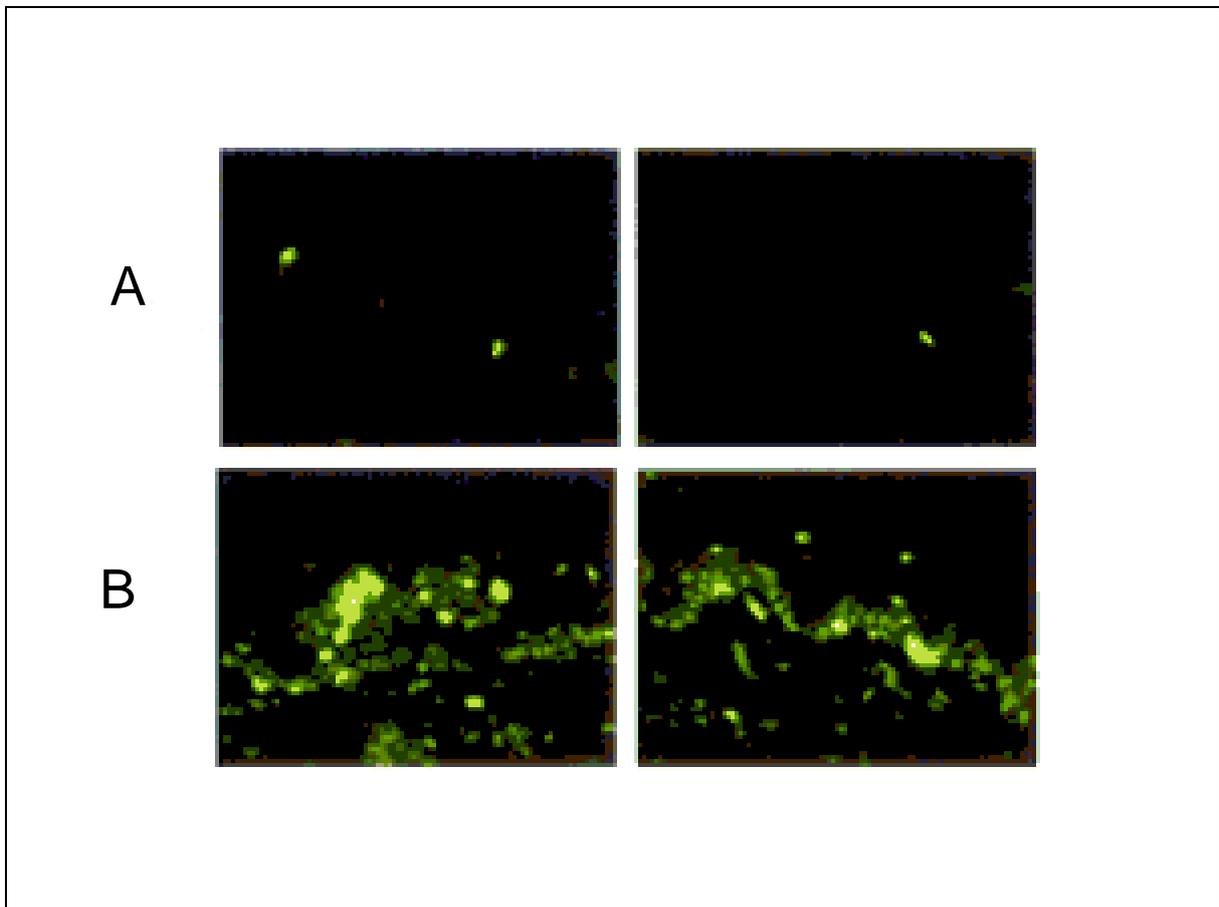
Mikroskopisch sind in der Haut apoptotische und manchmal auch nekrotische Keratinozyten zu sehen. In der Dermis treten Gefäßerweiterung, Ödembildung und ein perivaskuläres lymphohistiozytäres Infiltrat auf [19, 50].

#### **1.4.2 Apoptose von Keratinozyten bei der UV-induzierten Dermatitis**

Nach UV-Bestrahlung der Haut kann man in der Epidermis, vor allem in den mittleren Schichten, sog. Sonnenbrandzellen (engl. sunburn cells) erkennen [91, 80, 50]. Sie sind schon 8 Stunden nach der Strahlenexposition nachweisbar. Das Maximum an sunburn cells tritt nach 24 - 48 Stunden auf, nach 60 - 72 Stunden sind sie nicht mehr zu sehen [63, 94], (Abb.1.8). Sie werden entweder durch die Abschuppung eliminiert oder von einwandernden Makrophagen, Langerhans-Zellen oder angrenzenden Keratinozyten phagozytiert [94]. Die Sonnenbrandzellen haben eine typische Morphologie, die sie von normalen Keratinozyten unterscheidet. In der Hematoxylin-Eosin-Färbung zeigen sie einen kondensierten Zellkern und geschrumpftes, eosinophiles Zytoplasma, weshalb sie auch Spiegeleizellen genannt werden [19]. Sie kommen einzeln vor und sind in der Regel nicht von Entzündungszellen umgeben [63]. Es gibt eine direkte Korrelation zwischen UV-Dosis und Zahl der Sonnenbrandzellen [63].

Das höchste Potenzial der Apoptose-Auslösung haben UVB-Strahlen mit der Wellenlänge 290 - 320 nm, weil sie nicht weiter als durch die Epidermis penetrieren und stark von DNA und Proteinen absorbiert werden. UVC-Licht (100 - 290 nm) liefert viel mehr Energie, wird aber unter natürlichen Bedingungen stark durch die Atmosphäre absorbiert. Energiearme UVA-Strahlen (320 - 400 nm) können auch Apoptose hervorrufen, jedoch nicht durch direkte Absorption sondern durch die Bildung freier Sauerstoffradikale [94]. Diese Moleküle verursachen dann eine Schädigung der DNS und Schädigung aller Membranen in der Zelle, einschließlich der mitochondrialen Membran, durch Fettperoxidation [94]. UV-Licht verursacht in Zellen eine komplexe Reaktion, die als UV-

Antwort (engl. UV response) bezeichnet wird. Dabei werden u.a. Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 aktiviert, was zu IL-1- und TNF- $\alpha$ -Produktion führt [95, 60, 72].



**Abb. 1.8** Apoptotische Keratinozyten bei UVB-induzierter Dermatitis. A – unbestrahlte Haut, B – 24 Stunden nach UV-Bestrahlung (TUNEL-Färbung, Moushaut, jeweils Bilder von zwei Tieren gezeigt). [nach Hill L.L., Ouhtit A., Loughlin S.M., Kripke M.L., Anathaswamy H.N., Owen-Schaub L.B.: Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology, *Science* 275, 898-900 (1999)]

UV-Licht kann auch Schäden der DNS (Desoxyribonukleinsäure) hervorrufen. Wenn die notwendige DNA-Reparatur nicht stattfindet, gehen die Zellen in Apoptose [130, 94, 72]. Einige Elemente der UV-Antwort, z.B. die Bildung von sunburn cells, lassen sich hemmen, wenn diese DNA-Schäden repariert werden können [63]. Dieser Mechanismus, der als Schutz vor der Entstehung UV-induzierter Tumore angesehen wird, ist teilweise von dem Protein p53 abhängig. P53-defiziente Mäuse zeigen deutlich weniger Sonnenbrandzellen nach einmaliger UV-Bestrahlung und eine größere Anfälligkeit für UV- Licht-induzierte Tumore [101, 132].

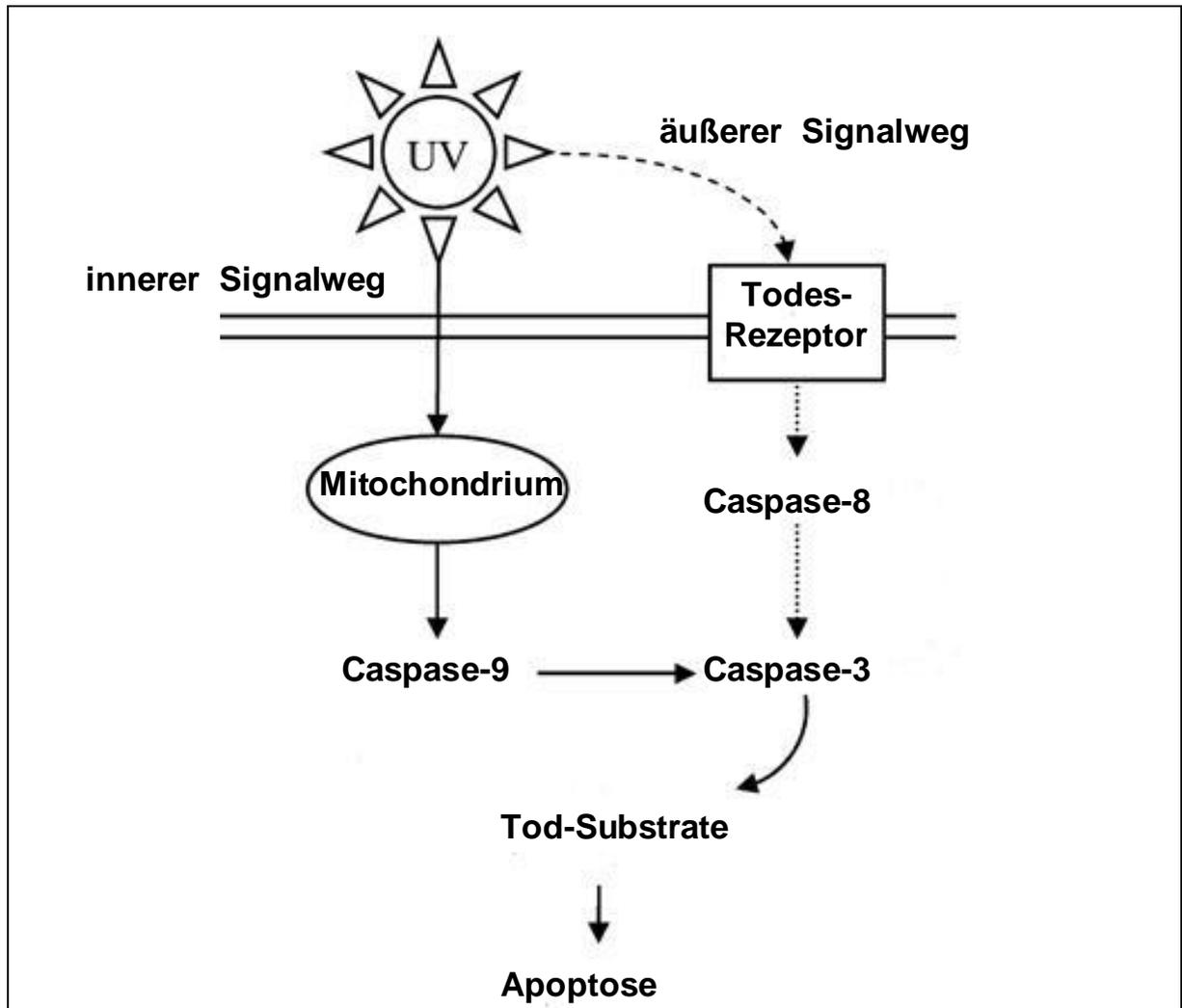
P53 wird nach UV-Bestrahlung hochreguliert und im Falle einer DNS-Beschädigung aktiviert. Es hemmt dann den Zellzyklus in der G1- oder G2-Phase, bis die DNA repariert ist. Wenn eine Reparatur nicht möglich ist, fördert p53 mit Hilfe verschiedener Signalproteine sowohl den inneren, als auch äußeren Apoptoseweg in den betroffenen Keratinozyten [91, 101, 132, 21, 72]. P53 kann auch die Transkription der Todesrezeptoren Fas und DR5 (engl. decoy receptor 5) erhöhen und die Expression der Mitglieder der Bcl-2-Familie regulieren [21, 130, 72].

Gleichzeitig ist das p53-Gen gegenüber UV-induzierten Schäden sehr anfällig. Die meisten Spindelzellkarzinome und 1- 4% der UV-exponierten Keratinozyten tragen p53-Mutationen [91, 132, 21, 130]. Es existiert eine Datenbank mit p53-Mutationen, die hauptsächlich dank Kenntnis sog. Hot-Spot-Stellen entdeckt wurden [14]. Allerdings führt nicht jede p53-Mutation zur Entwicklung eines Hauttumors, was für die Existenz weiterer Schutzmechanismen spricht. Beispielsweise zeigen HaCaT-Zellen, immortalisierte Keratinozyten mit einer natürlich entstandenen p53-Mutation, eine sehr hohe Anfälligkeit für UV-induzierte Apoptose trotz Abwesenheit der p53-abhängigen Schutzmechanismen [130].

Die Mechanismen der UV-induzierten Keratinozyten-Apoptose wurden bis jetzt nicht komplett geklärt. In UV-bestrahlten, apoptotischen Keratinozyten *in vitro* wurde mehrfache Hochregulation der proapoptotischen Enzyme Caspase-8, Caspase-9, Caspase-1 und Caspase-3 nachgewiesen [108, 114]. Daher scheinen beide Apoptose-Signalwege, sowohl der innere mitochondriale Weg, als auch der äußere Weg mit Todesrezeptoren-Beteiligung, involviert zu sein.

In der Studie von Sitailo und Kollegen führte das Ausschalten der Caspase-9 zu völliger Blockade der UV-induzierten Apoptose von Keratinozyten. HPV-immortalisierte Keratinozyten, die mit einem dominant negativen Caspase-9-Konstrukt transduziert wurden, zeigten keine Apoptose nach UV-Exposition. Sowohl Caspase-9-, als auch Caspase-8- und Caspase-3-Aktivität waren in diesen Zellen blockiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der innere Signalweg möglicherweise der Hauptweg bei der UV-induzierten Keratinozyten-Apoptose ist [108], (Abb.1.9).

Für eine Beteiligung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs an der UV-induzierten Apoptose spricht auch die durch UV-Licht ausgelöste Freisetzung von Cytochrom C, die wenige Minuten nach Strahlen-Exposition stattfindet [74]. In bestrahlten Zellen wurde auch die Freisetzung von Smac/DIABLO, einem IAPs-Inhibitor, aus Mitochondrien in das Zytoplasma beobachtet [74].



**Abb. 1.9** Mögliche Wege der UV-verursachten Keratinozyten-Apoptose. Der innere Signalweg mit Aktivierung der Caspase-9 ist als Hauptweg dargestellt und der äußere Signalweg mit Aktivierung der Caspase-8 als Nebenweg. [nach Sitailo L.A., Shalini S.T., Denning M.F.: *Activation of Caspase-9 Is Required for UV-induced Apoptosis of Human Keratinocytes*, *J. Biol. Chem.* 277, 19346-19352 (2002), modifiziert]

Außerdem verursacht UV-Licht Veränderungen in der Expression der Proteine, die an die Mitochondrienmembran binden. So wird das, proapoptotische Protein Bax vermehrt und das antiapoptotisch wirksame Protein Bcl-2 weniger stark exprimiert [63]. Genetisch modifizierte Mäuse, die Bcl-2 überexprimieren, zeigen eine reduzierte Zahl der Sonnenbrandzellen nach UV-Bestrahlung [99].

Interessante Ergebnisse haben Kashkar und seine Arbeitsgruppe publiziert. Sie konnten *in vitro* nachweisen, dass ASM-ase (engl. acid sphingomyelinase), ein Enzym verantwortlich für Ceramid-Freisetzung, unentbehrlich für die UV-verursachte Apoptose ist.

Die Wirkung der ASM-ase scheint unabhängig von Caspase-8, d.h. von Todesrezeptoren, zu sein [53].

Erstaunlicherweise scheint auch ein Wachstumsrezeptor – KGFR (engl. keratinocyte growth factor receptor) an UV-induzierter Apoptose beteiligt zu sein. Arbeiten von Belleudi und Kollegen geben Anhalt dafür, dass die Hemmung der KGFR-Aktivität die UV-induzierte Apoptose reduziert [12].

Es gibt auch mehrere Hinweise dafür, dass zusätzlich zum inneren Apoptoseweg, Todesrezeptoren (engl. death receptors) in der UV-induzierten Apoptose eine wichtige Rolle spielen, vor allem Fas und TNFR. Bei bestrahlten Keratinozyten wurden sowohl eine Aggregation des TNF-Rezeptors 1, als auch eine Freisetzung von TNF- $\alpha$  registriert [63, 103, 60, 107]. Nach Blockierung von TNF- $\alpha$  mit einem spezifischen Antikörper *in vitro* und in TNFR-p55-negativen Mäusen und Zellen wurde eine Reduktion der UV-induzierten Keratinozyten-Apoptose festgestellt [63, 103, 130, 131]. Die Beteiligung von Fas an der UV-induzierten Apoptose wird im nachfolgenden Abschnitt besprochen.

### **1.4.3 Die Rolle von Fas in der UV-induzierten Dermatitis**

In der Literatur wurde eine deutlich vermehrte Expression von Fas, FasL und FADD nach UV-Bestrahlung beschrieben. UV-Bestrahlung induzierte Fas-mRNA-Transkription nach 16 - 24 Stunden und Fas-Proteinexpression nach 24 - 48 Stunden [11, 45, 101, 68, 64, 39, 84, 29].

Lokale Aggregation (engl. clustering) von Fas und FADD, wie auch die Aktivierung von Caspase-3 und nachfolgende Apoptose wurden nach UV-Bestrahlung in humanen Keratinozyten beschrieben [11, 111, 8, 114, 95]. Allerdings wurde keine Korrelation zwischen der Intensität der immunhistologischen Fas-Färbung und dem Ausmaß der Apoptose in der Epidermis nach UV-Bestrahlung gefunden, obwohl Apoptose nur in Fas-positiven Arealen der Epidermis registriert wurde [11].

In Versuchen von Hill und Santamaria zeigten die *gld*-Mäuse, die eine natürliche Mutation von Fas-Ligand tragen, eine reduzierte Zahl der Sonnenbrandzellen nach UV-Bestrahlung [45, 101]. Gleichzeitig führte eine chronische Exposition gegenüber UV-Licht bei diesen Tieren zur übermäßigen Akkumulation von p53-Mutationen [45], was suggeriert, dass Fas eine Rolle in der Elimination der Zellen mit UV-geschädigter DNA spielen könnte. Takahashi und Kollegen berichteten dagegen über Reduzierung der Sonnenbrandzellenanzahl bei *lpr*-Mäusen, die eine Fas-Mutation tragen [111]. Fas-

vermittelte Apoptose ist auch in p53-negativen Keratinozyten möglich und könnte ein Mechanismus der Eliminierung von p53-mutierten Zellen sein [21].

Takahashi und Kollegen zeigten auch eine Reduktion der UV-induzierten Apoptose in der Keratinozyten, die aus der *lpr*-Maus isoliert wurden [111]. Überdies führten sie Experimente mit Fas-transfizierten Keratinozyten durch. Bei diesen Zellen wurde eine erhöhte Empfindlichkeit auf UV-induzierte Apoptose nachgewiesen [114].

Eine Verhinderung der Fas-Liganden-Bindung mit einem blockierenden anti-Fas-Antikörper verhindert jedoch das Auftreten von UV-induzierter Apoptose nicht [111, 8, 114]. Takahashi konnte zeigen, dass UV-Bestrahlung von kultivierten Keratinozyten zu einer direkten, FasL-unabhängigen Aktivierung von Fas führen kann [111]. Allerdings führt in IFN- $\gamma$ -vorbehandelten Keratinozyten eine Blockierung von FasL mit einem spezifischen Antikörper offenbar zur Reduktion der UV-induzierten Apoptose [68].

Für eine mechanistische Beteiligung von Todesrezeptoren an der UV-induzierten Apoptose in Keratinozyten spricht auch die reduzierte Apoptose in UV-behandelten Zellen nach Transfektion mit einer dominant-negativen FADD-Mutante [58], da FADD in den Fas- und TNFR- Signalwegen vorkommt [130].

## **1.5 Fragestellung**

1. Welche pathogenetische Bedeutung hat die Fas-vermittelte Apoptose von epidermalen Keratinozyten in der allergischen Kontaktdermatitis?

Ergebnisse von *in-vitro*-Untersuchungen zeigen Apoptose von epidermalen Keratinozyten nach Kontakt mit aktivierten T-Zellen. Diese kann durch Blockade von Fas verhindert werden. Wenn Fas-vermittelte Apoptose von epidermalen Keratinozyten ein pathogenetisch wichtiges Element in der Entstehung der allergischen Kontaktdermatitis darstellt, dann sollte die Elimination von Fas in Keratinozyten die Entstehung der Krankheit verhindern oder die Krankheit abschwächen. Mit Hilfe eines Mausmodells mit Epidermis-spezifischer Deletion von Fas kann diese Fragestellung erstmals spezifisch *in vivo* untersucht werden.

## 2. Welche Rolle spielt Fas in der UV-induzierten Dermatitis?

Die Ergebnisse hinsichtlich der Beteiligung von Fas an der UV-induzierten Apoptose von Keratinozyten sind widersprüchlich. In einem Mausmodell mit Epidermis-spezifischer Fas-Deletion soll folgende Frage untersucht werden: Ist das Ausmaß der UV-induzierten Apoptose epidermaler Keratinozyten abhängig von der Fas-Expression? In diesem Fall sollte die Anzahl apoptotischer Keratinozyten nach UV-Bestrahlung deutlich reduziert sein.

3. Finden wir in unserem Modell Evidenz für die postulierte protektive Rolle von Fas-vermittelter Apoptose hinsichtlich der in der Kontaktdermatitis sowie in der UV-induzierten Dermatitis auftretenden Apoptose epidermaler Keratinozyten?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen und an gleichaltrigen Kontrolltieren vom C57BL/6-Stamm durchgeführt. Die Epidermis-spezifische Deletion von Fas wurde durch Kreuzung von Mäusen mit zwei geflochten Fas-Allelen (Fas<sup>fl/fl</sup>) mit Mäusen, die Cre-Rekombinase als Transgen unter der Kontrolle des Keratin 14-Promoters exprimieren (K14-Cre+) erzeugt. Der resultierende Genotyp lautet Fas<sup>fl/fl</sup> K14-Cre+ [44, 86, 42, 43]. Als Kontrollen wurden Wildtyp-Tiere oder Fas-geflochte, Cre-negative Tiere, die den Phänotyp von Wildtyp-Tieren haben, vom gleichen Stamm verwendet.

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Airvol 203 (Air Products Medical GmbH, Hattingen, BRD)

di-Amidinphenylindoldihydrochlorid (DAPI; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

Ammoniumthiocyanat (NH<sub>4</sub>SCN; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

Betaisodona (Mundipharma GmbH, Limburg, BRD)

Borsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)

Bromophenol Blau (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)

Chemilumineszenzreagenzien (Perkin Elmer, Boston, USA)

- Enhanced luminal reagent/Oxidizing reagent
- Western Lighting Chemilumineszenz Regent Plus

Diazobicyclo-[2.2.2]-Octan (DABCO; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

Deoxycholate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

Essigsäure (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)

Ethanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)

Ethylendiaminessigsäure (EDTA, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)

Glycerin (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)

Isopropanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)

di-Kaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Merck KGaA, Darmstadt, BRD)

Leupeptin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

Maus-Normalserum (Mouse Serum Normal; Dako, Glostrup, Denmark)  
Methanol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)  
Milchpulver (Milk Powder, Blotting Grade, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)  
Natriumchlorid (NaCl; Caesar & Loretz GmbH, Bonn, BRD)  
di-Natriumhydrogenphosphat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Merck KGaA, Darmstadt, BRD)  
Natriumhydroxid (NaOH; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)  
p-Nitrophenylphosphat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)  
Nonidet P-40 (Fluka Riedel-de Haën, Seelze, BRD)  
Paraformaldehyd (PFA; Merck KGaA, Darmstadt, BRD)  
PBS-Puffer (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biochrom AG, Berlin, BRD)  
Perhydrol (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck KGaA, Darmstadt, BRD)  
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF; Merck KGaA, Darmstadt, BRD)  
Propidiumjodid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)  
Proteinase K (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, BRD)  
Rinderserumalbumin (BSA; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)  
Salzsäure (HCl; Merck KGaA, Darmstadt, BRD)  
Schweine-Normalserum (Swine Serum Normal, Dako, Glostrup, Denmark)  
Sodiumdodecylsulfat (SDS; SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD)  
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)  
Tris (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)  
Triton X 100 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, BRD)  
Trypsin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD)  
Tween 20 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, BRD)  
Xylol (Merck KGaA, Darmstadt, BRD)  
Ziege-Normalserum (Goat Serum Normal; Dako, Glostrup, Denmark)

### 2.1.3 Lösungen und Lösungsmittelgemische

Ammoniumthiocyanat-Lösung

NH <sub>4</sub> SCN	380 mg
NaKPO <sub>4</sub> Puffer (pH 6.8)	10 ml

### Borat-Puffer (pH 7.6)

Borsäure-Lösung (1.24 g + 99.0 ml destilliertes Wasser)	85 ml
Borax (di-Natriumtetraborat-dekahydrat) -Lösung (1.90 g + 99.0 ml destilliertes Wasser)	15 ml

### Gelvatol (bei -20°C lagern)

Airvol 203	2.4 g
Glycerin	6.0 g
Destilliertes Wasser	6.0 ml
über Nacht bei RT quellen lassen	
0.2M Tris (pH 8.5)	12.0 ml
mehrere Stunden auf 50°C erwärmen	
DABCO	auf 2.5 %
15 Min. bei 5000g zentrifugieren	

### Laufpuffer (50x TAE) für PCR-Gelelektrophorese

Tris	242.0 g
96% Essigsäure	57.1 ml
0,5M EDTA	100.0 ml

### Lyse-Puffer für DNA-Isolierung

1M Tris (pH 8.0)	10 ml
0,5M EDTA (pH 8.0)	5 ml
5M NaCl	1 ml
10% SDS	5 ml
Destilliertes Wasser	auf 50 ml

### NaKPO4-Puffer (pH 6.8)

0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13.4 g
0,1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.8 g
Destilliertes Wasser	auf 500 ml

PMSF-Lösung (bei -20°C lagern)

PMSF	0.174 g
Isopropanol	10.0 ml

Proben-Puffer (2x) für Proteinproben

1,5M Tris (pH 6.8)	10.0 ml
20% SDS	6.0 ml
Glycerol	30.0 ml
Bromophenol Blau	1.8 mg
Destilliertes Wasser	auf 100 ml

RIPA-Puffer pH 8.0 (bei 4°C vorbereiten)

NaCl	876 mg
Tris	605 mg
NP-40	1 ml
SDS	100 mg
Deoxycholate	500 mg
EDTA x 2H <sub>2</sub> O	186 mg
Triton X 100	1 ml
Destilliertes Wasser	auf 100 ml

RIPA(+)-Puffer

RIPA-Puffer	10 ml
Leupeptin 20mM	10 µl
p-Nitrophenylphosphat 1g/ml	100 µl
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor 100mg/ml	50 µl
Orthovanadat 100mM	50 µl

TBS-Puffer (pH 7.5)

0.2M Tris	50 ml
5M NaCl	30 ml
Destilliertes Wasser	auf 1000 ml

TBST-Puffer (TBS/0,1% Tween)

TBS-Puffer	1000 ml
Tween 20	1 ml

FAD-Medium [66]

350ml DMEM/ 110ml Ham`s F-12 50µM Ca<sup>2+</sup>

10% FCS Ca<sup>2+</sup>-frei (50ml FCS + 2g Chelex 100 Resin über Nacht sanft schütteln )

50 µl Hydrocortisonlg. ( 5mg/ ml Ethanol abs.)

5µl Cholera toxin (10<sup>-5</sup>M stock, MW 96580g/l)

500µl EGF (10µg/ml stock)

500µl Insulin (5mg/ml 5mM HCl)

1,8 x 10<sup>-4</sup> M Adenin

100 IU/ml Penicillin

100µg/ml Streptomycin

#### 2.1.4 Geräte

Bio-Photometer (Eppendorf AG, Hamburg, BRD)

Brutschrank B 6042 E (Heraeus Holding GmbH, Hanau, BRD)

Fluoreszenzmikroskop Eclipse E800 (Nikon GmbH, Düsseldorf, BRD)

Homogenisator MM300 (Retsch GmbH, Haan, BRD)

Hyperfilm-Entwickler Curix 60 (Agfa Deutschland, Köln, BRD)

Kühlzentrifuge 5415 R (Eppendorf AG, Hamburg, BRD)

Lichtmikroskop DM4000 B (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, BRD)

PCR-Kammer (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD)

PCR-Machine T3 Thermocycler (Biometra GmbH i. L., Goettingen, BRD)

Pipetten (Eppendorf AG, Hamburg, BRD)

Roller Mixer SRT1 (Stuart, Barloworld Scientific, Staffordshire, Großbritannien)

Rotator SB2 (Stuart, Barloworld Scientific, Staffordshire, Großbritannien)

Schüttler Swip KS-10 (Edmund Bühler GmbH, Tübingen, BRD)

Spannungsquelle für PCR: Consort E835 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD)

Spannungsquelle für Western Blot:

- LKB GPS 200/400 (Pharmacia, GE Healthcare Europe GmbH, München, BRD)

- Power Pac 200 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, BRD)

Thermomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburg, BRD)

Western-Blot-Kammer X Cell Sure Lock (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Typisierung der Mäuse**

Die routinemäßige Typisierung der Mäuse wurde mit der Hilfe der PCR-Methode (engl. polymerase chain reaction) durchgeführt. Es wurden drei PCR-Protokolle angewandt: Fas-floxed/floxed, Fas-deleted und Keratin14-Cre. Als DNA-Quelle wurden Schwanzbiopsien von Jungtieren verwendet.

#### **2.2.1.1 DNA-Isolierung aus Mausschwanzbiopsien**

Eine Mausschwanzbiopsie (ca. 1 cm lang) wurde über Nacht bei 55°C mit 500 µl 0,8% Proteinase K/Lyse Puffer im Thermomixer verdaut. Der Inhalt wurde dann für 5 Min. bei 13200 rpm abzentrifugiert. Die DNA wurde mit 500µl Isopropanol aus dem Überstand gefällt und dann für 10 Min. bei 13200 rpm abzentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde für 10 Min. mit 70% Ethanol bei 13200 rpm in der Zentrifuge gewaschen, dann kurz an der Luft getrocknet und in 125µl 10mM Tris pH 8.0 über Nacht bei 37°C im Thermomixer gelöst.

#### **2.2.1.2 PCR-Protokolle**

Bei den PCR-Verfahren wurden folgende Reagenzien verwendet: Puffer (10x, ThermoPol Reaction Buffer, New England BioLabs Inc., Ipswich, USA), MgCl<sub>2</sub> (25mM, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, BRD), Desoxynuklotide (Deoxynucleotide Set, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, BRD), Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg, BRD), Taq DNA Polymerase (5000 U/ml, New England BioLabs Inc., Ipswich, USA).

Die Primer wurden 1:10 mit 10mM TRIS pH 8.0 verdünnt. Die Desoxynukleotide wurden als gleichteilige Mischung vorbereitet und mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnt. Pro Ansatz wurden 30µl Mastermix, bestehend aus Puffer, Desoxynucleotiden, Primer und Taq-Polymerase) und 2µl DNA-Lösung eingesetzt.

#### **2.2.1.2.1 Fas floxed/floxed**

Beim Fas-floxed/floxed-PCR-Protokoll wurden folgende Primer angewendet: F9F4 5' - TGC AGT TGC TGA GAT GAA CCA TTT TCT CTG TCT - 3', FHR 5' - GGC TTT GGA AAG GAA TTT CCT CCT AAG AGG - 3'. Der Mastermix wurde pro Probe wie folgt angesetzt: 3 µl Puffer, 2.1 µl MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µl dNTP's, 1 µl F9F4-Primer, 1 µl FHR-Primer, 0.8 µl Taq DNA Polymerase und destilliertes Wasser auf 30µl. Das Programm der PCR-Reaktion war: 3 Min. 94C°, 40 Zyklen: 30 Sek. 94C°, 30 Sek. 59C°, 30 Sek. 72C° und 3 Min. 72C°. Das zu erwartende DNA-Fragment war in Abhängigkeit vom Genotyp unterschiedlich groß: für die Wildtyp-Tiere +/+ 430 bp, für die Heterozygoten +/- 430 bp und 470 bp und für die Homozygoten fl/fl 470 bp.

#### **2.2.1.2.2 Fas deleted**

Beim Fas-deleted-PCR-Verfahren wurden folgende Primer angewendet: FHR 5' - GGC TTT GGA AAG GAA TTT CCT CCT AAG AGG - 3', LoxP E2-2 5' - GTC CTC TAT TAT CCT CAT CAT GAG - 3'. Der Mastermix wurde pro Probe wie folgt angesetzt: 3 µl Puffer, 2.1 µl MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µl dNTP's, 1 µl LoxP-E2-2-Primer, 1 µl FHR-Primer, 0.5 µl Taq DNA Polymerase und destilliertes Wasser auf 30µl. Das Programm der PCR-Reaktion war: 3 Min. 94C°, 35 Zyklen: 30 Sek. 94C°, 30 Sek. 58C°, 30 Sek. 72C° und 3 Min. 72C°. Die zu erwartende DNA-Fragment-Größe betrug für Fas-Knock-out-Tiere 260 bp.

#### **2.2.1.2.3 Keratin 14 Cre**

Beim Keratin14-Cre-PCR-wurden folgende Primer angewendet: SC1-101 5' – GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA C – 3', SC3-102 5' – CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC – 3'. Der Mastermix wurde pro Probe wie folgt angesetzt: 3 µl Puffer, 2.1 µl MgCl<sub>2</sub>, 1.25 µl dNTP's, 1µl SC1-101-Primer, 1µl SC-3-102-Primer, 0,5µl Taq DNA Polymerase und destilliertes Wasser auf 30µl. Das Programm der PCR-Reaktion war: 3 Min. 94C°, 30-mal: 30 Sek. 94C°, 30 Sek. 61C°, 30 Sek. 72C° und 3 Min. 72C°. Die zu erwartende DNA-Fragment-Größe betrug für Cre-positive Tiere 350 bp.

## **2.2.2 Nachweis der Epidermis-spezifischen Defizienz von Fas-Protein**

Die Epidermis-spezifische Fas-Deletion bei Knock-out-Mäusen wurde im Immunoblot nachgewiesen. Der Versuch wurde mit Ohrhaut von erwachsenen Tieren und Rumpfhaut von neugeborenen Mäusen unter Anwendung zweier verschiedener Antikörper durchgeführt. Bei erwachsenen Mäusen wurden ein Ohr, bei neugeborenen ein ca. 2x2cm-großes Stück Rumpfhaut und zusätzlich 2 Extremitätenteile pro Tier als Positivkontrolle entnommen.

### **2.2.2.1 Trennung von Epidermis und Dermis**

Zur Herstellung der Protein-Proben wurde die Epidermis von der Dermis mit Hilfe der Ammoniumthiocyanat-Lösung abgetrennt. Dazu wurde ein Stück Haut auf die gekühlte Ammoniumthiocyanat-Lösung, Dermis-Seite nach unten, gelegt, 30 Min. bei 4°C inkubiert und dreimal mit gekühltem PBS gewaschen. Anschließend wurde Epidermis von der Dermis mit Hilfe einer Pinzette bei 4°C abgezogen.

### **2.2.2.2 Herstellung von Protein-Proben**

Das Gewebe eines Tieres wurde in 300 µl RIPA(+)-Puffer und 3 µl PMSF-Lösung 2 Min. bei 30 Hz im Homogenisator gekühlt homogenisiert, 1 St. auf dem Rotator bei 4°C extrahiert und 10 Min. bei 4°C und 13200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Probenpuffer 3:1 verdünnt und 5 Min. auf 95°C im Wasserbad erhitzt.

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, USA laut Protokoll des Herstellers bestimmt. 2,5 µl Überstand wurde mit destilliertem Wasser 1:3 verdünnt und dann mit 200 µl 1:50 A-und-B-Reagenzmischung 30 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit dem Photometer gemessen.

### **2.2.2.3 Immunoblot zur Detektion von Fas in erwachsenen Mäusen**

Die Protein-Proben, je 30µg Protein pro Probe, wurden in Nu PAGE 4-12% oder 10% Bis-Tris Gelen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, BRD) 1 St. bei 150-200V aufgetrennt und dann vom Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (Nitrocellulose Membrane Filter Paper Sandwich 0,2µm Pore Size, Invitrogen, Karlsruhe, BRD) für 70 Minuten bei 30V übertragen. Die Membran wurde 2 Stunden in 5% Milchpulverlösung/ TBST blockiert.

Der primäre Antikörper (Kaninchen gegen Fas, M-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) wurde mit 5% Rinderserumalbumin 1:200 verdünnt. Die Membran wurde mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C auf dem Roller inkubiert und dann in TBST-Puffer 5 Min. gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Maus gegen Kaninchen IgG- $\gamma$ , mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, BRD) wurde mit 5% BSA/TBST 1:2000 verdünnt. Die Membran wurde dann 1 St. bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer mit dem zweiten Antikörper inkubiert.

Die Membran wurde dreimal 30 Min. mit TBST-Puffer auf dem Rollenmischer gewaschen, danach 2 Min. mit Chemilumineszenzreagens inkubiert. Der Hyperfilm (Amersham Biosciences UK Ltd, Buckinghamshire, Großbritannien) wurde auf die Membran aufgelegt und nach 30 Min. entwickelt.

#### **2.2.2.4 Beladungskontrolle (Immunoblot gegen Aktin, erwachsene Mäuse)**

Die Membran wurde für 1 Stunde in 5% Milchpulverlösung/ TBST geschüttelt. Der primäre Antikörper (Maus gegen Aktin; MP Biomedicals, Aurora, USA) wurde mit 2% Rinderserumalbumin/TBST 1:5000 verdünnt. Die Membran wurde 1 St. mit dem Antikörper bei RT auf dem Rollenmischer inkubiert und dann 5 Min. in PBS gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Ziege gegen Maus-IgG-Fab, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, BRD) wurde mit 2% Rinderserumalbumin/TBST 1:2000 verdünnt. Die Membran wurde 1 St. mit dem Antikörper bei Raumtemperatur auf dem Roller inkubiert.

Danach wurde sie dreimal für 30 Min. in TBST-Puffer auf dem Rollenmischer gewaschen und 2 Min. mit Chemilumineszenzreagens inkubiert. Der Hyperfilm wurde aufgelegt und nach 5 Sek. entwickelt.

#### **2.2.2.5 Immunoblot zur Detektion von Fas in neugeborenen Mäusen**

Die Durchführung erfolgte nach dem modifizierten Protokoll vom Abschnitt 2.2.2.3. Zur Blockierung wurde 3% Milchpulverlösung/PBS und als Waschlösung PBS/0.005% Tween verwendet. Der primäre Antikörper (Ratte gegen Fas; Upstate, New York, USA) wurde 1:1000 und der sekundäre Antikörper (Kaninchen gegen Ratte-Ig, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) 1:2000 in 3% Milchpulverlösung/PBS

verdünnt. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde die Membran zweimal für 5 Min. in PBS und 20 Min. in PBS/0.005 % Tween gewaschen.

#### **2.2.2.6 Beladungskontrolle (Immunoblot gegen Aktin, neugeborene Mäuse)**

Die Durchführung erfolgte nach dem modifizierten Protokoll vom Abschnitt 2.2.2.4. Zur Blockierung und Verdünnung der Antikörper wurde 3% Milchpulverlösung/PBS und als Waschlösung PBS/0.005% Tween verwendet.

### **2.2.3 Analyse des Phänotyps der Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen**

#### **2.2.3.1 Hautpräparate und HE-Färbung**

Die Vorbereitung der Hautpräparate und Durchführung der HE-Färbung erfolgten wie im Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben.

#### **2.2.3.2 Immunfluoreszenzfärbung gegen Epidermis-Differenzierungsmarker**

Die Paraffinschnitte wurden zweimal für 5 Min. in Xylol entparaffiniert und danach in Alkohol-Lösungen rehydratisiert: 5 Min. Isopropanol, 5 Min. 96% Ethanol, 5 Min. 75% Ethanol, 5 Min. 50% Ethanol.

Die Präparate (außer Keratin 14-Färbung) wurden danach für 3 Min. bei 37°C in 0.01% Trypsin/0.05M Tris anverdaut, kurz mit PBS gewaschen und 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 10% Ziege-Normalserum/PBS blockiert.

Die primären Antikörper gegen Keratin 1, Keratin 10, Keratin 14, Filaggrin, Loricrin, Involucrin (Kaninchen gegen Maus, Covance, Princeton, USA) wurden entsprechend 1:500, 1:500, 1:1000, 1:1000, 1:500 und 1:1000 mit der Antikörperverdünnungslösung (Antibody Diluent Solution with Background Reducing Components; Dako, Glostrup, Denmark) verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden mit den Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert und dann zweimal für 5 Min. in PBS (ABC) gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Ziege gegen Kaninchen, Alexa 488; Molecular Probes, Leiden, Holland) wurde 1:500 mit der Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Als Gegenfärbung wurde Propidiumjodid in der Konzentration 1µg/ml gleichzeitig benutzt. Die Schnitte wurden dann 1 Stunde bei RT mit der Lösung inkubiert.

Anschließend wurden sie 3 mal 10 Min. in PBS (ABC) gewaschen, für 10 Min. mit 4% PFA fixiert, dann kurz ins destillierte Wasser eingetaucht und mit Gelvatol eingedeckt.

## **2.2.4 Allergische Kontaktdermatitis**

### **2.2.4.1 Sensibilisierung und Auslösung der Reaktion**

Es kam ein etabliertes Protokoll, wie in [98a] beschrieben, zur Anwendung. Für die Versuche wurden die Mäuse mit folgender Narkose-Lösung betäubt: 500 µl Ketavet (Ketaminhydrochlorid 100mg/ml, Pharmacia GmbH, Erlangen, BRD), 250 µl Rompun 2% (Xylazinhydrochlorid, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, BRD), 4,5 ml NaCl 0,9% (DeltaSelect, Pfullingen, BRD). Die Lösung wurde steril vorbereitet und mit 1ml-Spritzen und 25G-Nadeln (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) intraperitoneal, das heißt in die Bauchhöhle, eingespritzt. Danach wurde Bepanthen-Nasen-und-Augensalbe (Roche Consumer Health Deutschland GmbH, Eppstein-Bremthal, BRD) auf die Augen aufgetragen, um die Austrocknung zu verhindern. Als Allergen wurde 2,4-di-Nitrofluorobenzen (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Munich, BRD) benutzt, das mit 4:1 Aceton/Olivenöl-Lösung verdünnt wurde.

#### **2.2.4.1.1 Sensibilisierungsphase**

In der Sensibilisierungsphase, am sog. Tag 0 des Experiments, wurden die Mäuse mit der Narkose-Lösung, wie oben beschrieben, betäubt. Das linke Ohr wurde zweimal mit der Mikrometerschraube gemessen, um den Ausgangswert der Ohrdicke festzustellen. Für die Sensibilisierung wurden den Tieren die Bäuche rasiert. Anschließend wurden auf die rasierte Stelle 25 µl 0,5% DNFB-Lösung pipettiert.

#### **2.2.4.1.2 Effektorphase**

Zur Auslösung der Effektorphase wurden die Mäuse am Tag 6 nach der Sensibilisierung mit der Narkose-Lösung betäubt. Das linke Ohr wurde zweimal mit der Mikrometerschraube gemessen, um den Ausgangswert der Ohrdicke festzustellen. Die Mittelwerte der Tage 0 und 6 diente als Ausgangswert für die Ohrdicke. Anschließend wurden auf das linke Ohr je 10 µl 0,2% DNFB-Lösung auf die Vorder- und auf die Rückseite pipettiert. An den Tagen 7-10

nach der Sensibilisierung, wurden die Mäuse betäubt. Das linke Ohr wurde zweimal mit der Mikrometerschraube gemessen, um die Ohrdicke zu messen.

#### **2.2.4.2 Ohrpräparate**

Die Tiere wurden 24 bzw. 96 Stunden nach Auslösung der Effektorphase mit Kohlendioxid getötet. Folgendes Gewebematerial wurde gesammelt: behandelte und unbehandelte Ohren für Kryoschnitte und Paraffinschnitte. Das Gewebe für Kryoschnitte wurde im Einbettmittel für Kryoschnitte (Tissue-Tek O.C.T. Compound, Sakura Finetek Zoeterwoude, Holland) eingebettet und sofort auf Trockeneis eingefroren. Das Gewebe für Paraffinschnitte wurde in 5% Formalin fixiert und im HypercenterXP-Automat (Shandon, Thermo Electron Corporation, Waltham, USA) entwässert, danach in Paraffin eingebettet. Die Blöcke wurden im Institut für Pathologie der Universität zu Köln und in der Abteilung für Dermatohistologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln geschnitten. Die Schnitte wurden auf Polysine-Objektträger (Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, BRD) aufgezogen. Die Haematoxylin-Eosin-Färbung erfolgte im Tissue-Tek DRS-Automaten (Sakura Finetek Zoeterwoude, Holland) in der Abteilung für Dermatohistologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln.

#### **2.2.4.3 Bestimmung der Anzahl der apoptotischen Keratinozyten bei allergischer Kontaktdermatitis**

Um die Anzahl der apoptotischen Keratinozyten im Gewebe zu bestimmen, wurden die Paraffinschnitte der Ohren gegen aktive Caspase-3 immunhistochemisch gefärbt. Als Bestätigung wurde zusätzlich eine TUNEL-Fluoreszenzfärbung (engl. TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling assay) durchgeführt. Es wurde jeweils ein Ohrschnitt pro Tier gefärbt. Von jedem Ohrschnitt wurden 10 zufällige Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung ausgewählt. Für jedes Feld wurden die Caspase-3- oder TUNEL-positiven Zellen in der Epidermis gezählt und die durchschnittliche Anzahl der 10 Felder bestimmt. Die Mittelwerte wurden dann mit dem zweiseitigen, unpaarigen t-Test bei Hauptversuchen und mit einseitigen, unpaarigen t-Test bei Kontrollversuchen im GraphPad Prism-Programm Version 4.01 statistisch ausgewertet.

### **2.2.4.3.1 Immunhistochemische Färbung gegen aktive Caspase-3**

Die Paraffinschnitte wurden zweimal für 5 Min. in Xylol entparaffiniert und danach in Alkohol-Lösungen rehydratisiert: 5 Min. Isopropanol, 5 Min. 96% Ethanol, 5 Min. 75% Ethanol, 5 Min. 50% Ethanol. Die endogene Peroxidase wurde 20 Min. mit Perhydrol/Methanol (2 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 70 ml Methanol) blockiert.

Die Gewebeschnitte wurden 5 Min. in PBS gewaschen, dann 15 Min. in Citrat-Puffer pH 6.0 bei 95°C im Wasserbad gekocht und anschließend 30 Min. in Citrat-Puffer bei RT gekühlt. Anschließend wurde für 1 St. mit 10% Schweine-Normalserum/PBS blockiert.

Der primäre Antikörper (Kaninchen gegen aktive Caspase-3, Cell Signaling Technology, Inc., Denver, USA) wurde 1:50 mit der Antikörperverdünnungslösung (Antibody Diluent Solution with Background Reducing Components; Dako, Glostrup, Denmark) verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert und dann dreimal für 5 Min. in PBS/0,005% Triton gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Ziege gegen Kaninchen-Immunglobuline, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Dako, Glostrup, Denmark) wurde 1:50 mit der Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Das Gewebe wurde anschließend 1 St. bei RT mit dem zweiten Antikörper inkubiert und dreimal 5 Min. in PBS/0,005% Triton gewaschen.

Die Färbung wurde dann 10 Min. mit der Chromogenlösung (Liquid 3,3'-diaminobenzidine Substrate Chromogen System; Dako, Glostrup, Denmark) entwickelt.

Es wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung als Gegenfärbung durchgeführt: 2 Min. Hämatoxylin, 10 Sek. destilliertes Wasser, 2 Min. 20% Salzsäure-Alkohol, 1.5 Min. Leitungswasser, 10 Sek. destilliertes Wasser, 5 Min. Eosin.

Anschließend wurden die Schnitte in Alkohol-Lösungen entwässert: 5 Sek. 75% Ethanol, 5 Sek. 96% Ethanol, 2 Min. Isopropanol, 3.5 Min. Xylol, in Entellan (Schnelleindeckmittel für Mikroskopie, Merck, Haar, BRD) eingebettet und mit Deckgläsern (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, BRD) eingedeckt.

### **2.2.4.3.2 TUNEL-Fluoreszenzfärbung**

Die TUNEL-Fluoreszenzfärbung wurde mit Hilfe des DeadEnd Fluorimetric TUNEL System, Promega GmbH, Mannheim, BRD laut Protokoll des Herstellers mit Modifikationen durchgeführt.

Die Paraffinschnitte wurden zweimal für 5 Min. in Xylol entparaffiniert und danach in Alkohol-Lösungen rehydratisiert: 5 Min. 99.8% Ethanol, 3 Min. 99.8% Ethanol, 3 Min. 95% Ethanol, 3 Min. 85% Ethanol, 3 Min. 70% Ethanol, 3 Min. 50% Ethanol.

Die Gewebeschnitte wurden dann 5 Min. in 0,85 % NaCl und weitere 5 Min. in PBS gewaschen, 15 Min. mit 4% PFA/PBS fixiert, zweimal 5 Min. in PBS gewaschen, 10 Min. mit 20 µg/ml Proteinase K bei RT inkubiert, 5 Min. in PBS gewaschen, 5 Min. mit 4% PFA/PBS fixiert, 5 Min. in PBS gewaschen und 10 Min. mit dem Äquilibrationpuffer (engl. Equilibration Buffer) bei RT äquilibriert.

TdT-Inkubationspuffer (engl. TdT Incubation Buffer) wurde pro Schnitt wie folgt angesetzt: 45µl Äquilibrationpuffer, 5 µl Nukleotidmischung (engl. Nucleotide Mix), 1 µl TdT-Enzym (engl. TdT Enzyme). Die Schnitte wurden danach 1 St. bei 37°C in einer Feuchtkammer mit TdT-Inkubationspuffer inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 15 Min. Inkubation mit 2-facher SSC-Lösung beendet.

Die Gewebeschnitte wurden dreimal 5 Min. in PBS gewaschen, 15 Min. mit 1 µg/ml Propidium Jodid/PBS bei RT inkubiert, dreimal 5 Min. in destilliertem Wasser gewaschen, in Gelvatol eingebettet und mit Deckgläsern eingedeckt.

#### **2.2.4.4 Bestimmung der Anzahl proliferierender Zellen bei allergischer Kontaktdermatitis**

Um die Anzahl proliferierender Zellen im Kontaktdermatitis-Gewebe zu bestimmen, wurden die Ohrkryoschnitte gegen das Ki-67-Antigen mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode gefärbt. Um das Ergebnis mit einer anderen Methode zu überprüfen, wurde der Einbau von BrdU als Marker für die Zellproliferation in der immunhistochemischen Färbung benutzt. Es wurde jeweils ein Ohrschnitt pro Tier gefärbt. Von jedem Ohrschnitt wurden 10 zufällige Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung für die Ki-67-Färbung und bei 400-facher Vergrößerung für BrdU-Färbung ausgewählt. Bei jedem Feld wurden danach entsprechend die Ki-67- oder die BrdU-positiven Zellen in der Epidermis gezählt und die durchschnittliche Anzahl positiver Zellen in 10 Feldern bestimmt. Die Mittelwerte dienten dann zur statistischen Auswertung mit dem zweiseitigen, unpaarigen t-Test im GraphPad Prism-Programm Version 4.01.

#### **2.2.4.4.1 Immunfluoreszenzfärbung gegen Ki-67**

Die Kryoschnitte wurden 10 Min. bei RT in Aceton fixiert und 30 Min. bei RT mit 10% Ziegen-Normalserum/PBS blockiert.

Der primäre Antikörper (Ratte gegen Ki-67, TEC-3; Dako, Glostrup, Denmark) wurde 1:50 mit 2% Rinderserumalbumin/PBS verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden dann 45 Min. bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem Antikörper inkubiert.

Die Gewebeschnitte wurden fünfmal für 5 Min. in PBS/0,05% Tween gewaschen. Der sekundäre Antikörper (Ziege gegen Ratte, Alexa 488; Molecular Probes, Leiden, Holland) wurde 1:500 in 2% Rinderserumalbumin/PBS oder in 1:8 Maus-Normalserum/PBS verdünnt. Als Gegenfärbung wurde Propidiumjodid in der Konzentration 1µg/ml gleichzeitig benutzt. Die Schnitte wurden dann 1 St. bei RT mit der Lösung inkubiert.

Anschließend wurden sie 5 mal 5 Min. in PBS/0,05% Tween gewaschen, dann kurz ins destillierte Wasser eingetaucht und mit Gelvatol eingedeckt.

#### **2.2.4.4.2 Immunhistochemische Färbung gegen BrdU**

2 St. vor der Tötung wurden den Mäusen 250µl 16mg/ml BrdU/PBS-Lösung (5-Bromo-2'-deoxyuridine; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD) intraperitoneal eingespritzt. Danach wurden die Hautproben entnommen und die immunhistochemische Färbung gegen BrdU im Gewebe der entzündeten Ohren durchgeführt.

Das Entparaffinieren und das Rehydratisieren wurden nach dem Protokoll von Abschnitt 2.2.3.2 durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden dann 5 Min. bei Raumtemperatur in Automation Buffer (Biomedica Corp., Foster City, USA) gewaschen und 30 Min. bei 37°C in vorerwärmter 2N HCl-Lösung inkubiert. Borat-Puffer wurde frisch aus den Borsäure- und Borax-Stocklösungen angesetzt und bei 37°C erwärmt. Die Schnitte wurden danach 3 Min. bei Raumtemperatur im erwärmten Borat-Puffer gewaschen.

Das Gewebe wurde für 3 Min. bei 37°C in 0.01% Trypsin/0.05M Tris anverdaut, 2 Min. in destilliertem Wasser gewaschen, 5 Min. bei Raumtemperatur in Automation Buffer gewaschen, 20 Min. in 10% Ziegen-Normalserum/PBS blockiert. Dann wurde die endogene Peroxidase 20 Min. mit Peroxidaseblockierungslösung (Peroxidase Block; Dako, Glostrup, Denmark) blockiert. Die Schnitte wurden anschließend für 5 Min. in PBS gewaschen.

Der primäre Antikörper (Maus gegen BrdU, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) wurde 1:50 mit 1% Rinderserumalbumin verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden über Nacht bei 4°C

mit dem Antikörper inkubiert, einmal 5 Min. in PBS/0.005% Triton und dann zweimal für 5 Min. in PBS gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Ziege gegen Maus-Immunglobuline, mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt; Dako, Glostrup, Denmark) wurde 1:50 mit Antikörperverdünnungslösung (Dako, Glostrup, Denmark) verdünnt. Die Ohrschnitte wurden 1 St. mit dem Antikörper bei RT inkubiert, einmal 5 Min. in PBS/0.005% Triton gewaschen, dann zweimal 5 Min. in PBS gewaschen, 10-30 Min. mit der Chromogenlösung (Liquid 3,3'-diaminobenzidine Substrate Chromogen System; Dako, Glostrup, Denmark) entwickelt und anschließend für 5 Min. in PBS gewaschen.

Es wurde eine Haematoxylin-Eosin-Färbung nach dem Protokoll aus Abschnitt 2.2.4.2 als Gegenfärbung durchgeführt. Zum Schluß wurden die Schnitte in Entellan eingebettet und mit Deckgläsern eingedeckt.

#### **2.2.4.5 Expression und Aktivität antiapoptotischer Signale in der Epidermis bei allergischer Kontaktdermatitis**

##### **2.2.4.5.1 Immunfluoreszenzfärbung gegen Bcl-xl**

Das Entparaffinieren und das Rehydratisieren wurden nach dem Protokoll vom Abschnitt 2.2.3.2 durchgeführt. Die Gewebeschnitte wurden dann 20 Min. in Citrat-Puffer pH 6.0 bei 95°C im Wasserbad gekocht und anschließend 30 Min. in Citrat-Puffer bei RT gekühlt. Die Proteine wurden 1 Stunde mit Proteinblockierungslösung (Protein Block; Dako, Glostrup, Denmark) blockiert.

Der primäre Antikörper (Kaninchen gegen Bcl-xl; Cell Signaling Technology, Inc., Denver, USA) wurde 1:250 mit der Antikörperverdünnungslösung (Antibody Diluent Solution with Background Reducing Components; Dako, Glostrup, Denmark) verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden mit dem Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert, dann einmal 5 Min. in PBS/0.005% Triton gewaschen und anschließend zweimal 5 Min. in PBS gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Ziege gegen Kaninchen, Alexa 488; Molecular Probes, Leiden, Holland) wurde 1:500 mit Antikörperverdünnungslösung (Dako, Glostrup, Denmark) verdünnt. Als Gegenfärbung wurde Propidiumjodid in der Konzentration 1µg/ml verwendet. Die Schnitte wurden dann 1 St. bei RT mit der Lösung inkubiert, einmal 5 Min. in PBS/0.005% Triton und zweimal 5 Min. in PBS gewaschen. Am Ende wurden die Schnitte 5 Min mit 1% PFA fixiert, in Entellan eingebettet und mit Deckgläsern eingedeckt.

#### **2.2.4.5.2 Immunfluoreszenzfärbung gegen pAKT**

Die Kryoschnitte wurden getrocknet, dann 15 Min. mit 4% PFA/2% Eisessig/PBS fixiert, zweimal 5 Min. in PBS gewaschen, 2 Min. mit 95:5 Methanol/Eisessig bei 0°C inkubiert, 5 Min. mit PBS gewaschen und 30 Min. mit 8% BSA/PBS bei RT blockiert.

Der primäre Antikörper (Kaninchen gegen Phospho-AKT; Cell Signaling Technology, Inc., Denver, USA) wurde 1:50 mit Antikörperverdünnungslösung (Dako, Glostrup, Denmark) verdünnt. Die Schnitte wurden mit dem Antikörper über Nacht bei 4° inkubiert und danach dreimal in PBS gewaschen.

Der sekundäre Antikörper (Ziege gegen Kaninchen, Alexa 488; Molecular Probes, Leiden, Holland) wurde 1:500 mit Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Die Gewebeschnitte wurden mit dem Antikörper 45 Min. bei RT inkubiert, dreimal in PBS gewaschen, 5 Min. mit 0,5 µg/ml DAPI/PBS oder 15 Min. mit 1 µg/ml Propidiumjodid/PBS bei RT inkubiert und 5 Min. in PBS gewaschen,

Am Ende wurden die Schnitte 5 Min. mit 1% PFA fixiert, kurz in destilliertes Wasser getaucht, in Gelvatol eingebettet und mit Deckgläsern eingedeckt.

.

#### **2.2.4.5.3 Immunfluoreszenzfärbung gegen pERK (Phospho-p44/42MAPK)**

Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll aus Abschnitt 2.2.4.5.2 Der primäre Antikörper (Kaninchen gegen Phospho-p44/42MAPK; Cell Signaling Technology, Inc., Denver, USA) wurde 1:100 mit Antikörperverdünnungslösung verdünnt.

### **2.2.5 UVB-induzierte Dermatitis**

#### **2.2.5.1 UVB-Bestrahlung der Mäuse**

Die Bestrahlung der Mäuse wurde im Institut für Virologie der Universität zu Köln durchgeführt. Die Mäuse wurden zunächst mit der Narkose-Lösung betäubt. Das Protokoll für die Betäubung befindet sich im Abschnitt 2.2.4.1. Anschließend wurden die Augen mit Bepanthen-Nasen-und-Augensalbe abgedeckt, um die Augen-Schäden vorzubeugen. Danach wurde eine ca. 2x2cm-große Oberfläche am Rücken der Maus rasiert. Die Mäuse wurden mit einer Dosis von 0.3 J/cm<sup>2</sup> UVB-Licht bestrahlt. Als UVB-Strahlenquelle diente eine Waldmann-Lampe (Herbert Waldmann GmbH & Co. KG, Villingen-Schwenningen, BRD).

### **2.2.5.2 Hautpräparate**

Die Mäuse wurden 18 bzw. 24 Stunden nach der Bestrahlung mit Kohlendioxid getötet und es wurden Hautproben für Paraffin- und Kryopräparate entnommen. Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte wie im Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben.

### **2.2.5.3 Bestimmung der Zahl von Sonnenbrandzellen (sun burn cells) in der UVB-bestrahlten Haut**

Die Kriterien zur Unterscheidung der Sonnenbrandzellen von anderen Zellen der Epidermis waren ein kondensierter Zellkern und ein eosinophiles Zytoplasma.

Es wurde jeweils ein Ohrschnitt pro Tier mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode gefärbt. Von jedem Ohrschnitt wurden 15 zufällige Gesichtsfelder bei 400-facher Vergrößerung ausgewählt. Für jedes Feld wurde danach die Anzahl der Sonnenbrandzellen und am Schluss die Durchschnittszahl der 15 Felder bestimmt. Die Mittelwerte wurden dann mit dem zweiseitigen, unpaarigen t-Test im GraphPad Prism-Programm Version 4.01 statistisch ausgewertet.

## **2.2.6 Experimente mit kultivierten Keratinozyten**

### **2.2.6.1 Isolierung der primären murinen Keratinozyten**

Die primären murinen Keratinozyten wurden aus der Epidermis der neugeborenen, nicht mehr als 3-Tage-alten Mäuse isoliert. Die Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Die Körper wurden dann 1 Stunde auf Eis gekühlt und danach mit folgenden Lösungen gewaschen: 1 Min. 50% Betaisodona Iodine/PBS, 2 Sek. PBS, 1 Min. 70% Ethanol, 2 Sek. sterile PBS-Lösung. Auf einer sterilen Schale wurden Schwanz und Extremitäten abgeschnitten und später für die Typisierung benutzt. Die Haut wurde abgezogen und auf 0,025% Trypsin/PBS/EDTA, mit der Epidermis nach oben, über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Epidermis von der Dermis mit Hilfe einer Pinzette abgetrennt. Die Epidermis wurde mit zwei Skalpelln auf einer Schale zerkleinert. Die epidermalen Fragmente von einer Maus wurden dann in 1,5 ml FAD-Medium für 30 Min. bei RT und 1000 rpm in einem Thermomixer resuspendiert.

Die Suspension wurde dann auf Collagen-I-beschichteten 6-Well-Platten (BioCoat, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) ausplattiert und mit 3T3-Fibroblasten in konditioniertem Medium bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.

### **2.2.6.2 Zellkultur**

Die Keratinozyten wurden auf Collagen-I-beschichteten Zellkulturschalen (BD Biosciences, Heidelberg, Germany) mit 3T3-Fibroblasten als Feeder in FAD-Medium bei 32°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt, die abgestorbenen 3T3-Fibroblasten wurden durch frische Zellen systematisch ersetzt.

#### **2.2.6.2.1 Beschichtung der Schalen**

Die Schalen wurden mit Rinder-Collagen Typ I (Biochrom AG, Berlin, BRD) beschichtet. 2 mg/ml Collagen/0,1% Essigsäure – Lösung wurde mit PBS auf 20 µg/ml verdünnt. Die Lösung wurde dann auf die Platten aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Platten wurden zweimal mit PBS gewaschen.

#### **2.2.6.2.2 Züchtung der 3T3-Fibroblasten**

Die 3T3-Fibroblasten vom Stamm J2 wurden in DMEM-Medium (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Biochrom AG, Berlin, BRD) mit 10% FCS (engl. fetal calf serum, fötales Rinderserum, Biochrom AG, Berlin, BRD) kultiviert [66]. Bevor sie für die Keratinozytenkultur benutzt wurden, wurden sie mit 0,004 mg/ml Mitomycin C (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD) für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und mit 0,1% Trypsin/EDTA-Lösung (Seromed GmbH, Wien, Österreich) bei 37°C nach 1 Min. Inkubation abgelöst.

#### **2.2.6.2.3 Vorbereitung des konditionierten FAD-Mediums**

Das konditionierte FAD-Medium wurde aus dem Kulturüberstand von Wildtyp-Mauskeratinozyten nach ein bis zwei Tagen Kultur gewonnen, mit Sterilfilter (0,2 µm, Pall Corporation, Dreieich, BRD) filtriert und mit frischem FAD-Medium 1:1 verdünnt.

### **2.2.6.3 Bestimmung der Proliferation von kultivierten Keratinozyten**

Die Proliferation der kultivierten Keratinozyten wurde mit der Hilfe von Wachstumskurven und BrdU-Färbung mit Auswertung der Anzahl BrdU-positiver Zellen bestimmt.

#### **2.2.6.3.1 Wachstumskurven**

Die Zellen wurden auf Collagen-I-beschichteten 6-Well-Platten (BioCoat, BD Biosciences, Heidelberg, Germany) ohne 3T3-Fibroblasten in konditioniertem Medium ausplattiert, je 30000 Zellen pro Schale und 5 Meßpunkte pro Zelllinie. Die Zellen wurden an verschiedenen Kulturtagen mit Trypsin/ EDTA von den Schalen abgelöst. Nach Resuspendierung wurde die Zellzahl mit dem Casy-Schärfe-System (Schärfe System GmbH, Reutlingen, BRD) nach den Vorgaben des Herstellers gemessen.

#### **2.2.6.3.2 BrdU-Färbung der Zellen**

Chamberslides (Lab-Tek Permanox Chamber Slide, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA) wurden mit Collagen I wie unter Punkt 2.2.6.2.1 beschrieben beschichtet. Es wurden 30000 Zellen pro Slide ausplattiert und sowohl in konditioniertem, als auch in normalem FAD-Medium über Nacht kultiviert.

Die Zellen wurden mit frischem Medium versehen und nach 2 Stunden wurde 1µM BrdU (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD) hinzugegeben und die Zellen für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Fixation mit 70% Ethanol für 30 Min. bei Raumtemperatur und anschließender Trocknung wurden die Zellen für 2 Min. mit 0,07N NaOH bei Raumtemperatur inkubiert und mit PBS pH 8,5 gewaschen.

Der primäre Antikörper gegen BrdU (Maus gegen BrdU, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) wurde 1:5 mit PBS/0,5% Tween verdünnt und für 45 Min. bei RT auf die Zellen gegeben. Der sekundäre Antikörper (Ziege gegen Maus IgG1, Alexa 488; Molecular Probes, Leiden, Holland) wurde 1:500 mit PBS/0,5% Tween verdünnt. Die Zellen wurden mit dem Antikörper 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach 10 Min. mit 1µg/ml Propidiumjodid/PBS gegengefärbt.

Die Zellen wurden dreimal 15 Min. mit PBS gewaschen, 10 Min. mit 4% Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, kurz mit destilliertem Wasser gespült und in Gelvatol eingebettet.

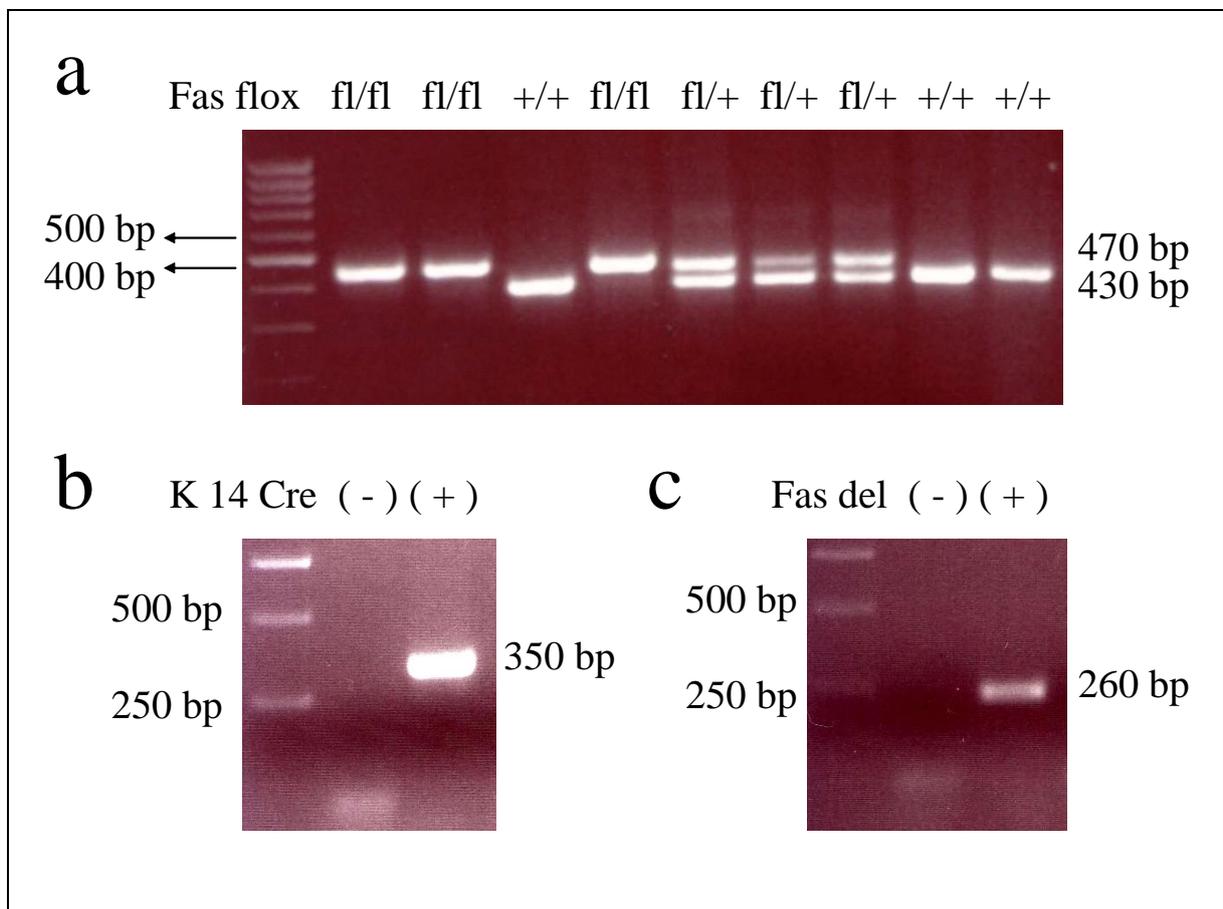
Es wurde der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Zellen bestimmt. Dazu wurden min. 150 Zellen pro Ansatz unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Vergrößerung von 200x ausgezählt. Die Werte wurden dann mit dem zweiseitigen, unpaarigen t-Test im GraphPad Prism-Programm Version 4.01 statistisch ausgewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis der Epidermis-spezifischen Deletion des Fas-Proteins

##### 3.1.1. PCR-Analyse

Der Genotyp der Mäuse wurde mittels PCR überprüft (Abb. 3.1). Durch die PCR-Bedingungen konnten Wildtyp-Fas-Allele (Fragmentlänge: 430 bp) von geflochten Fas-Allelen (Fragmentlänge: 470 bp) unterschieden werden. Geflochte Fas-Allele enthalten *loxP*-Sequenzen (Abb. 3.1 a).



**Abb. 3.1** Typisierung der Mäuse, Beispielbild. a) *Fas* floxed: *fl/fl* (ein 470 bp langes Fragment) – homozygot für “floxed”-Sequenz, d.h. beide *Fas*-Allele enthalten *loxP*-Sequenz; *fl/+* (ein 470 bp und ein 430 bp langes Fragment) – heterozygot für “floxed”-Sequenz, d.h. nur ein *Fas*-Allel enthielt *loxP*-Sequenz; *+/+* (ein 430 bp langes Fragment) – Wildtyp; b) *Keratin 14 Cre*: - (keine Bande) – Wildtyp; + (ein 350 bp langes Fragment) – Anwesenheit des *Cre*-Rekombinase-Gens unter der Kontrolle des *Keratin-14*-Promoters; c) *Fas* deleted: - (keine Bande) – Wildtyp; + (ein 260 bp langes Fragment) – min. ein Allel des *Fas*-Gens nicht funktional, d.h. Exon IX in minimum einem *Fas*-Allel durch *Cre*-Rekombinase ausgeschnitten.

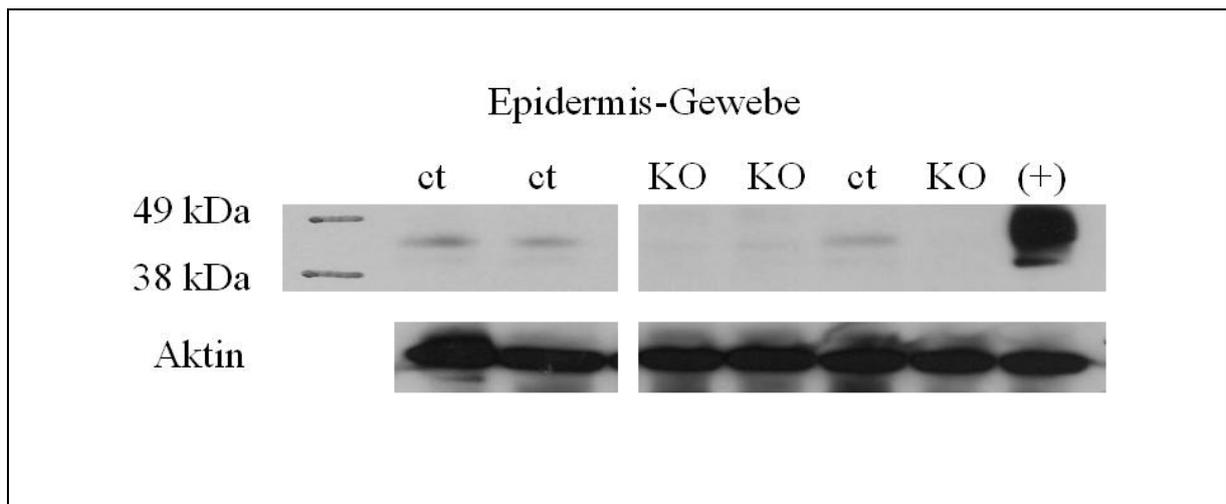
Zusätzlich wurde die Anwesenheit des Cre-Rekombinase-Gens unter der Kontrolle des Keratin-14-Promoters (Fragmentlänge: 350 bp) nachgewiesen (Abb. 3.1 b). Bei Präsenz der *loxP*-Sequenzen schneidet die Cre-Rekombinase das Exon IX vom Fas-Gen aus, wodurch das funktionale Protein Fas in Keratin-14 exprimierenden Zellen deletiert wird. Die Deletion des Fas-Gens äußert sich in der PCR durch ein 260 bp – langes Fragment (Abb. 3.1 c).

Mäuse, die in der PCR-Typisierung den Genotyp: Fas fl/fl und K 14 Cre (+) haben, sind Epidermis-spezifische Fas-Knock-outs, d.h. sie weisen die Fas- Deletion in Zellen auf, die Keratin 14 produzieren. Hauptsächlich geht es hier um epidermale Keratinozyten. Als Bestätigung erscheint in “Fas deleted“ PCR eine Bande.

### 3.1.2. Western blot Analyse

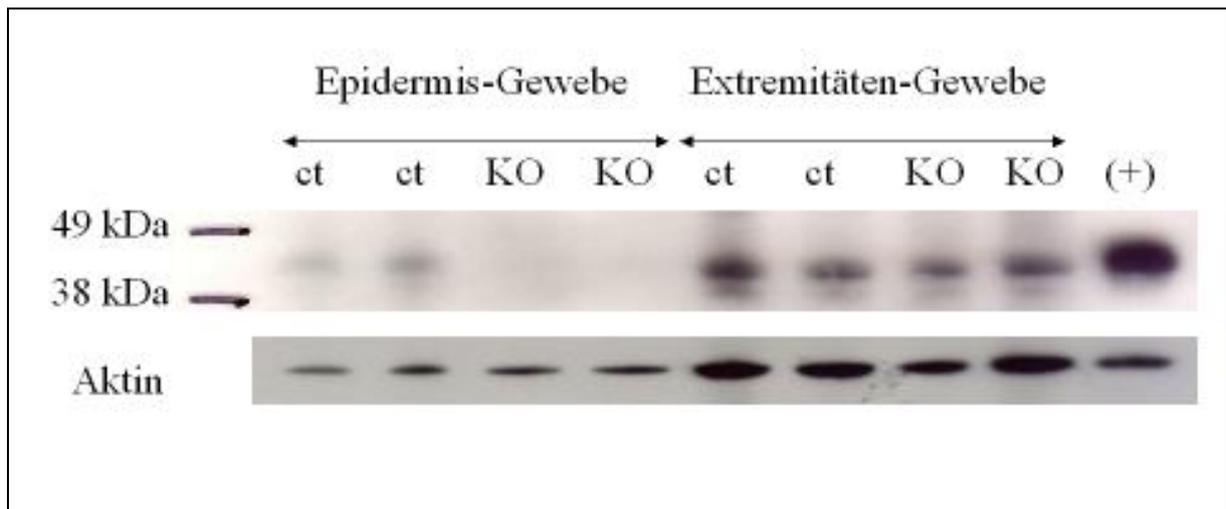
Es wurde ein Western blot durchgeführt, um nachzuweisen, dass das Fas-Protein in der Epidermis von den Knock-out-Mäusen nicht vorhanden ist.

In dem Versuch wurde Ohrepidermis von 6 erwachsenen Tieren (3 Knock-out- und 3 Kontrollmäusen) sowie Epidermis vom Rücken und Extremitätengewebe von 4 neugeborenen Mäusen (2 Knock-out- und 2 Kontrollmäusen) benutzt. Ohrepidermis ist die von einem Ohr mittels Ammonium Thiocyanat selektiv abgelöste Epidermis; unter Extremitätengewebe ist das gesamte Gewebe eines Beines (also einschließlich Knorpel, Knochen, Bindegewebe, Haut usw.) zu verstehen.



**Abb. 3.2** Western blot zum Nachweis der Epidermis-spezifischen Fas-Deletion in der Ohr-Epidermis von erwachsenen Knock-out-Mäusen (KO). Präsenz des Fas-Proteins in der Epidermis bei Kontrollmäusen (ct) sowie in Thymus-Extrakt als Positivkontrolle (+).

Der Western blot zeigte bei allen Epidermis-Proben von Wildtyp-Mäusen in der 45kDa-Höhe ein positives Signal des Fas-Proteins, während bei allen Knock-out-Epidermis-Proben kein Signal zu sehen war (Abb. 3.2, 3.3). Das Ergebnis war identisch für erwachsene und neugeborene Tiere. Im Extremitätengewebe dagegen war das Fas-Signal überall detektierbar (Abb. 3.3.). Zur Sicherung der gleichmäßigen Beladung der Bahnen wurde eine Beladungskontrolle mit einem Antikörper gegen Aktin mitgeführt.

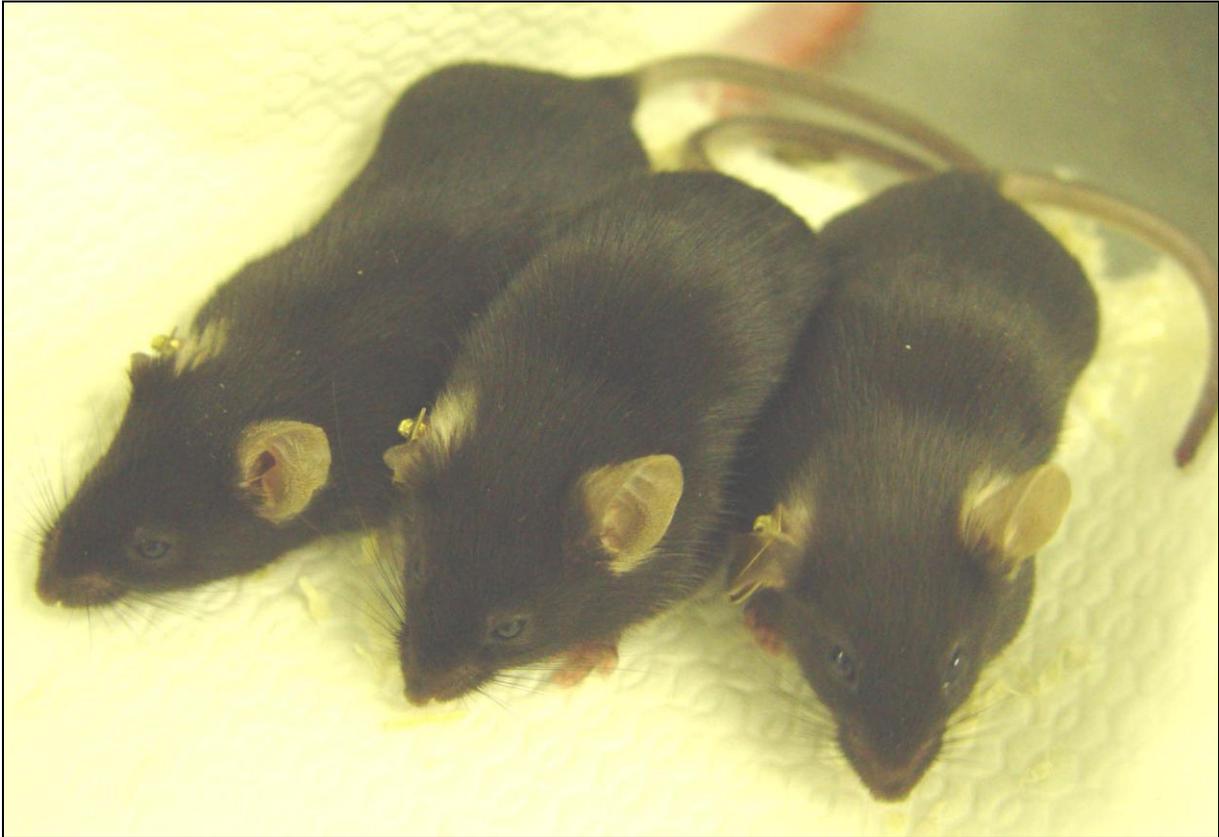


**Abb. 3.3** Western blot zum Nachweis der Epidermis spezifischen Fas-Deletion in der Rückenhaut von neugeborenen Knock-out-Mäusen (KO). Präsenz des Fas-Proteins in der Epidermis von Kontrollmäusen (ct) und im Extremitäten-Gewebe bei allen Mäusen, Thymus-Extrakt als Positivkontrolle (+).

### 3.2 Spontaner Phänotyp der Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse

#### 3.2.1 Phänotyp - makroskopisch

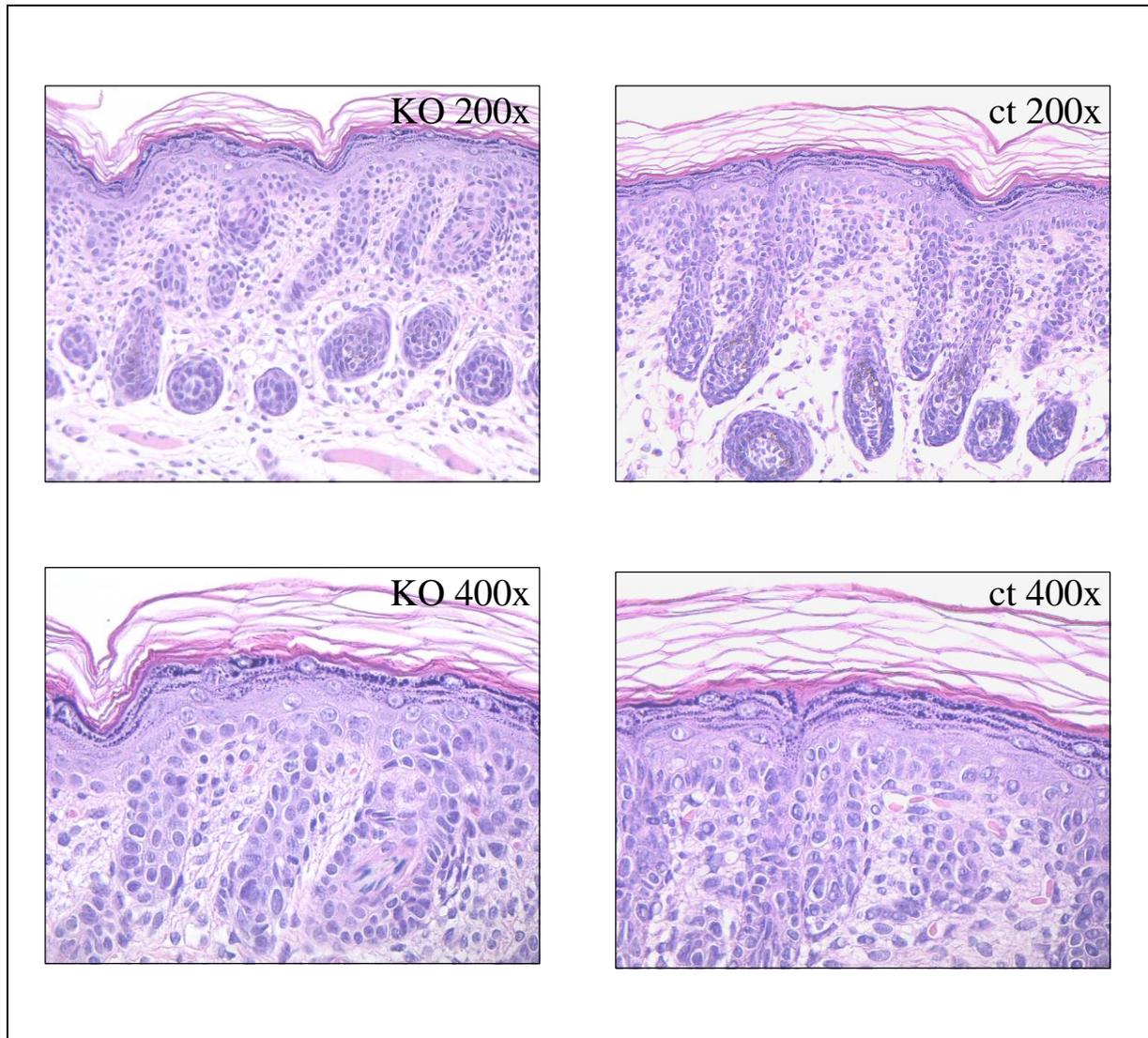
Makroskopisch zeigten die Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse keine Auffälligkeiten. Sie entwickelten sich normal und waren von Wild-Typ-Tieren im gleichen Wurf äußerlich nicht zu unterscheiden (Abb. 3.4).



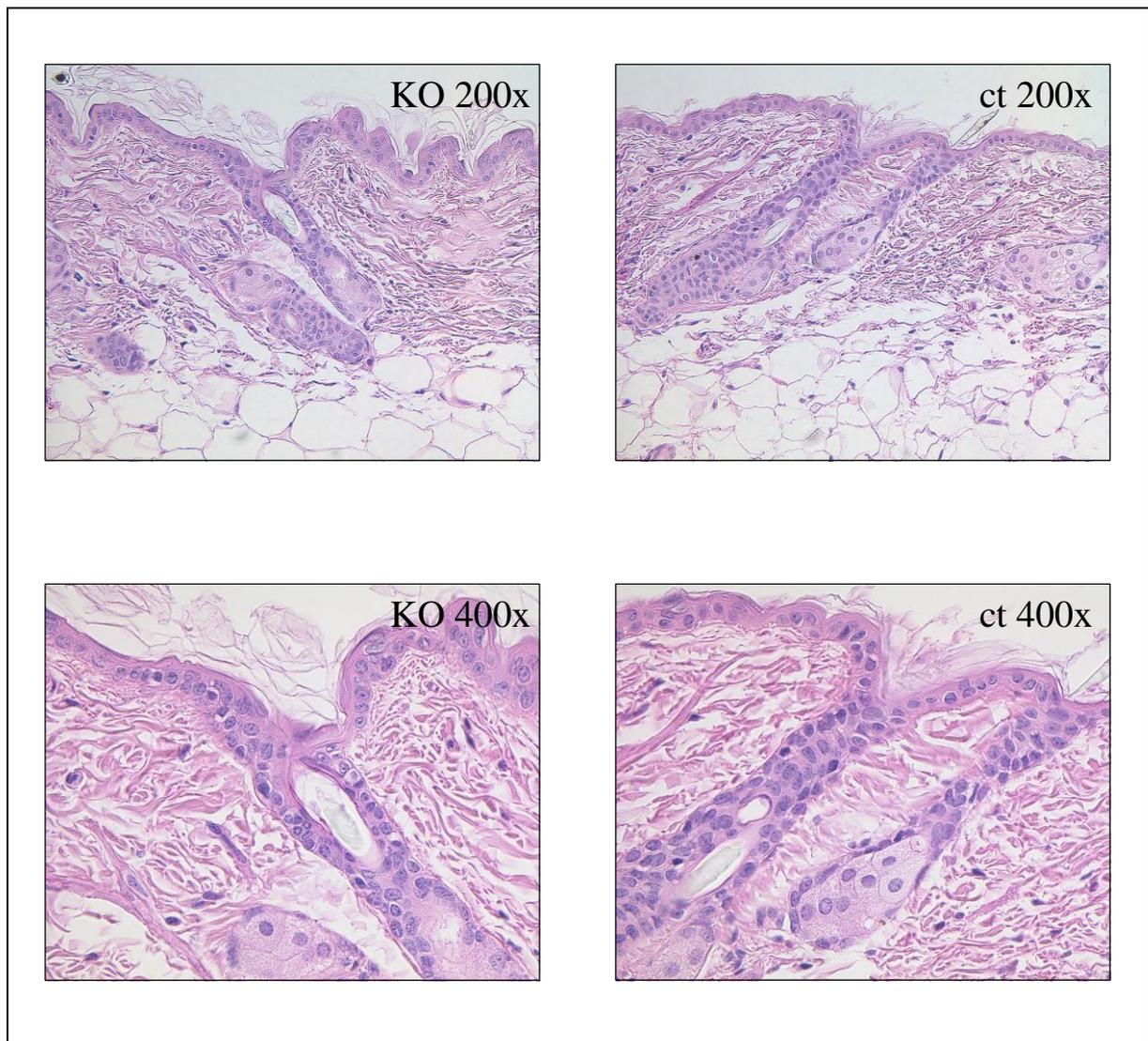
**Abb. 3.4** Unauffälliges Erscheinungsbild der Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse. 3 männliche Tiere vom gleichen Wurf (von der linken Seite): *Fas fl/fl Cre -*, *Fas fl/+ Cre +* (Heterozygot), *Fas fl/fl Cre +* (Homozygot).

### 3.2.2 Phänotyp - mikroskopisch

Die histologische Analyse des Hautphänotyps erfolgte an HE-gefärbten Paraffin-Schnitten von Hautbiopsien. Hier waren keine Unterschiede zwischen Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen und Kontrollen feststellbar (Abb. 3.5, 3.6).

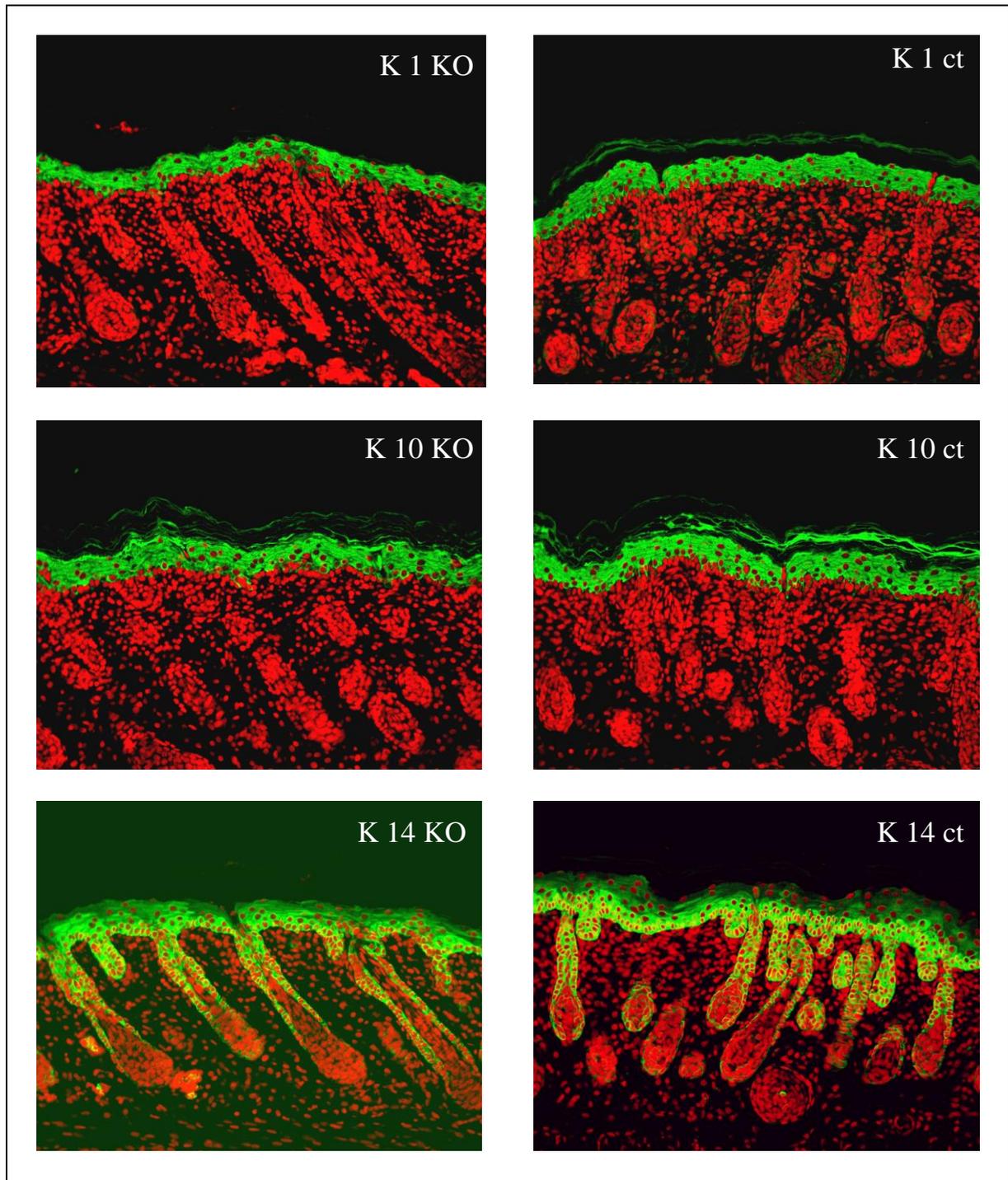


**Abb. 3.5** Mikroskopische Bilder von Hautschnitten von neugeborenen Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct). (HE-Färbung bei 200- und 400-facher Vergrößerung)

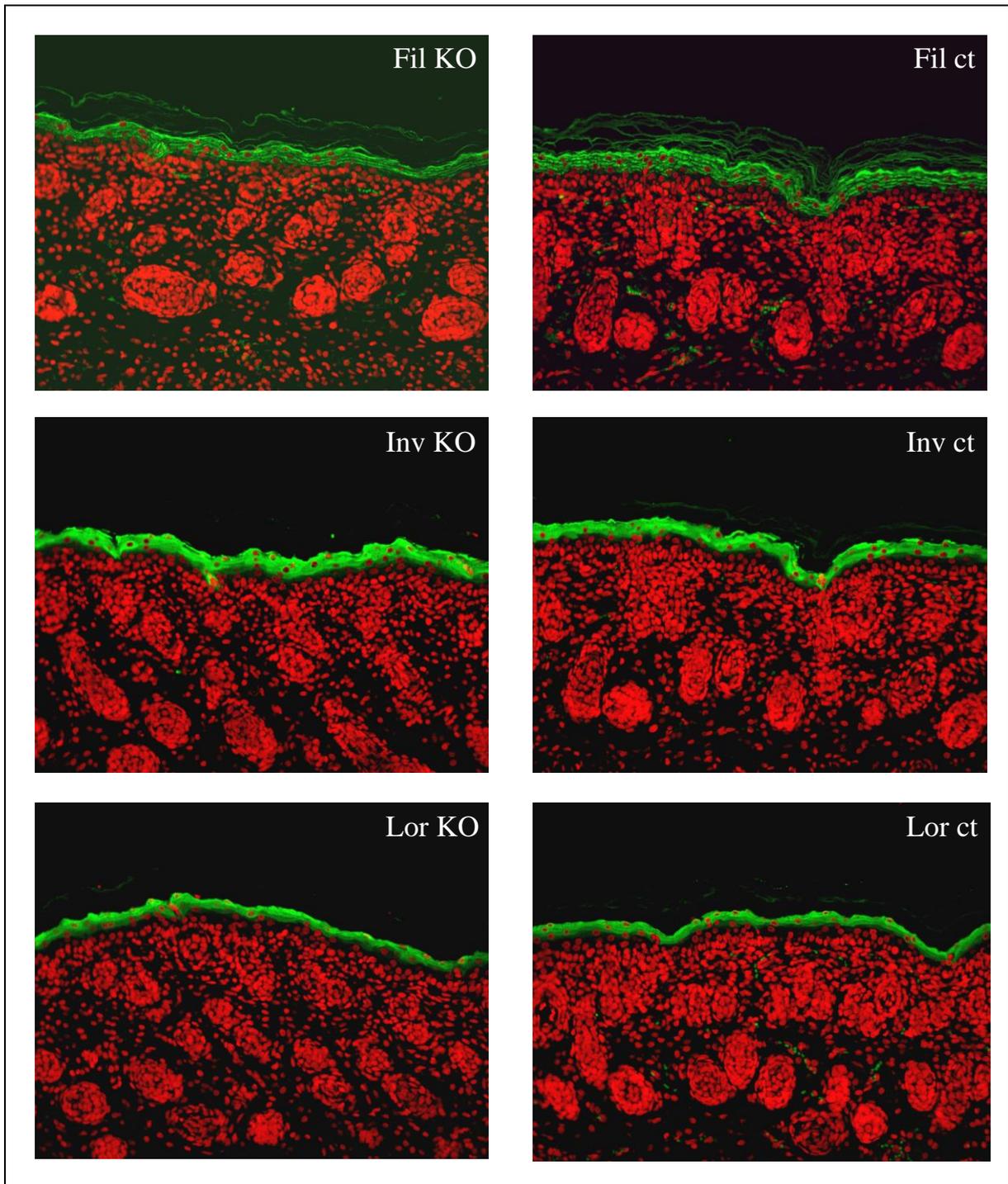


**Abb. 3.6** Mikroskopische Bilder von Hautbiopsien von erwachsenen Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct). (HE-Färbung bei 200- und 400-facher Vergrößerung)

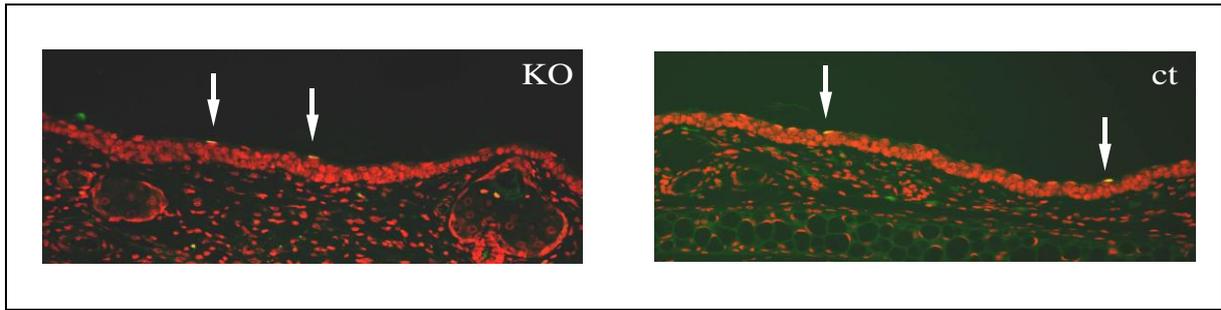
Immunfärbung gegen die differenzierungsabhängig exprimierte Proteine: Keratin-1, Keratin-10, Keratin-14, Filaggrin, Involucrin und Loricrin sowie gegen die Apoptose-Marker: aktive Caspase-3 (Daten nicht gezeigt) und TUNEL (engl. TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling assay), und den Proliferationsmarker Ki-67 (Daten nicht gezeigt) zeigten keine Unterschiede im Vergleich zwischen Knock-out-Mäusen und Kontrollen. Bei der Caspase-3-Färbung wurden keine positiven Zellen in der Epidermis gefunden, in der TUNEL-Färbung waren einzelne positive Zellen im *Stratum corneum* erkennbar. Die Ki-67-Färbung zeigte positive Zellen vorwiegend im Bereich des Haarfollikel-Bulbus (Abb. 3.7, 3.8, 3.9).



**Abb. 3.7** Expression von Keratin-1 (K1), Keratin-10 (K10) und Keratin-14 (K14) in der Haut von neugeborenen Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct). (Immunfluoreszenzfärbung bei 200-facher Vergrößerung, grün – Signal der Immunfärbung, rot – Zellkerne)



**Abb. 3.8** Expression von *Filaggrin (Fil)*, *Involucrin (Inv)* und *Loricrin (Lor)* in der Haut von neugeborenen *Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen (KO)* und *Kontrollen (ct)*. (Immunfluoreszenzfärbung bei 200-facher Vergrößerung, grün – Signal der Immunfärbung, rot – Zellkerne)



**Abb. 3.9** TUNEL-positive Zellen in der gesunden Haut von erwachsenen Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct), die Pfeile zeigen positive Keratinozyten im Stratum corneum. (TUNEL-Färbung bei 200-facher Vergrößerung, grün – Signal der TUNEL- Färbung, rot – Zellkerne)

### 3.3 Allergische Kontaktdermatitis

Bei Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen und Wildtyp-Mäusen als Kontrollen wurde eine allergische Kontaktdermatitis an der Ohrhaut ausgelöst. Die Mäuse wurden zuerst mit dem Allergen (DNFB) sensibilisiert (Sensibilisierung) und 6 Tage später wurde die Reaktion ausgelöst (Auslösung).

#### 3.3.1 Zunahme der Ohrdicke

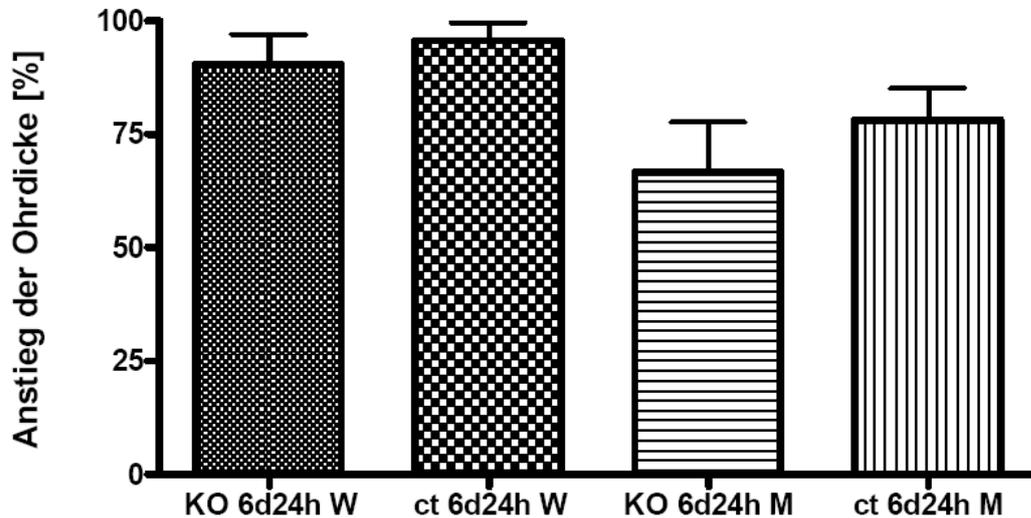
Um das Ausmaß der entzündlichen Reaktion bei der Kontaktdermatitis in Fas-Knock-out-Mäusen festzustellen, wurde die Dicke des behandelten Ohres gemessen.

Es wurde bei insgesamt 30 Tieren im Alter von 7 bis 12 Wochen, 15 KO-Tieren: 9 Weibchen, 7 Männchen und 15 Kontrolltieren: 6 Weibchen, 8 Männchen gemessen.

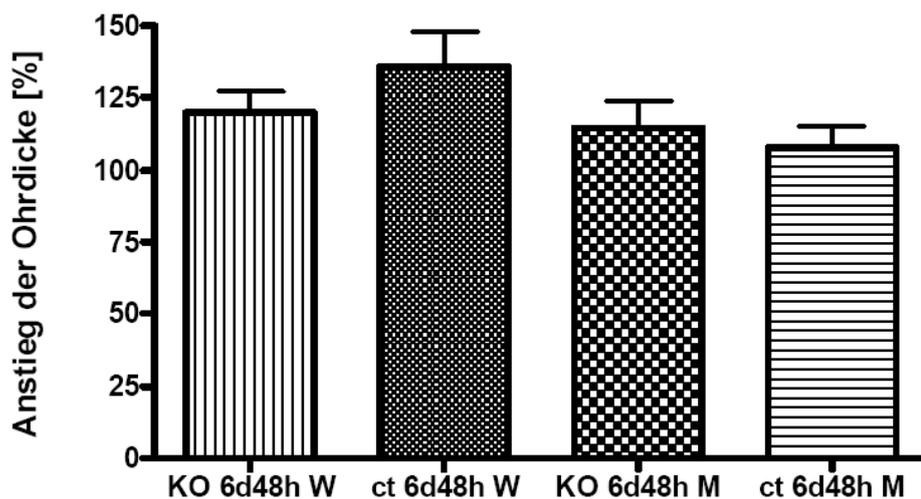
Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Zunahme der Ohrdicke 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Auslösung der Reaktion (die Auslösung erfolgte 6 Tage nach der Sensibilisierung) zwischen Knock-out-Mäusen und Kontrollmäusen gefunden (Abb. 3.10, 3.11, 3.12, 3.13, 3.14).

Um mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der Zunahme der Ohrdicke zu erfassen, wurden die Tiere in vier Gruppen eingeteilt und nur jeweils die weiblichen und die männlichen Gruppen verglichen. Die männliche Gruppe entwickelte ein weniger ausgeprägtes Ödem im Vergleich zur weiblichen Gruppe, die Schwellung ließ bei den Männchen auch früher nach. 96 Stunden nach Beginn der Kontaktdermatitis wurde bei ihnen ein Rückgang

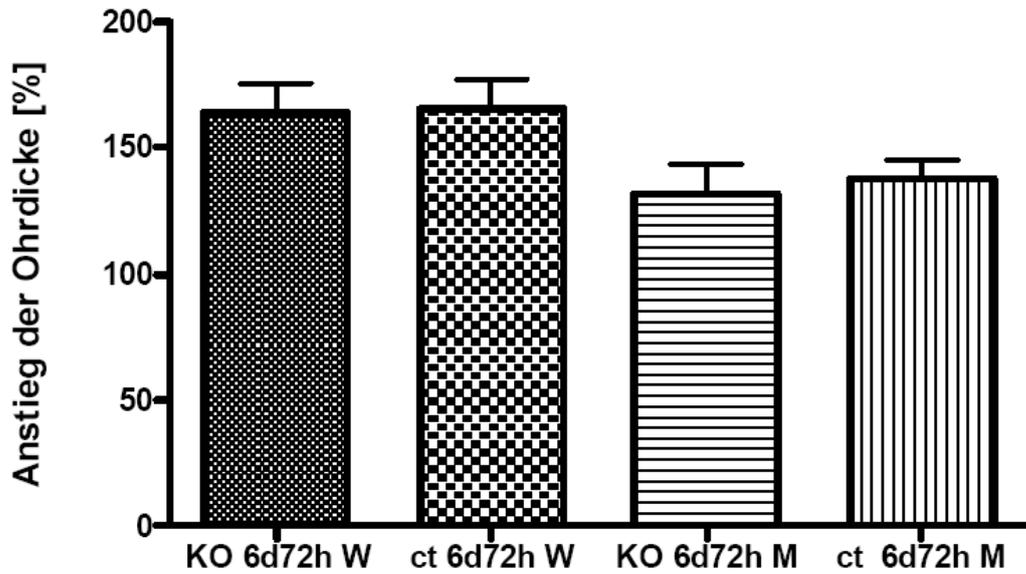
der Ohrschwellung registriert, während bei den Weibchen die Schwellung weiter anstieg (Abb. 3.14).



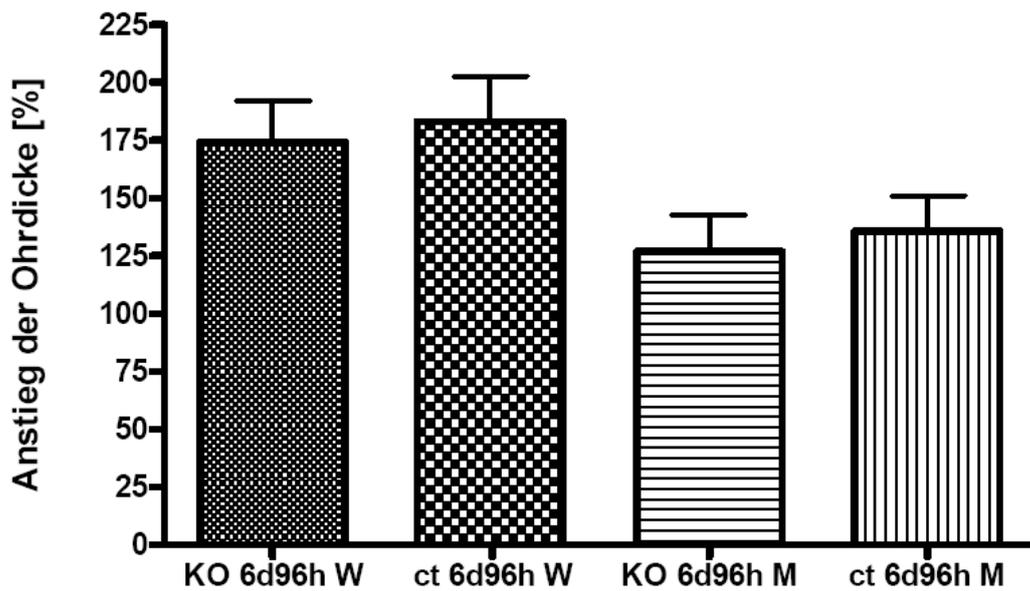
**Abb. 3.10** Zunahme der Ohrdicke in Prozent des Ausgangswertes 24 Stunden nach der Reaktionsauslösung, d.h. 6 Tage + 24 Stunden nach der Sensibilisierung (KO – Knock-out-Mäuse, ct – Kontrollmäuse, W – Weibchen, M – Männchen).



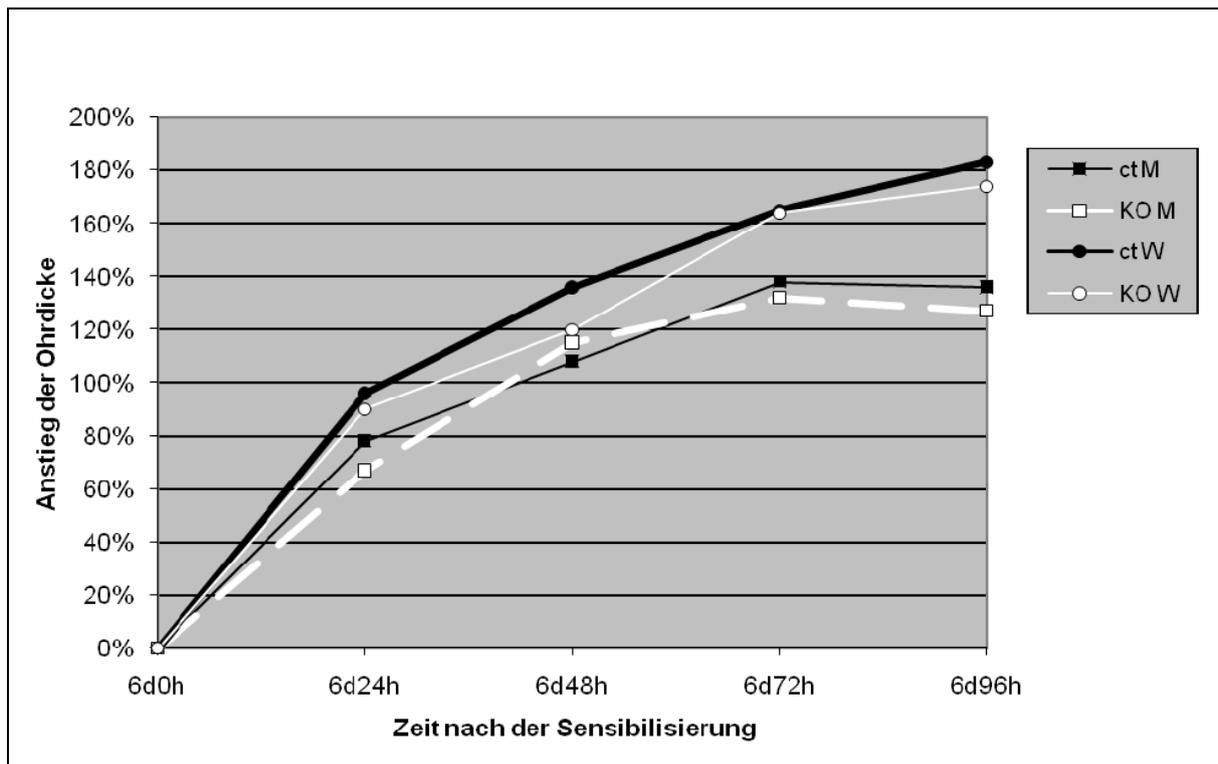
**Abb. 3.11** Zunahme der Ohrdicke in Prozent des Ausgangswertes 48 Stunden nach der Reaktionsauslösung, d.h. 6 Tage + 48 Stunden nach der Sensibilisierung (KO – Knock-out-Mäuse, ct – Kontrollmäuse, W – Weibchen, M – Männchen).



**Abb. 3.12** Zunahme der Ohrdicke in Prozent des Ausgangswertes 72 Stunden nach der Reaktionsauslösung, d.h. 6 Tage + 72 Stunden nach der Sensibilisierung (KO – Knock-out-Mäuse, ct – Kontrollmäuse, W – Weibchen, M – Männchen).



**Abb. 3.13** Zunahme der Ohrdicke in Prozent des Ausgangswertes 96 Stunden nach der Reaktionsauslösung, d.h. 6 Tage + 96 Stunden nach der Sensibilisierung (KO – Knock-out-Mäuse, ct – Kontrollmäuse, W – Weibchen, M – Männchen)



**Abb. 3.14** Zunahme der Ohrdicke in Prozent des Ausgangswertes 24, 48, 72 und 96 Stunden nach der Reaktionsauslösung, d.h. 6 Tage 24, bzw. 48, bzw. 72, bzw. 96 Stunden nach der Sensibilisierung (KO – Knock-out-Mäuse, ct – Kontrollmäuse, W – Weibchen, M – Männchen).

### 3.3.2 Ausmaß der Keratinozyten-Apoptose bei allergischer Kontaktdermatitis

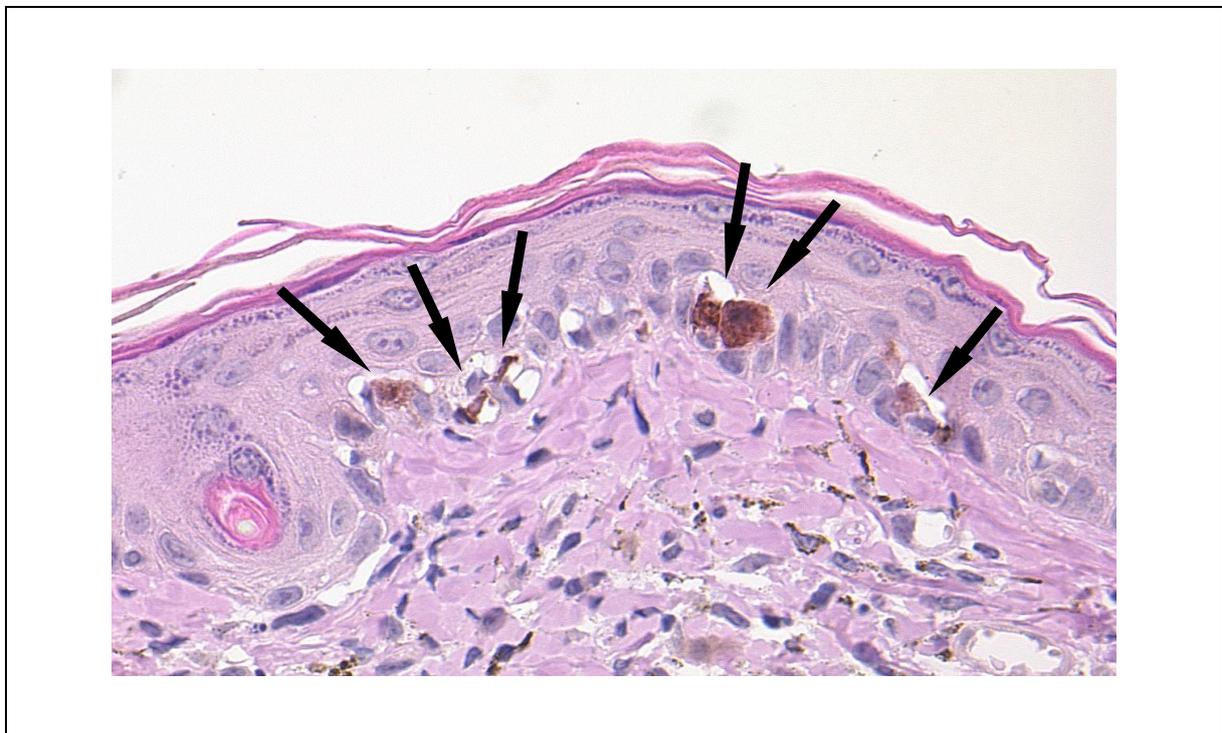
#### 3.3.2.1 Anzahl der Caspase-3-positiven Keratinozyten

Um das Ausmaß der Keratinozyten-Apoptose bei der allergischen Kontaktdermatitis in Wildtyp- und Fas-Knock-out-Mäusen zu vergleichen, wurde die Anzahl der Caspase-3-Fragment-positiven Zellen in der Epidermis bestimmt. Das Caspase-3-Fragment entsteht während der Apoptose aus Caspase-3, die durch proteolytische Spaltung aktiviert wird und dann die Proteolyse der Todessubstrate durchführt.

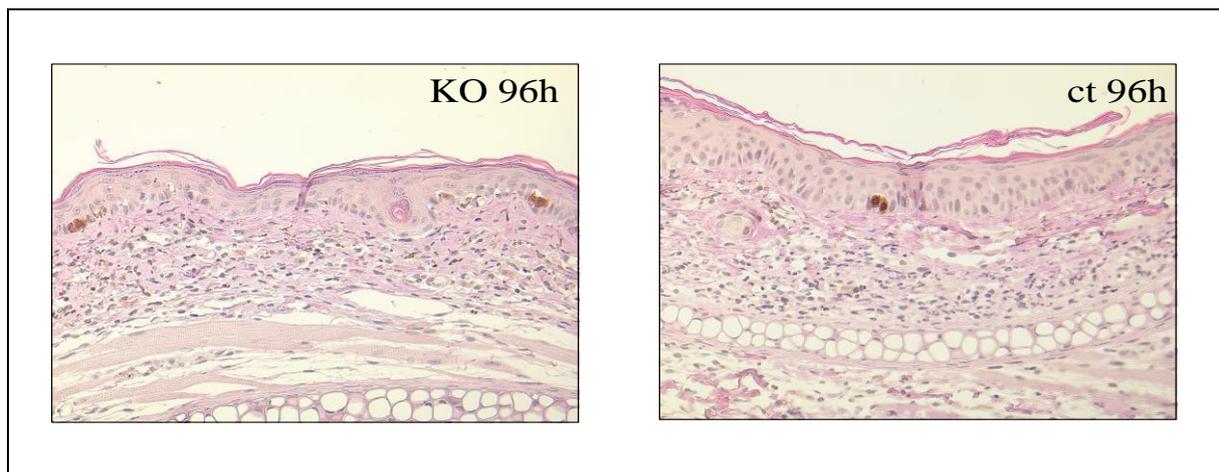
Für das Verfahren wurde Material von zwei verschiedenen Zeitpunkten nach Reaktionsauslösung benutzt. 24 Stunden nach DNBF-Reexposition (Auslösung) wurden Hautbiopsien von 8 Weibchen im Alter von 6 bis 7 Wochen, 4 KO-Tieren und 4 Kontrollen, entnommen. Von 16 Tieren im Alter von 7 bis 12 Wochen, 4 KO-Weibchen, 4 Kontrollweibchen, 4 KO-Männchen und 4 Kontrollmännchen wurde das Versuchsmaterial dagegen 96 Stunden nach Auslösung der Dermatitis entnommen. An histologischen Schnitten

von diesen Hautproben wurden Immunfärbungen gegen aktivierte Caspase-3 (Caspase-3-Fragment) vorgenommen. Für jedes Tier wurde die Durchschnittszahl der Caspase-3-Fragment-positiven Keratinozyten aus 10 Gesichtsfeldern bei 200-facher Vergrößerung bestimmt (Abb. 3.15, 3.16).

Im 24-Stunden-Versuch betrug die Anzahl der Caspase-3-Fragment-positiven Keratinozyten pro 200x-Gesichtsfeld bei KO-Mäusen 0.4 ( $\pm 0.178$ ) und bei Kontrollen 0.225 ( $\pm 0.04787$ ),  $p=0.379$ . Im 96-Stunden-Versuch wurden folgende Werte festgestellt: bei KO-Weibchen 1.25 ( $\pm 0.05$ ), bei Kontrollweibchen 0.575 ( $\pm 0.1548$ ),  $p=0.01$ ; bei KO-Männchen 1.5 ( $\pm 0.2799$ ) und bei Kontrollmännchen 0.525 ( $\pm 0.1315$ ),  $p=0.02$  (Tabelle 3.1).



**Abb. 3.15** Apoptose der Keratinozyten bei allergischer Kontaktdermatitis. Die Pfeile zeigen Caspase-3-Fragment-positive Zellen in der Epidermis. (Immunhistochemie bei 400-facher Vergrößerung, braun – Hauptfärbung, HE als Gegenfärbung)



**Abb. 3.16** Caspase-3-Fragment-positive Keratinozyten bei Knock-out-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct) 96 Stunden nach der Reaktionsauslösung, Beispielgesichtsfelder. (Immunhistochemie bei 200-facher Vergrößerung, braun – Hauptfärbung, HE als Gegenfärbung)

Die Anzahl der Caspase-3-Fragment-positiven Keratinozyten war bei den Knock-out-Tieren zu beiden Zeitpunkten größer. Im 96-Stunden-Versuch waren die Unterschiede zwischen Knock-out-Tieren und Kontrollen im zweiseitigen, unpaarigen t-Test statistisch signifikant.

**Tabelle 3.1** Durchschnittliche Anzahl der Caspase-3-Fragment-positiven Keratinozyten pro Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung. (n – Zahl der Tiere in der Gruppe, Fas-KO – Epidermis spezifische Knock-out-Mäuse)

A. im 24-Stunden Versuch

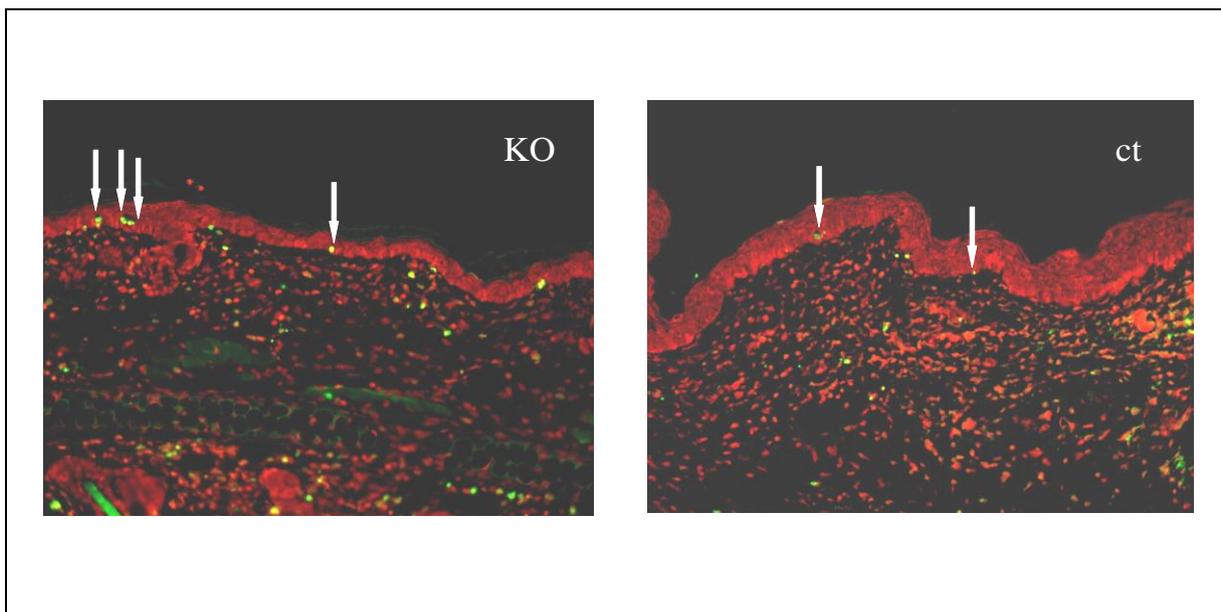
Geschlecht	Fas-KO n=4	Kontrollen n=4	Statistische Signifikanz
Weibchen	0.4 ( $\pm 0.178$ )	0.225 ( $\pm 0.04787$ )	p=0.379

B. im 96-Stunden Versuch

Geschlecht	Fas-KO n=4	Kontrollen n=4	Statistische Signifikanz
Weibchen	1.25 ( $\pm 0.05$ )	0.575 ( $\pm 0.1548$ )	* p=0.01
Männchen	1.5 ( $\pm 0.2799$ )	0.525 ( $\pm 0.1315$ )	* p=0.02

### 3.3.2.2 TUNEL-positive Zellen

Die oben gezeigten Ergebnisse wurden bei den gleichen Mäusen mittels TUNEL-Färbung bestätigt (Abb. 3.17). TUNEL (engl. TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) ermöglicht den Nachweis von Zellen mit fragmentierten Zellkernen und fragmentierter DNS. TdT (engl. Terminal deoxy-Nucleotidyl Transferase) ist ein Enzym, das die repetierende Addition von Deoxynukleotiden an das 3'-OH-Ende von DNS-Fragmenten durchführt.



**Abb. 3.17** TUNEL-positive Zellen in der Epidermis bei Epidermis-spezifischen Fas-KO-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct) 96 Stunden nach Auslösung der Kontaktdermatitis-Reaktion, Beispielgesichtsfelder. (Immunfluoreszenz bei 200-facher Vergrößerung, grün – TUNEL-positive Zellen, rot – Zellkerne)

Zusätzlich wurde das 96-Stunden-Experiment an 8 weiblichen Mäusen, 4 KO-Tieren und 4 Kontrollen, im Alter von 7 bis 9 Wochen wiederholt.

Die Anzahl der TUNEL-positiven Keratinozyten betrug pro 200x-Gesichtsfeld im 24-Stunden-Versuch bei KO-Mäusen 1.8 ( $\pm 0.4320$ ) und bei Kontrollen 1.075 ( $\pm 0.2250$ ),  $p=0.1872$ . Im 96-Stunden-Versuch wurden folgende Werte festgestellt: bei KO-Weibchen 2.25 ( $\pm 0.1936$ ), bei Kontrollweibchen 1.150 ( $\pm 0.2901$ ),  $p=0.02$ ; bei KO-Männchen 3.85 ( $\pm 0.3403$ ) und bei Kontrollmännchen 1.7 ( $\pm 0.3674$ ),  $p=0.01$  und im Kontrollversuch bei KO-Weibchen 2.375 ( $\pm 0.3924$ ), bei Kontrollweibchen 1.175 ( $\pm 0.3591$ ),  $p=0.03$  (Tabelle 3.2).

Die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen in der Kontaktdermatitis-Epidermis war in allen Fällen größer bei Knock-out-Tieren. Im 96-Stunden-Versuch waren die Unterschiede

zwischen Knock-out-Tieren und Kontrollen im zweiseitigen, unpaarigen t-Test beim Hauptversuch und im einseitigen, unpaarigen t-Test beim Kontrollversuch statistisch signifikant.

**Tabelle 3.2** Durchschnittliche Anzahl der TUNEL-positiven Keratinozyten pro Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung. (n – Zahl der Tiere in der Gruppe, Fas-KO – Epidermis spezifische Knock-out-Mäuse)

A. im 24-Stunden Versuch

Geschlecht	Fas-KO n=4	Kontrollen n=4	Statistische Signifikanz
Weibchen	1.8 ( $\pm 0.4320$ )	1.075 ( $\pm 0.2250$ )	p=0.1872

B. im 96-Stunden Versuch

Geschlecht	Fas-KO n=4	Kontrollen n=4	Statistische Signifikanz
Weibchen	2.25 ( $\pm 0.1936$ )	1.150 ( $\pm 0.2901$ )	* p=0.02
Männchen	3.85 ( $\pm 0.3403$ )	1.7 ( $\pm 0.3674$ ),	* p=0.01

C. im 96-Stunden Kontrollversuch

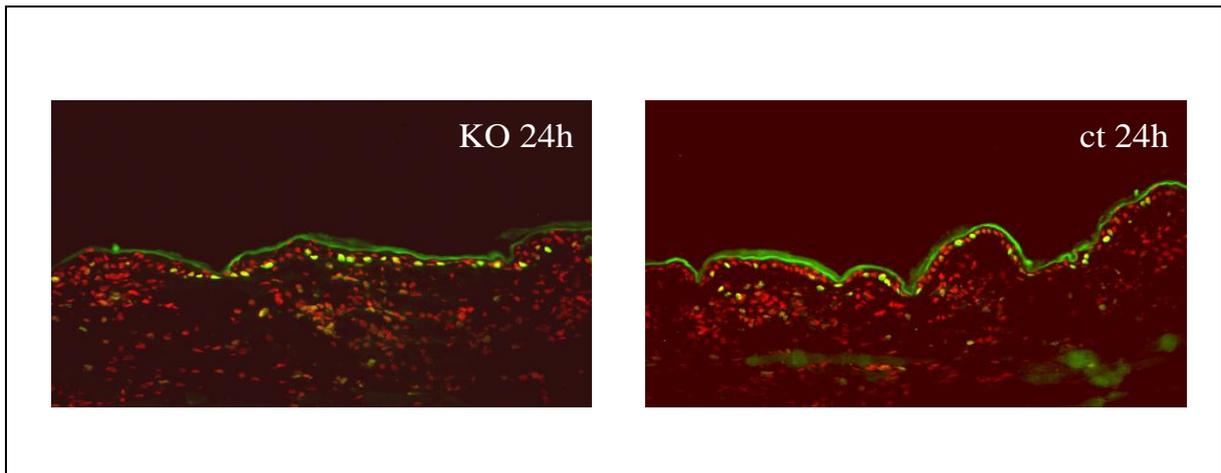
Geschlecht	Fas-KO n=4	Kontrollen n=4	Statistische Signifikanz
Weibchen	2.375 ( $\pm 0.3924$ )	1.175 ( $\pm 0.3591$ )	* p=0.03

### 3.3.3 Ausmaß der Keratinozyten-Proliferation bei allergischer Kontaktdermatitis

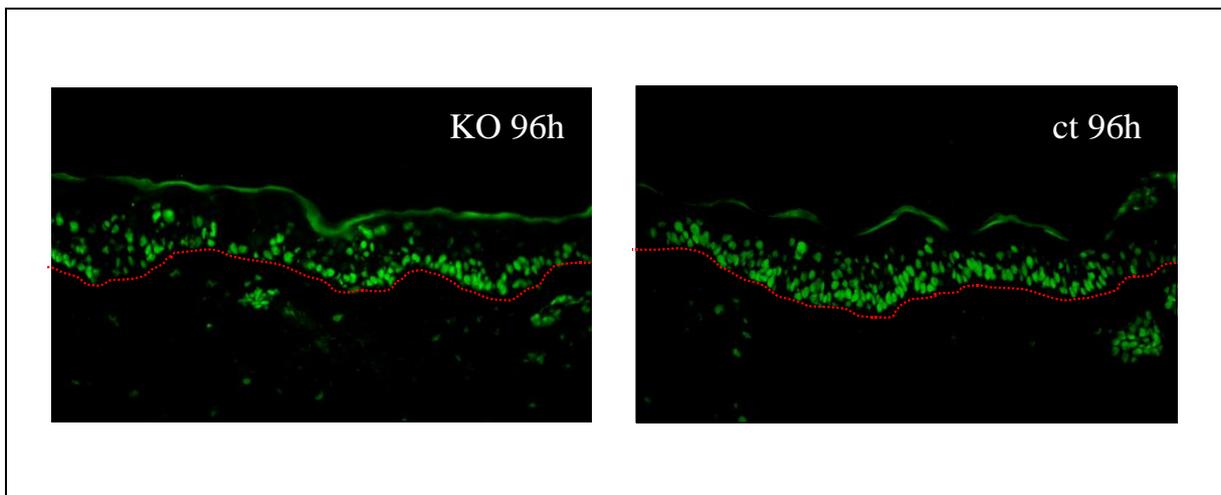
#### 3.3.3.1 Anzahl der Ki-67-positiven Keratinozyten

Die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen wurde in der Epidermis von Wildtyp- und Fas-Knock-out-Mäusen bestimmt, um das Ausmaß der Keratinozyten-Proliferation bei der allergischen Kontaktdermatitis in diesen Tieren zu vergleichen. Ki-67 ist ein Kern-Antigen, das in proliferierenden Zellen vorhanden ist und als Proliferationsmarker benutzt wird.

Die Anzahl der Ki-67-positiven Keratinozyten wurde bei folgenden Mäusen bestimmt: 24 Stunden nach Auslösung der Reaktion bei 8 Weibchen im Alter von 6-7 Wochen, 4 Knock-out-Tieren und 4 Kontrollen, 96 Stunden nach Auslösung der Reaktion bei 8 anderen Weibchen, 4 Knock-out-Tieren und 4 Kontrollen, im Alter von 9-12 Wochen (Abb. 3.18, 3.19).



**Abb. 3.18** Ki-67-positive Zellen in der Epidermis bei Epidermis-spezifischen Fas-KO-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct) 24 Stunden nach der Auslösung, Beispielgesichtsfelder. (Immunfluoreszenz bei 200-facher Vergrößerung, grün – Ki-67, rot – Zellkerne)



**Abb. 3.19** Ki-67-positive Zellen in der Epidermis bei Epidermis-spezifischen Fas-KO-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct) 96 Stunden nach der Auslösung, Beispielgesichtsfelder. (Immunfluoreszenz bei 200-facher Vergrößerung, grün – Ki-67, rot – Basalmembran)

Die Anzahl der Ki-67-positiven Keratinozyten pro 200x-Gesichtsfeld betrug im 24-Stunden-Versuch 10.75 ( $\pm 2.32$ ) bei Knock-out-Mäusen und 9.475 ( $\pm 1.936$ ) bei Kontrollen, im 96-Stunden-Versuch 89.575 ( $\pm 12.15$ ) bei Knock-out-Mäusen und 96.65 ( $\pm 14.33$ ) bei Kontrollen (Tabelle 3.3).

Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Ki-67-positiven Keratinozyten zwischen Knock-out- und Kontrollmäusen gefunden.

**Tabelle 3.3** Durchschnittliche Anzahl der Ki-67-positiven Keratinozyten pro Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung. (*n* – Zahl der Tiere in der Gruppe, Fas-KO – Epidermis spezifische Knock-out-Mäuse)

A. im 24-Stunden Versuch

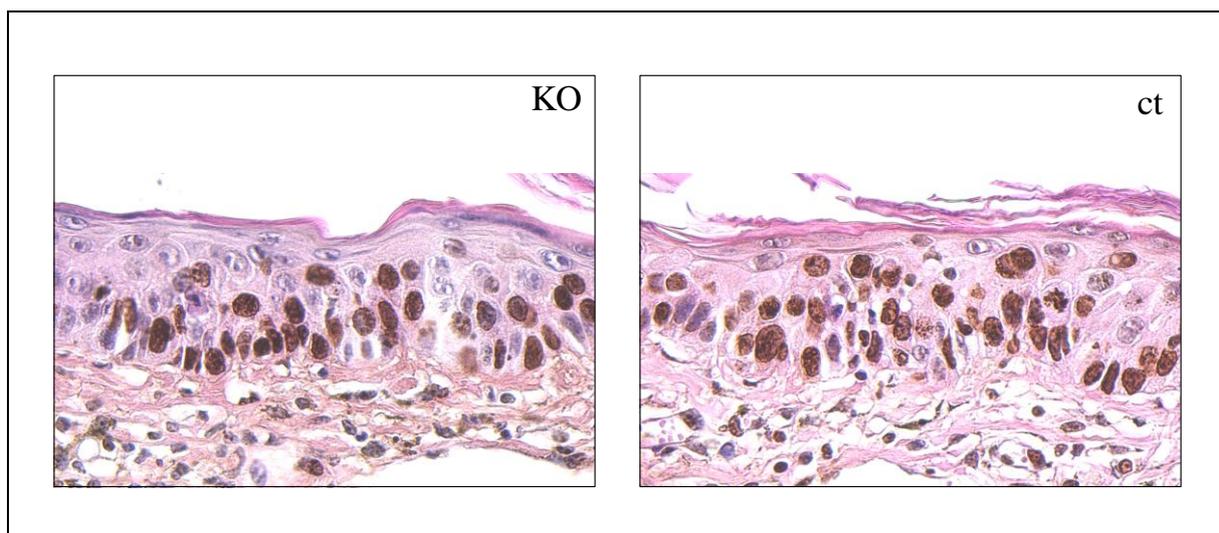
Geschlecht	Fas-KO n=4	Kontrollen n=4	Statistische Signifikanz
Weibchen	10.75 ( $\pm 2.32$ )	9.475 ( $\pm 1.936$ )	p=0.6877

B. im 96-Stunden Versuch

Geschlecht	Fas-KO n=4	Kontrollen n=4	Statistische Signifikanz
Weibchen	89.575 ( $\pm 12.15$ )	96.65 ( $\pm 14.33$ )	p=0.7195

### 3.3.3.2 BrdU-positive Zellen

Um die Zellproliferation mit einer weiteren, sehr sensitiven Methode zu bestimmen, wurde das Kontaktdermatitis-Experiment mit 8 weiblichen Mäusen: 4 KO-Tieren und 4 Kontrollen im Alter von 7-9 Wochen wiederholt. Die Tiere wurden 96 Stunden nach Auslösung der Reaktion getötet.



**Abb. 3.20** BrdU-positive Keratinozyten bei Epidermis-spezifischen Fas-KO-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct) 96 Stunden nach Auslösung, Beispielgesichtsfelder. (Immunhistochemie bei 400-facher Vergrößerung, braun – Hauptfärbung, HE als Gegenfärbung)

In diesem Fall wurde die Zellproliferation mit Hilfe von BrdU-Inkorporation über zwei Stunden gemessen (Abb. 3.20). BrdU ist ein Proliferationsmarker, der in die DNS in der S-Phase des Zellzyklus inkorporiert wird.

Die Anzahl der BrdU-positiven Keratinozyten pro 400x-Gesichtsfeld betrug bei Knock-out-Mäusen 23.85 ( $\pm 2.234$ ) und bei Kontrollen 27.55 ( $\pm 2.986$ ), (Tabelle 3.4).

Der festgestellte Unterschied in der Anzahl der BrdU-positiven Keratinozyten war im einseitigen, unpaarigen t-Test statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 3.4** *Durchschnittliche Anzahl der BrdU-positiven Keratinozyten pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung. (n – Zahl der Tiere in der Gruppe, Fas-KO – Epidermis spezifische Knock-out-Mäuse).*

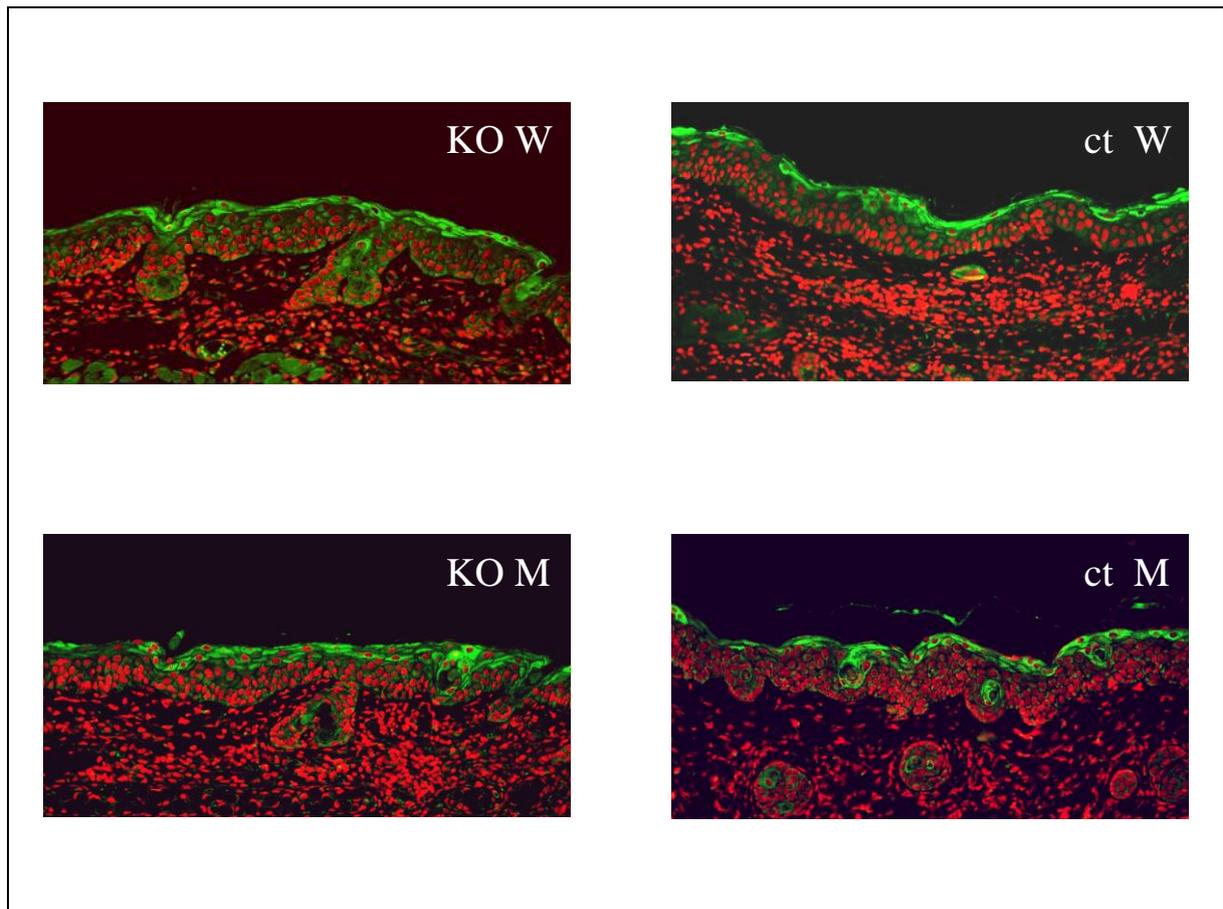
<b>Geschlecht</b>	<b>Fas-KO n=4</b>	<b>Kontrollen n=4</b>	<b>Statistische Signifikanz</b>
Weibchen	23.85 ( $\pm 2.234$ )	27.55 ( $\pm 2.986$ ).	p=0,3594

### **3.3.4 Expression der Überlebens-assoziierten Proteine in der Epidermis bei allergischer Kontaktdermatitis**

Es wurde nach einem möglichen Mechanismus der vermehrten Keratinozyten-Apoptose bei Knock-out-Mäusen in der Kontaktdermatitis gesucht. Die eventuelle protektive Rolle von Fas wäre vermutlich mit einem der zahlreichen Überlebenswege in Keratinozyten verbunden. Fas könnte z.B. die Expression verschiedener Überlebens-assoziiierter Proteine beeinflussen. Deswegen wurden die Immunfärbungen gegen Proteine dreier Überlebenswege durchgeführt: MAPK-Kaskade – p-ERK und Bcl-xl, PI3K-Signalweg – p-Akt, NGF-vermittelter-Signalweg – Bcl-xl.

#### **3.3.4.1 Bcl-xl**

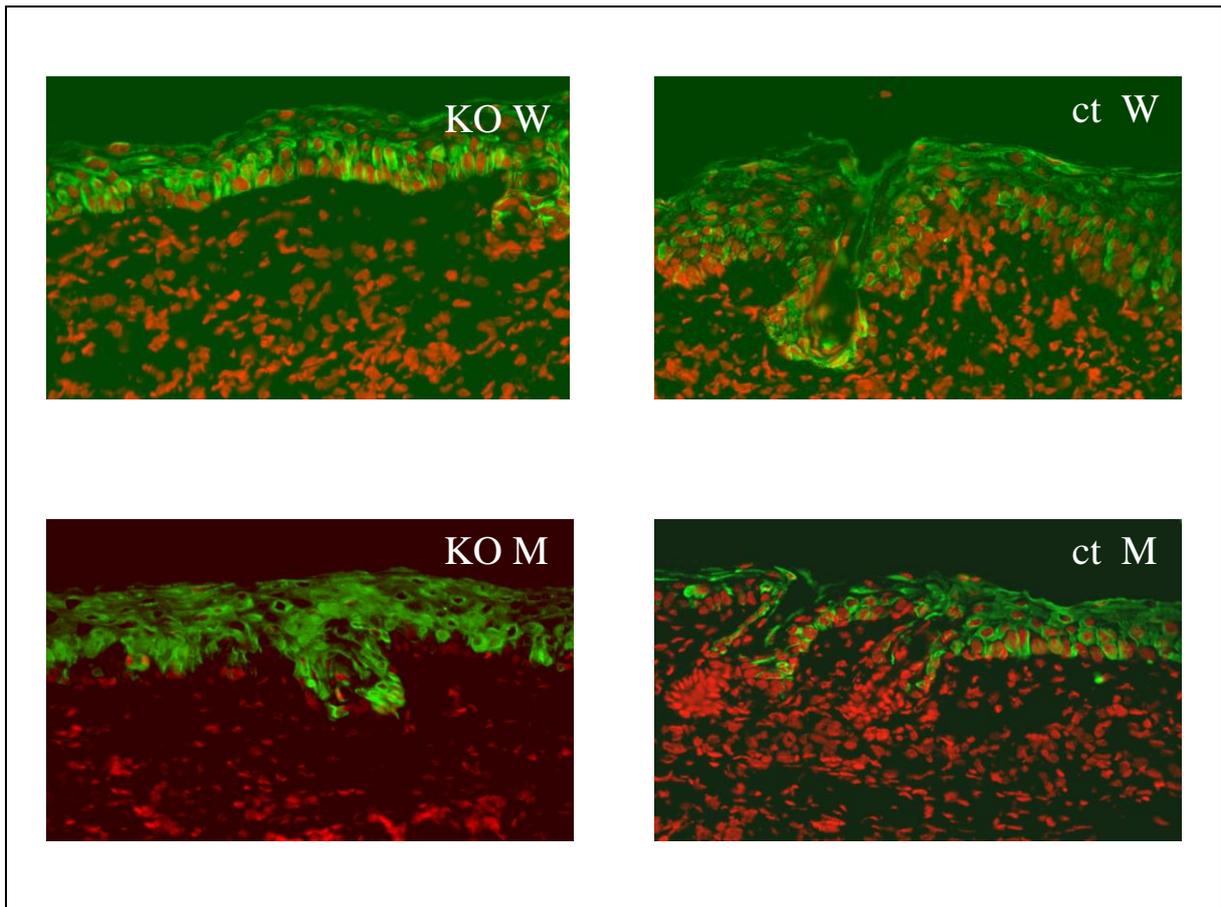
In der Immunfluoreszenzfärbung gegen das Überlebensprotein Bcl-xl wurde kein Unterschied zwischen Knock-out-Mäusen und Kontrollen im epidermalen Expressionsmuster 96 Stunden nach Auslösung der Kontaktdermatitis festgestellt (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21** Expression von *Bcl-xl* in der Epidermis von Knock-out- (KO) und Kontrollmäusen (ct), Weibchen (W) und Männchen (M), 96 Stunden nach Auslösung der KD-Reaktion. (Immunfluoreszenz bei 200-facher Vergrößerung, grün – Hauptfärbung, rot - Zellkerne)

#### 3.3.4.2 p-Akt

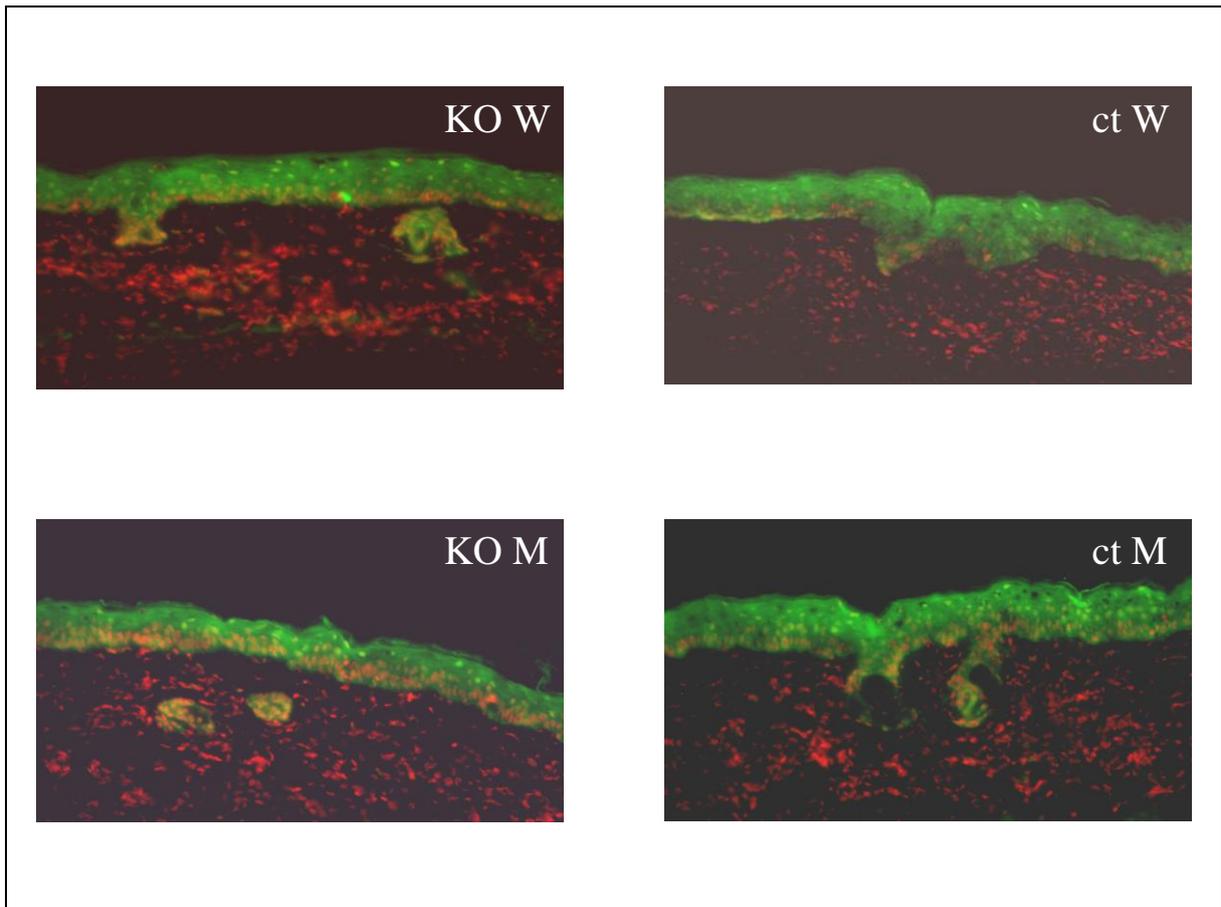
In der Immunfluoreszenzfärbung gegen die phosphorylierte Akt-Kinase (p-Akt) wurde kein Unterschied zwischen Knock-out-Mäusen und Kontrollen im epidermalen Expressionsmuster 96 Stunden nach Auslösung der Kontaktdermatitis festgestellt (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22** Expression von *p-Akt* in der Epidermis von Knock-out- (KO) und Kontrollmäusen (ct), Weibchen (W) und Männchen (M), 96 Stunden nach Auslösung der KD-Reaktion. (Immunfluoreszenz bei 200-facher Vergrößerung, grün – Hauptfärbung, rot - Zellkerne)

### 3.3.4.3 p-ERK

In der Immunfluoreszenzfärbung gegen die phosphorylierte ERK-Kinase (p-ERK) wurde kein Unterschied zwischen Knock-out-Mäusen und Kontrollen im epidermalen Expressionsmuster 96 Stunden nach Auslösung der Kontaktdermatitis festgestellt (Abb. 3.23).



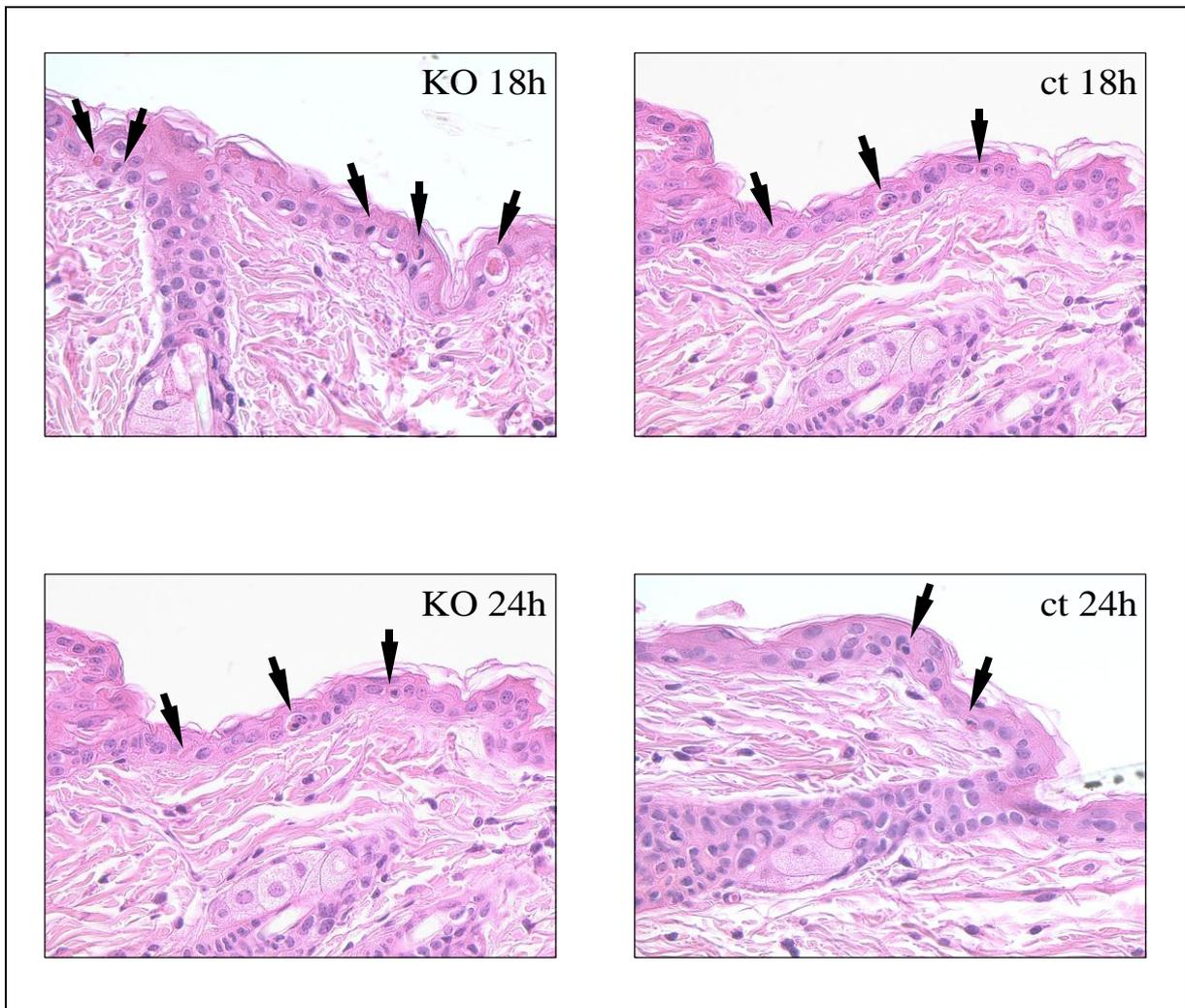
**Abb. 3.23** Expression von p-ERK in der Epidermis von Knock-out- (KO) und Kontrollmäusen (ct), Weibchen (W) und Männchen (M), 96 Stunden nach Auslösung der KD-Reaktion. (Immunfluoreszenz bei 200-facher Vergrößerung, grün – Hauptfärbung, rot - Zellkerne)

### 3.4 UVB-induzierte Dermatitis

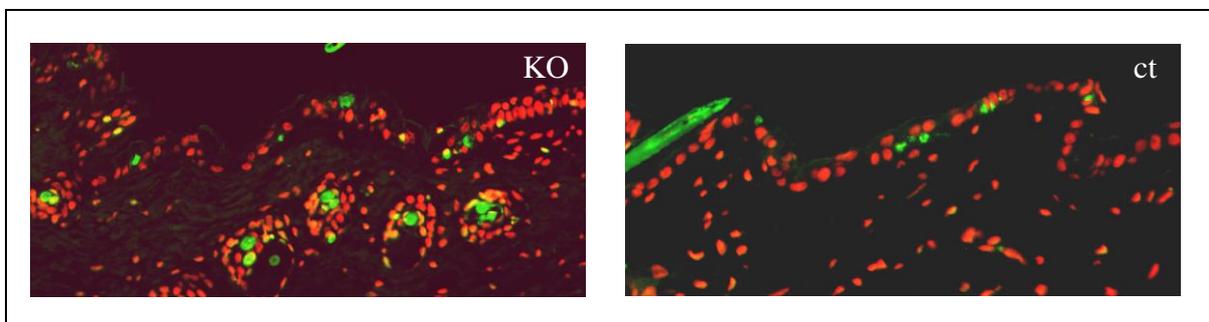
#### 3.4.1 Anzahl der Sonnenbrandzellen (sun burn cells)

Als Sonnenbrandzellen („sun burn cells“) werden apoptotische Keratinozyten mit typischer Morphologie nach Einwirkung von UV-Strahlen auf die Epidermis bezeichnet. Die Anzahl der Sonnenbrandzellen wurde 18 und 24 Stunden nach UVB-Bestrahlung (Dosis:  $0.3 \text{ J/cm}^2$ ) im HE-gefärbten Gewebe ausgewertet. Die apoptotischen Keratinozyten wurden in der UVB-bestrahlten Haut auch mit Hilfe der TUNEL-Färbung nachgewiesen (Abb. 3.24, 3.25).

In der 18-Stunden-Gruppe befanden sich 17 Männchen im Alter von 5 bis 13 Wochen, 8 KO-Tiere und 9 Kontrollen, und in der 24-Stunden-Gruppe 11 Weibchen im Alter von 8 bis 11 Wochen, 7 KO-Tiere und 4 Kontrollen.



**Abb. 3.24** Sonnenbrandzellen in der Haut von Knock-out-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct) 18 und 24 Stunden nach der UVB-Strahlenexposition, Beispielgesichtsfelder. (HE-Färbung bei 400-facher Vergrößerung)



**Abb. 3.25** Apoptose der Keratinozyten in der Haut von Knock-out-Mäusen (KO) und Kontrollen (ct) 18 Stunden nach der UVB-Strahlenexposition, Beispielgesichtsfelder (TUNEL-Färbung bei 200-facher Vergrößerung, grün – TUNEL-positive Zellen, rot – Zellkerne)

Die Anzahl der Sonnenbrandellen pro 400x-Gesichtsfeld betrug im 18-Stunden-Versuch bei KO-Mäusen 2.859 ( $\pm 0.29$ ) und bei Kontrollen 1.858 ( $\pm 0.1316$ ),  $p=0.0052$ . Im 24-Stunden-Versuch wurden folgende Werte festgestellt: bei KO-Mäusen 3.007 ( $\pm 0.3693$ ), bei Kontrollen 1.933 ( $\pm 0.2222$ ),  $p=0.0711$  (Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5** Durchschnittliche Anzahl der Sonnenbrandzellen pro Gesichtsfeld bei 400-facher Vergrößerung. (*n* – Zahl der Tiere in der Gruppe, Fas-KO – Epidermis spezifische Knock-out-Mäuse)

A. im 18-Stunden Versuch

Geschlecht	Fas-KO n=8	Kontrollen n=9	Statistische Signifikanz
Männchen	2.859 ( $\pm 0.29$ )	1.858 ( $\pm 0.1316$ )	* $p=0.0052$

B. im 24-Stunden Versuch

Geschlecht	Fas-KO n=7	Kontrollen n=4	Statistische Signifikanz
Weibchen	3.007 ( $\pm 0.3693$ )	1.933 ( $\pm 0.2222$ )	$p=0.0711$

Die Anzahl der Sonnenbrandzellen war in beiden Versuchen bei den Knock-out-Tieren größer. Im 18-Stunden-Versuch waren die Unterschiede zwischen Knock-out-Tieren und Kontrollen im zweiseitigen, unpaarigen t-Test statistisch signifikant.

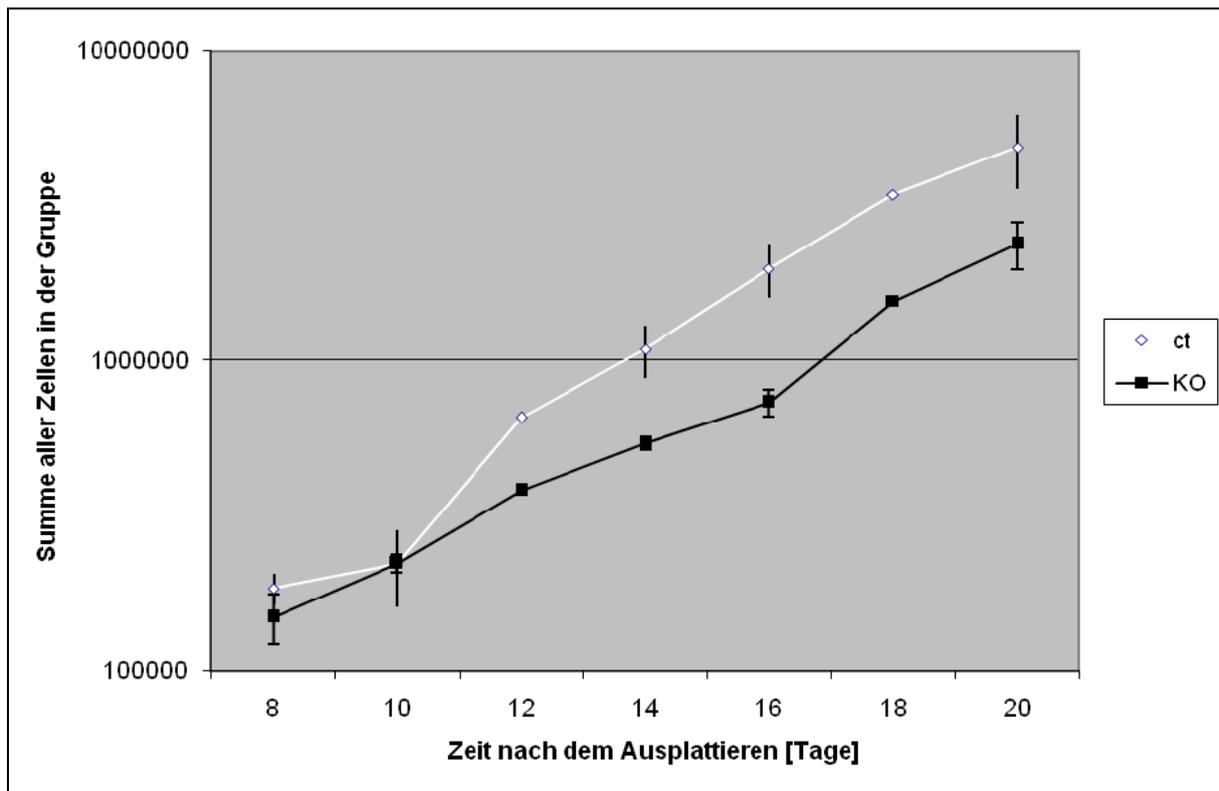
### 3.5 Bestimmung des Wachstumspotentials der kultivierten Keratinozyten

#### 3.5.1 Wachstumskurven

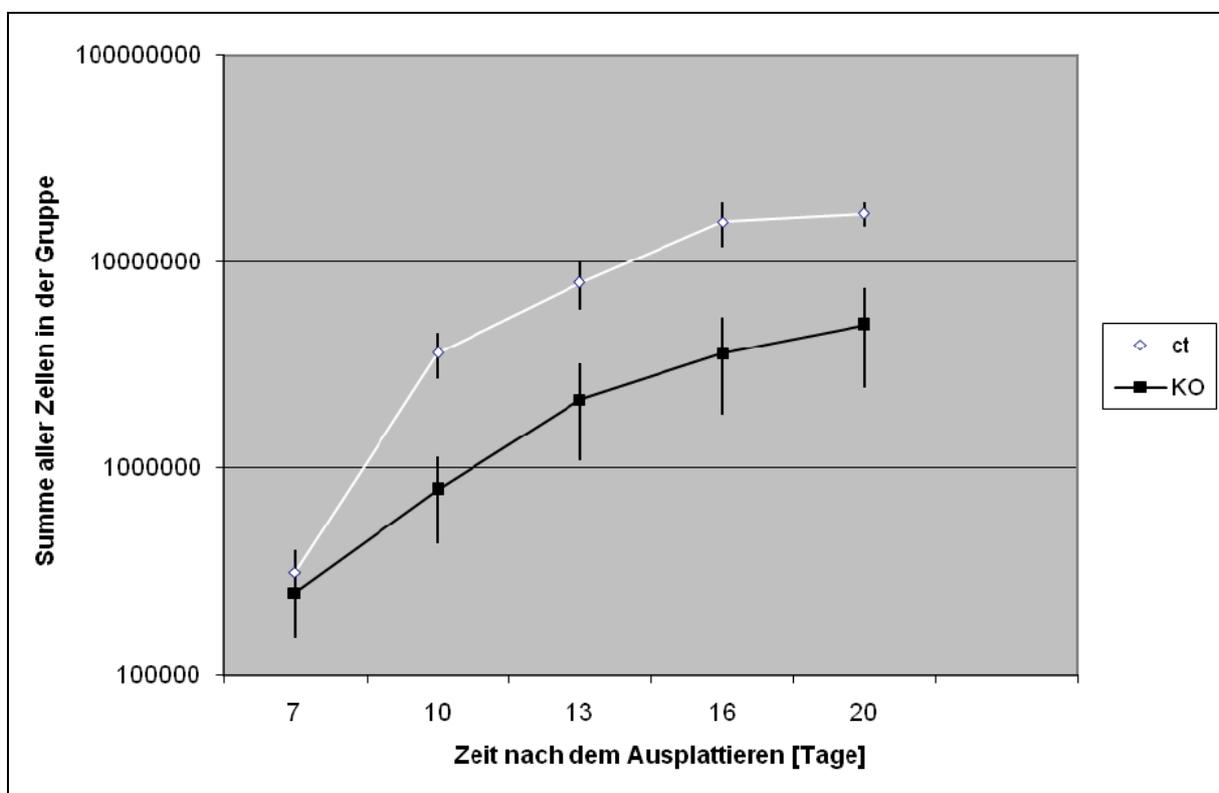
Der Versuch wurde 2-mal an den gleichen Zelllinien durchgeführt. Jeweils wurden 3-KO-Zelllinien und 3 Kontrolllinien benutzt, die Zellzahl wurde an fünf Zeitpunkten gemessen.

Die durchschnittliche Zellzahl der KO-Zellen war bei jeder Messung kleiner als die Durchschnittszahl der Kontrollzellen (Abb. 3.26, 3.27).

In beiden Versuchen zeigten die Fas-KO-Keratinozyten ein langsames Wachstum als die Kontrollzellen.



**Abb. 3.26** Wachstumskurve der Wildtyp- (ct) und Fas-Knock-out-Keratinocyten (KO) im Hauptversuch (Ausgangswert: 30000 Zellen/Zelllinie, 3 Zelllinien/Gruppe).



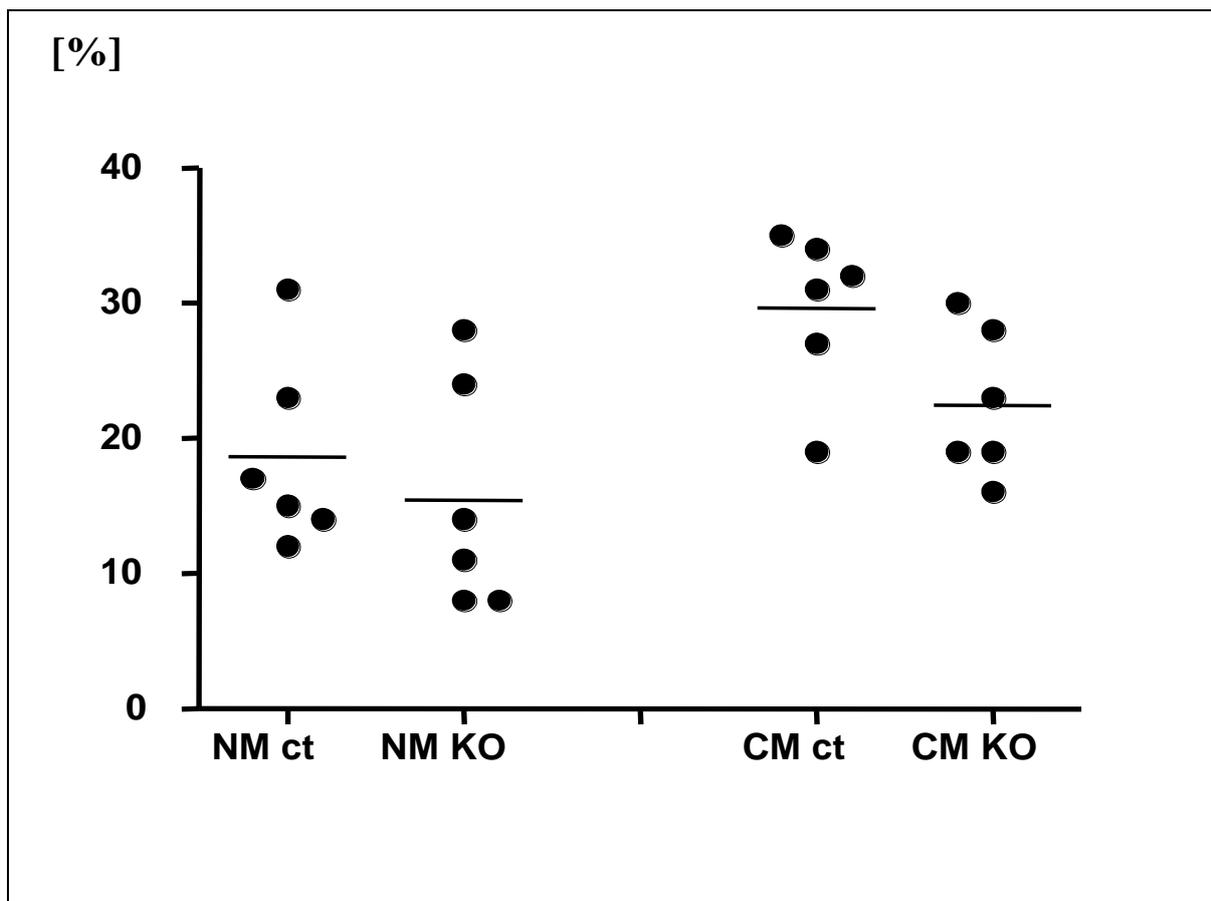
**Abb. 3.27** Wachstumskurve der Wildtyp- (ct) und Fas-Knock-out Keratinocyten (KO) im Kontrollversuch (Ausgangswert: 30000 Zellen/Zelllinie, 3 Zelllinien/Gruppe).

### 3.5.2 BrdU-Färbung der Zellen

Um zu erklären, ob ein schnelleres Wachstum der Kontrollzelllinien in Wachstumskurvenversuchen mit erhöhter Proliferation (und nicht z.B. Survival) der Zellen verbunden ist, wurden die Zellen gegen BrdU gefärbt (BrdU-Definition – s. Abschnitt 3.3.3.2).

Es wurden 2 Versuche in normalem Medium und 2 Versuche in konditioniertem Medium an den gleichen Zelllinien durchgeführt. Jeweils wurden 3 Fas-Knock-out-Linien und 3 Kontrolllinien pro Versuch eingesetzt.

Im ersten Versuch in normalem Medium waren 21% der KO-Zellen und 23% der Kontrollzellen BrdU-positiv. Im zweiten Versuch in normalem Medium waren 10% der KO-Zellen und 15% der Kontrollzellen BrdU-positiv. Zusammengefasst wurden in beiden Versuchen 15,5% der KO-Zellen und 19% der Kontrollzellen BrdU-angefärbt ( $p=0,5009$ ), (Abb. 3.28).



**Abb. 3.28** Prozentualer Anteil der BrdU-positiven Zellen im Verhältnis zu allen Zellen. (NM - normales Medium, CM - konditioniertes Medium; ct – Kontrollzellen, KO – Fas-defiziente Zellen; horizontale Linien – Mittelwerte, Kreise – Werte einzelner Zelllinien).

Im ersten Versuch in konditioniertem Medium waren 23% der KO-Zellen und 34% der Kontrollzellen BrdU-positiv. Im zweiten Versuch in konditioniertem Medium waren 22% der KO-Zellen und 26% der Kontrollzellen BrdU-positiv. Zusammengefasst wurden in beiden Versuchen 22,5% der KO-Zellen und 30% der Kontrollzellen BrdU-angefärbt ( $p=0,0557$ ), (Abb. 3.28).

Bei Fas-KO-Zellen wurden weniger BrdU-positive Zellen festgestellt. Die Unterschiede waren aber statistisch nicht signifikant. Durch die Verwendung von konditioniertem Medium ist die Proliferation im Vergleich zu normalem Medium erhöht.

## 4. Diskussion

### 4.1. Epidermis-spezifische Deletion von Fas

Die Entdeckung der Methode des Gen-Knock-outs von Capecchi, Smithies und Evans, für die sie im Jahre 2007 einen Nobel Preis bekamen, ermöglichte unabhängige Untersuchungen der Funktionen von einzelnen Proteinen [120]. Die nachfolgende Entdeckung des Cre/lox-Systems ermöglichte dagegen die Gewebe-spezifischen Gen-Knock-outs und Untersuchungen der Funktionen von Proteinen in bestimmten Zellen, Geweben oder Organen [1]. Hao und Kollegen generierten die erste Gewebe-spezifische Fas-Knock-out-Maus [44].

Bis jetzt wurden die biologischen Aufgaben des epidermalen Fas-Proteins entweder bei Tieren, bei welchen die Funktion des Fas-Proteins im ganzen Organismus gestört ist, oder in kultivierten Zellen untersucht. Bei ubiquitärer Deletion von Fas, z.B. bei *lpr*- oder *gld*-Mäusen, kann man die Funktionen von Fas nicht in einzelnen Zellpopulationen separat untersuchen. Bisher war es deshalb nicht möglich, die Rolle von Fas in der Epidermis exakt zu analysieren. *In vitro* Experimente erlauben lediglich die Entwicklung von Hypothesen über Vorgänge *in vivo*.

In unserer Arbeitsgruppe wurde zum ersten Mal eine Epidermis-spezifische Fas-Knock-out-Maus erfolgreich generiert. Dazu wurden Mäuse mit homozygot geflochten Fas-Allelen mit Mäusen gekreuzt, die Cre-Rekombinase in der Basalzellschicht der Epidermis exprimieren.

Die Typisierung der Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Mit Hilfe der PCR-Methode konnte festgestellt werden, dass das Cre-Rekombinase-Gen unter der Kontrolle des Keratin-14-Promoters in murinen Zellen vorhanden ist. Dieses Ergebnis gibt aber keine Sicherheit, dass Fas in epidermalen Keratinozyten ausgeschaltet wurde. Deshalb wurde auch für das deletierte Fas-Gen eine PCR-Analyse durchgeführt. In dieser „Fas-deleted“ – PCR zeigte sich ein 260 bp – langes Fragment, das nach Ergebnissen von Hao das Ausschneiden des Fas-Gens bestätigt [44].

Es wurde weiterhin eine Western-blot-Analyse durchgeführt, um die Deletion des Fas-Gens in Keratinozyten auf der Protein-Ebene nachzuweisen. Im Western Blot wurde tatsächlich kein Fas-Protein in Epidermis-Proben nachgewiesen, wobei in Proben vom homogenisierten Gewebe ganzer Extremitäten die Expression von Fas identisch wie in Wildtyp-Proben war, d.h. die Deletion findet nur in der Epidermis statt.

Die Epidermis-spezifische Fas-Knock-out-Maus ermöglicht daher Untersuchungen der Fas-Funktionen in Keratinozyten unabhängig von anderen Organen, in welchen Fas eine

biologische Rolle spielt. Die pathologischen Erscheinungen, die eventuell bei der Maus auftreten, folgen nur aus der Störung der Fas-Funktion in der Epidermis, während in den restlichen Geweben Fas-Protein vorhanden ist. .

## **4.2 Phänotyp der Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse**

### **4.2.1 Phänotyp - makroskopisch**

Die Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse entwickelten im Gegensatz zu den Fas-Null-Mäusen und natürlich vorkommenden Fas-Mutanten spontan keinen pathologischen Phänotyp, d.h. unter normalen Bedingungen verhielten sie sich genauso wie Wildtyptiere. Dies zeigt, dass Fas in Keratinozyten für die normale Entwicklung des murinen Organismus anscheinend entbehrlich ist.

Bei diesen Mäusen fehlen die zahlreichen pathologischen Veränderungen, die bei Fas- und Fas-Ligand-Mutanten oder Fas-Null-Mäusen beschrieben wurden (s. Kapitel 1.1.2), [33, 75, 79, 122]. Man kann daraus folgern, dass die Lupus-ähnliche Krankheit, die bei *gld*- oder *lpr*-Mäusen auftritt, nicht mit der fehlenden Fas-Funktion in Keratinozyten zusammenhängt, sondern andere betroffene Zellen hier von Bedeutung sind.

### **4.2.2 Phänotyp - mikroskopisch**

Wir haben keine Auffälligkeiten in mikroskopischen Bildern der Haut von den Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen nachgewiesen. Es wurden auch keine Unterschiede zwischen diesen Mäusen und Kontrollen hinsichtlich Proliferation und Apoptose der Keratinozyten festgestellt. Das Expressionsmuster der Differenzierungs-assoziierten Proteine wie z.B. Keratin 14 oder Filaggrin war normal.

Das Fas-Protein spielt in Keratinozyten bei der Morphogenese und Entwicklung der Epidermis sowie in der Erhaltung der Balance zwischen Proliferation und Differenzierung somit keine essenzielle Rolle.

Dies trifft auch für die natürlich vorkommenden Fas-Mutanten zu, die eine normal entwickelte und differenzierte Epidermis aufweisen [32, 126]. In der ruhenden Haut der Fas-KO-Mäuse wurden im Vergleich zu den Kontrollmäusen auch keine Unterschiede hinsichtlich Keratinozyten-Apoptose und -Proliferation beobachtet. Das heißt, dass im Normalzustand der Fas-Rezeptor wahrscheinlich keine bedeutende Rolle bei diesen Prozessen spielt.

Das epidermale Fas-Protein scheint also für die Entwicklung und Homöostase eines gesunden Maus-Organismus entbehrlich zu sein. Fas ist ein Apoptose-vermittelnder Todesrezeptor, der eventuell in bestimmten Situationen auch antiapoptotisch wirken kann [47]. Im Normalfall findet in der Epidermis kaum Apoptose statt [124]. Eine biologische Rolle von Fas in Keratinozyten ist demnach vermutlich nur in bestimmten Stress-Situationen, z.B. bei Krankheit oder Verletzung, gegeben. Mehrere Autoren haben die Funktionen von epidermale Fas mit Sonnenbrand und Kontaktdermatitis in Verbindung gebracht [118, 45, 101]. Mit der Etablierung einer Mauslinie mit Epidermis-spezifischer Deletion von Fas ergab sich für uns die Möglichkeit, die postulierten Funktionen von Fas in der Epidermis näher *in vivo* zu untersuchen.

### **4.3 Allergische Kontaktdermatitis**

#### **4.3.1 Anstieg der Ohrdicke**

Die Dicke der Ohrschwellung ist bei der Kontaktdermatitis das am besten etablierte Kriterium der Stärke der Entzündungsreaktion [34]. In unseren Kontaktdermatitis-Versuchen entwickelten die Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen eine normal ausgeprägte Entzündungsreaktion. Es wurden keine Unterschiede zwischen diesen Mäusen und Kontrollen in der Dicke des entzündeten Ohres festgestellt. Auch der Verlauf der Reaktion zeigte keine Abweichungen von der Antwort des normalen Mausorganismus.

Das heißt, dass Fas in Keratinozyten für die Entstehung einer allergischen Kontaktdermatitis nicht erforderlich ist und keinen Einfluss auf die Intensität der Entzündungsreaktion, gemessen an der Dicke der Ohrschwellung, hat. Dies legt nahe, dass die von Xu et al. beschriebene Reduktion der Kontaktdermatitis-Reaktion bei Fas-*lpr*-Mutanten [127], wie auch die vollständige Hemmung der Reaktion bei gleichzeitiger Deletion von FasL und Perforin in Experimenten von Kehren [55], offenbar nicht auf eine gestörte Funktion des Fas/FasL-Systems in Keratinozyten zurückzuführen sind, sondern auf die Störung von Interaktionen mit anderen Zellen des Organismus, die eine Kontaktdermatitis-Reaktion beeinflussen. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass Keratinozyten-Apoptose für die Entwicklung der vollen entzündlichen Reaktion bei der Kontaktdermatitis nicht nötig und nur eine Begleiterscheinung ist, die dabei beobachtet werden kann.

Im Gegensatz zu den *in vitro* Untersuchungen von Trautmann und Kollegen scheint Fas in Mäusen *in vivo* keine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis zu haben [118]. Die Versuche von Trautmann et al. zeigen, dass aktivierte T-Lymphozyten in der Lage sind, Apoptose von Keratinozyten durch Fas/FasL-Interaktionen auszulösen. Dies wird als essenzieller pathogenetischer Mechanismus in der Kontaktallergie gesehen. Allerdings wurde die Perforin-vermittelte Apoptose in diesen Versuchen nicht berücksichtigt, die jedoch nach Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der Kontaktallergie spielt [51, 116, 117]. Unsere Ergebnisse widersprechen nicht der Fähigkeit von Lymphozyten, über Fas/FasL-Interaktionen Apoptose von Keratinozyten auszulösen, sondern zeigen, dass dies kein essenzielles pathogenetisches Element in der Entwicklung der Kontaktallergie ist.

Unsere Resultate sind nicht im Einklang mit denen von Farley et al., die zu dem Ergebnis kommen, dass der FasL-Signalweg die Expression pathogenetisch bedeutsamer, proinflammatorischer Faktoren wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  u.a. induziert und damit zur Entwicklung der Entzündungsreaktion beiträgt [26, 25]. Obwohl wir keine Messung dieser Faktoren durchgeführt haben, wäre bei Ausschaltung dieser Funktion von Fas durch die Deletion eine Abschwächung der Entzündungsreaktion zu erwarten gewesen.

Wie schon erwähnt, kann Apoptose in Keratinozyten nicht nur durch den Fas-abhängigen Signalweg vermittelt werden. Ein wichtiger weiterer proapoptotischer Signalweg ist der über Perforin. Perforin vermittelte Apoptose hat in der Kontaktdermatitis möglicherweise sogar eine wichtigere Funktion als Fas. Traidl und Kataoka erzielten Ergebnisse, die suggerieren, dass der Fas-Signalweg im Gegensatz zum Perforin-Signalweg nur eine Nebenrolle in der Lymphozytenzytotoxizität spielt [117, 54]. Bei den Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen konnte die fehlende Fas-vermittelte Apoptose wahrscheinlich durch den Perforin-Signalweg kompensiert werden.

Der von uns registrierte Unterschied der Kontaktdermatitis-Reaktionsintensität zwischen Weibchen und Männchen ist wahrscheinlich auf die Einflüsse der Geschlechtshormone auf das Immunsystem zurückzuführen [2, 82]. Die Krankheit hatte einen schwereren Verlauf bei Weibchen. Ähnliche Ergebnisse wurden von Ptak und Kollegen erzielt [90].

#### **4.3.2 Ausmaß der Keratinozyten-Apoptose bei der allergischen Kontaktdermatitis**

Die Epidermis-spezifische Deletion des Fas-Proteins führte in unseren Kontaktdermatitis-Experimenten zu einer Erhöhung der Anzahl apoptotischer Keratinozyten. Die Epidermis-

spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse zeigten ca. 50% mehr apoptotische Zellen in der Epidermis.

Im 24-Stunden Versuch wurden bei den Fas-Knock-out-Mäusen 43,75% mehr apoptotische Zellen in der Epidermis als bei den Kontrollmäusen mittels Caspase-3-Fragment-Färbung festgestellt. Im 96-Stunden Versuch betrug dieser Unterschied 54% für Weibchen und 65% für Männchen. Es wurden etwas mehr apoptotische Zellen nach 96 als nach 24 Stunden registriert, was durch die Kumulation apoptotischer Zellen im Laufe der Zeit erklärbar ist.

Mit Hilfe der TUNEL-Färbung als Markierungsmethode von apoptotischen Zellen wurden nach 24-Stunden ab der Auslösung bei Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen 40,28% mehr apoptotische Zellen gezählt, nach 96-Stunden 48,89% mehr bei Weibchen und 55,84% mehr bei Männchen. Die Unterschiede zwischen Kontrollen und Fas-Knock-out-Mäusen in den 96-Stunden-Versuchen zeigten eine deutliche statistische Signifikanz.

Zusammenfassend wurden nahezu identische Resultate in vier verschiedenen Versuchen unter Anwendung zweier unterschiedlicher Methoden des Apoptose-Nachweises (Caspase-3-Immunfärbung und TUNEL-Färbung) erzielt.

Das bedeutet, dass Fas für die Keratinozytenapoptose bei allergischer Kontaktdermatitis nicht erforderlich ist. Bei der Kontaktdermatitis sind zwei Hauptmechanismen der Zytotoxizität der CD8-Zellen gegen Keratinozyten beschrieben: die Fas-vermittelte und die Perforin/Granzyme-vermittelte Apoptose der Ziel-Zellen [75, 51, 117, 100]. Wenn der erste Weg fehlt, kann dies wahrscheinlich durch den zweiten Weg kompensiert werden.

Die erhöhte Anzahl apoptotischer Keratinozyten in Mäusen mit Epidermis-spezifischem Fas-Knock-out ist überraschend. Wird das Fehlen des funktionalen Fas-Proteins durch das Perforin/Granzyme-System überkompensiert, dies würde eine gesteigerte Aktivität von Perforin/Granzyme oder eine höhere Empfindlichkeit Fas-negativer Keratinozyten gegenüber Perforin-vermittelter Apoptose bedeuten. Wir haben dies als einzelne Fragestellung nicht untersucht. In jedem Fall wäre der Fas-Signalweg offenbar ein Schutzmechanismus, der eine übermäßige Zerstörung der Epidermis-Barriere bei einer Kontaktdermatitis-Reaktion verhindert. Einerseits würden Fas/FasL-Interaktionen zur Apoptose von Keratinozyten führen, andererseits andere Zellen, bzw. das Gewebe insgesamt, vor einer überschießenden Apoptose schützen, die für den Gesamtorganismus negative Folgen haben könnte.

Folgt man dieser Annahme, so hat Fas, obwohl ein klassischer Apoptose-Rezeptor, offenbar in epidermalen Keratinozyten auch Funktionen, die den Schutz vor Apoptose vermitteln. Dieses von uns in der Epidermis beobachtete Phänomen ist vereinbar mit den Ergebnissen von Jordanov und Farley, die beschrieben, dass die spezifische Aktivierung von Fas in

Keratinocyten *in vitro* eine Ausschüttung des EGFR-Liganden Amphiregulin bewirkt und durch einen parakrinen Mechanismus Apoptose in benachbarten Zellen hemmt [47, 26, 25].

Antiapoptotische und wachstumsfördernde Effekte von Fas wurden auch in anderen biologischen Systemen beschrieben. Experimente an T-Lymphozyten zeigen zusätzlich zu den proapoptischen Effekten von Fas-Aktivierung auch proliferationsstimulierende Wirkungen [87]. Ebenso wurden überlebensfördernde Funktionen des Fas-Rezeptors in Endometriumzellen von Tanaka und Umesaki beschrieben [115]. In ihren *in vitro* Versuchen erhöhte die Behandlung von endometrialen, 8-Br-cAMP-stimulierten Stromazellen mit einem aktivierenden anti-Fas-Antikörper die Anzahl von lebenden Zellen in Kultur. Der Mechanismus wurde in der Studie nicht untersucht.

Fas könnte also tatsächlich eine protektive Rolle gegenüber Apoptose in Keratinocyten bei der Kontaktdermatitis spielen. Diese Hypothese braucht jedoch Bestätigung in weiteren Experimenten, am besten *in vivo*. Es wäre interessant, die gleichen Versuche unter Ausschaltung der Effekte von Amphiregulin zu wiederholen. Man könnte auch den Aktivierungsstatus verschiedener Proteine, die zum EGFR-Signalweg gehören, in Fas-Knock-out-Mäusen untersuchen. (Unsere Ergebnisse zu diesem Thema befinden sich im Kapitel 3.3.4 und ihre Diskussion im Kapitel 4.3.4.)

Es ist andererseits nicht völlig auszuschließen, dass die Aktivität von Perforin und Granzyme als Folge des epidermalen Fas-Knock-out gesteigert ist. Diese Möglichkeit scheint aber eher unwahrscheinlich zu sein. Beim Perforin/Granzyme-Mechanismus, dessen wesentliches Element in einer Entleerung von präformierten, zytoplasmatischen Granula besteht, ist eine präzise Intensitätsregulation schwer vorzustellen. Außerdem wurde bei den *lpr*-Mäusen eine abgeschwächte und bei *gld*-Mäusen eine normale Kontaktdermatitis-Reaktion beobachtet [55, 72], obwohl die Ohrdicke, die in diesen Fällen gemessen wurde, keine genaue Aussage über das Ausmaß der Apoptose gibt. Weitere Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass Perforin-medierte Apoptose in der Kontaktallergie normalerweise ohnehin Fas-medierte Apoptose überwiegt, so dass aus diesem Blickwinkel eine Überkompensation durch den Perforin-Mechanismus nicht wahrscheinlich ist. Schließlich wurde eine vermehrte Apoptose von Keratinocyten in Fas-negativer Epidermis auch nach Bestrahlung mit UV-Licht beobachtet. Dies zeigt, dass der Effekt der Fas-Deletion auf die Apoptose in Keratinocyten unabhängig von einer Interaktion mit T- Lymphozyten ist.

### **4.3.3 Ausmaß der Keratinozyten-Proliferation bei allergischer Kontaktdermatitis**

Die Fas-Deletion hatte in unseren Versuchen keinen erkennbaren Einfluss auf die Proliferation der Keratinozyten bei allergischer Kontaktdermatitis. Sowohl mittels Ki-67-, als auch BrdU-Färbung von proliferierenden Zellen wurden die gleichen Zellzahlen bei Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out- und Kontroll-Mäusen gezählt.

Nach Erkenntnissen von Jordanov und Farley kann Fas-Aktivierung die Freisetzung von EGFR-Liganden und die nachfolgende Aktivierung des EGFR-Signalwegs [47, 26, 25] verursachen. Diese Aktivierung kann sowohl zu einer Förderung des Zell-Überlebens, als auch zur Stimulation der Zellproliferation führen [23]. Demzufolge wäre in der Fas-negativen Epidermis eine verringerte Proliferation von Keratinozyten zu erwarten gewesen. Dieses Phänomen wurde von uns nicht beobachtet. Unter Berücksichtigung des oben beschriebenen antiapoptotischen Effekts von Fas kann man dafür zwei mögliche Erklärungen finden: entweder ist Fas in der Lage, Apoptose zu hemmen und beeinflusst dabei die Proliferationsvorgänge nicht, oder die Proliferation ist bei Kontaktdermatitis so stark durch andere Faktoren stimuliert, dass man die subtile Wirkung von Fas mit dieser Methode nicht erfassen kann.

### **4.3.4 Expression der Überlebens-assoziierten Proteine in der Epidermis bei allergischer Kontaktdermatitis**

Auf der Suche nach Mechanismen für die verstärkte Apoptose von Keratinozyten nach Deletion von Fas untersuchten wir die Expression mehrerer Überlebens-assoziierten Proteine: Bcl-xl, pAkt und pERK. Diese drei Moleküle sind auf verschiedenen Stufen mit dem EGFR-Signalweg verbunden. Infolge ihrer Wirkung können apoptotische Vorgänge in der Zelle gehemmt werden [91].

Dabei stellen pAkt und pERK die phosphorylierten, aktivierten Formen der Kinasen Akt und ERK dar. In den immunhistochemischen Färbungen bei der allergischen Kontaktdermatitis fanden wir keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und Fas-Knock-out-Mäusen im epidermalen Expressions- und Aktivierungsmuster dieser Proteine. Offenbar findet also nach Fas-Deletion keine dramatische Regulation der Expression oder Phosphorylierung dieser Faktoren statt. Allerdings ist die Sensitivität der Methode gering und es ist nicht auszuschließen, dass eine mögliche Regulation deshalb von uns nicht detektiert wurde.

Alternativ ist es jedoch auch möglich, dass Fas die Expression ganz anderer Survival-Proteine reguliert oder der antiapoptotische Effekt über einen gänzlich anderen Mechanismus eintritt.

#### **4.4 UVB-induzierte Dermatitis**

##### **4.4.1 Anzahl der Sonnenbrandzellen**

Bei Fas-Knock-out-Mäusen wiesen wir in zwei unabhängigen Versuchen mehr Sonnenbrandzellen nach UVB-Bestrahlung als bei Kontrollmäusen nach. Der Unterschied betrug sowohl nach 18 Stunden ab der Bestrahlung, als auch nach 24 Stunden ca. 35%. Im 18-Stunden-Versuch war das Ergebnis statistisch signifikant.

Angesichts der aktuellen Literaturdaten ist dieses Ergebnis überraschend und bringt neue Einsicht in die Funktion von Fas bei der UV-induzierten Dermatitis. Bis jetzt galt der Fas-abhängige Signalweg als einer der Hauptmechanismen der UV-induzierten Keratinozyten-Apoptose [111, 45, 101]. Unsere Ergebnisse zeigen jedoch zum einen, dass die UV-induzierte Apoptose von Keratinozyten ohne Fas-Rezeptor verlaufen kann und zum anderen, dass Fas möglicherweise sogar eine antiapoptotische Funktion in diesem Zusammenhang hat.

Nach Berichten von Hill et al. und Santamaria et al. zeigen die *gld*-Mäuse, die eine natürliche Mutation von Fas-Ligand tragen, eine reduzierte Zahl der Sonnenbrandzellen nach UV-Bestrahlung [45, 101]. Bei Takahashi und Kollegen wurde ein ähnliches Ergebnis mit *lpr*-Mäusen, bei welchen das Fas-Gen mutiert ist, erzielt [111]. Diese Mäuse unterscheiden sich von unserem Modell mit einer Epidermis-spezifischen Deletion zum einen dadurch, dass die Signalübertragung durch Fas in den zuerst erwähnten Mäusen ubiquitär, also in allen Zellen des Organismus gestört ist, während diese Störung in unserem Modell auf die Keratinozyten der Epidermis beschränkt ist. Eine ursächliche Rolle der bei den *gld*- und *lpr*-Mäusen stark gestörten Lymphozytenfunktion kann somit nicht ausgeschlossen werden. Bei diesen Tiermodellen finden sich zahlreiche Abnormalitäten vor allem im Immunsystem und eine eindeutige Schlussfolgerung auf die Rolle von Fas in der Entstehung der Sonnenbrandzellen ist daher nicht möglich. Allerdings zeigen Keratinozyten, die aus *lpr*-Mäusen isoliert wurden, im Vergleich zu Kontrollen anscheinend eine höhere Resistenz gegenüber der UV-induzierten Apoptose. Fas-transfizierte, SV40-transformierte humane Keratinozyten (SVHK) waren dagegen empfindlicher [111, 114]. Im Falle der „*lpr*-Zellen“ sind die extraepidermalen Konsequenzen dieser Mutation ausgeschlossen. Allerdings wurden in der dazu publizierten Arbeit Keratinozyten aus Mäusen mit völlig verschiedenen genetischen Hintergründen (MRL

und C57/Bl6, sowie Mäuse mit p53-Mutation ohne Angabe des Hintergrundes) isoliert, was eine wirkliche Vergleichbarkeit der UV-Sensitivität nicht zulässt [111].

In einigen Publikationen wurde von der Aktivierung des Fas-Rezeptors nach UV-Bestrahlung der Keratinozyten *in vitro* berichtet [11, 111, 8, 114, 95]. UV-Licht scheint auch die Rekrutierung von FADD zu stimulieren [8, 95]. Es wurde reduzierte Apoptose in UV-behandelten Zellen nach Transfektion mit einer dominant-negativen FADD-Mutante gezeigt [58], wobei hier nicht zwischen dem Fas- und dem TNFR-Weg differenziert werden kann, da FADD in beiden Signalwegen vorkommt [130].

Berücksichtigt man die nachgewiesene Aktivierung von Fas nach UV-Exposition und unsere Ergebnisse eines Anstiegs der Sonnenbrandzellen bei Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäusen, könnte man den Schluss ziehen, dass Fas auch in der UV-induzierten Dermatitis eine protektive Rolle spielt und die Epidermis vor übermässiger Apoptose der Keratinozyten schützen könnte.

#### **4.5 Bestimmung des Wachstums von kultivierten Keratinozyten**

Fas-defiziente Keratinozyten wuchsen langsamer als parallel bei gleichen Bedingungen isolierte und kultivierte Kontrollzellen ohne Fas-Defizienz. In zwei Versuchen, mit je fünf Messpunkten wurden mehr Kontroll- als Knock-out-Zellen festgestellt (gezählt sowohl als Mittelwert, als auch Summe aller Zellen).

Diese Ergebnisse sind auf zwei möglichen Weisen erklärbar. Entweder sind - im Vergleich zu den Kontrollen - mehr Fas-KO-Zellen apoptotisch, oder weniger Fas-KO-Zellen teilen sich. Das gleichzeitige Auftreten beider Mechanismen ist auch nicht ausgeschlossen. EGFR-Liganden, deren Proliferations-stimulierende Wirkung Fas vermitteln könnte, sind in der Lage, beide Effekte, d.h. Hemmung der Apoptose und Proliferationsstimulierung, hervorzurufen.

Keratinozyten-Apoptose tritt in der Kultur von Keratinozyten normalerweise nur in sehr geringem Maße auf [81]. Daher sprechen unsere Resultate eher für eine Proliferations-stimulierende als für eine antiapoptotische Rolle von Fas in kultivierten Keratinozyten. Die Fas-defizienten Zellen wuchsen langsamer, weil ihnen möglicherweise durch Fas-vermittelte Proliferations-stimulierende Signale fehlten. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass bei Psoriasis, die sich durch Keratinozyten-Hyperproliferation auszeichnet, eine erhöhte Fas-Expression in Keratinozyten nachgewiesen wurde [113].

Bemerkenswert ist weiterhin, dass die Isolierung von Fas-defizienten Keratinozyten in normalem Medium nicht gelang, da die Zellen nicht ausreichend proliferierten (Daten nicht gezeigt). Deshalb verwendeten wir hierfür filtriertes, konditioniertes Medium von Wildtyp-Keratinozyten. Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse der Wachstumskurven, die ein langsames Wachstum von Fas-defizienten Keratinozyten zeigen.

Um die Proliferation von Fas-defizienten Zellen mit einer weiteren Methode zu untersuchen, zählten wir den Anteil von S-Phase-Keratinozyten in einem Zeitfenster von zwei Stunden mit Hilfe der BrdU-Färbung. Mit dieser Methode zeigten Fas-defiziente Keratinozyten sowohl in normalem, als auch in konditioniertem Medium eine geringere BrdU-Inkorporation, obwohl die Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht statistisch signifikant waren ( $p=0,557$  in konditioniertem Medium). Dennoch unterstützten diese Ergebnisse die Beobachtung einer geringeren Proliferation von Fas-defizienten Keratinozyten.

Der Mechanismus der verringerten Proliferation von Fas-defizienten Keratinozyten bleibt ungeklärt. Unsere *in-vitro*-Ergebnisse sind mit den Daten von Iordanov et al. [47] nicht direkt vergleichbar, da hier EGF-Rezeptorliganden aus apoptotischen Keratinozyten freigesetzt werden sollen, die jedoch in Kultur nicht vorhanden sind. Außerdem enthält das Kulturmedium für Keratinozyten bereits hohe Konzentrationen von EGF ( $0,014 \mu\text{g/ml}$ ), so dass eine etwaige autokrine Wirkung anderer EGR-Liganden hierdurch weitgehend kompensiert werden müsste. Bemerkenswert ist weiterhin, dass der Proliferationsnachteil durch Fas-Defizienz auch durch den Einsatz von konditioniertem Medium, das Faktoren aus Wildtyp-Zellen enthält, nicht behoben wurde. Dies spricht gegen eine autokrine Proliferationsregulation über Fas in kultivierten Keratinozyten.

Die verringerte Proliferation Fas-defizienter Keratinozyten in Kultur steht in offenbarem Widerspruch zu den mit Ki67-Färbung und BrdU-Inkorporation erzielten *in-vivo*-Ergebnissen. Hier wurde keine verringerte Proliferation, sondern eine Abnahme der Häufigkeit apoptotischer Zellen beobachtet.

#### **4.6 Beantwortung der Fragestellungen**

1. Welche pathogenetische Bedeutung hat die Fas-vermittelte Apoptose von epidermalen Keratinozyten in der allergischen Kontaktdermatitis?

Unseren Ergebnissen nach hat die Fas-vermittelte Apoptose keine entscheidende Bedeutung bei der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis.

Die Reaktion kommt auch in Abwesenheit von Fas-Protein vor und wird dadurch nicht abgeschwächt.

## 2. Welche Rolle spielt Fas in der UV-induzierten Dermatitis?

Unsere Experimente wiesen nach, dass Fas für die UV-induzierte Apoptose der Keratinozyten nicht nötig ist. Es scheint sogar so zu sein, dass Fas die Entstehung von Sonnenbrandzellen hemmt, da wir mehr Sonnenbrandzellen bei Epidermis-spezifischen Fas-KO- als bei Wildtyp-Mäusen feststellten.

## 3. Finden wir in unserem Modell Evidenz für die hypothetische protektive Rolle von Fas hinsichtlich der in der Kontaktdermatitis sowie in der UV-induzierten Dermatitis auftretenden Apoptose epidermaler Keratinozyten?

Unser Modell gibt Evidenz dafür, dass Fas tatsächlich eine protektive Rolle hinsichtlich der in der Kontaktdermatitis, sowie in der UV-induzierten Dermatitis auftretenden Apoptose hat. Beim Fehlen von aktivem Fas-Protein wurden mehr apoptotische Keratinozyten im Vergleich zur Kontrolle - sowohl in der Kontaktdermatitis, als auch in der UV-induzierten Dermatitis - nachgewiesen. Der Mechanismus dieser Apoptose-hemmenden Funktion bleibt allerdings unklar.

**Funktionen von CD95 (Fas) in der Epidermis  
beim allergischen Kontaktekzem und bei der UV- induzierten Dermatitis**

von Alina Hedrych-Ozimina

aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Krieg

Die natürliche Rolle von Fas in der Epidermis ist bis jetzt unklar. Einige Studien über die Funktion von Fas in epidermalen Keratinozyten kommen zu der Auffassung, dass Fas für die Beseitigung von durch UV-Licht geschädigten Keratinozyten verantwortlich ist. Die Ergebnisse von Trautmann und Kollegen legen weiterhin nahe, dass Fas für die durch Interaktionen mit aktivierten T-Zellen hervorgerufene Apoptose essenziell ist. In einer anderen *in vitro*-Studie von Iordanov und Kollegen wurde die Rolle von Fas in der Regeneration der Epidermis in entzündlichen Prozessen, besonders in der Kontaktdermatitis untersucht.

Für unsere Untersuchungen haben wir eine Epidermis-spezifische Fas-Knock-Out-Maus generiert. In unseren Kontaktdermatitis-Versuchen entwickelten die Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse im Vergleich zu den Kontrollen ein normal ausgeprägtes Entzündungsödem. Es wurden keine Unterschiede zwischen diesen Mäusen und Kontrollen in der Dicke des entzündeten Ohres festgestellt. Im Gegensatz zu den *in vitro* Untersuchungen von Trautmann und Kollegen scheint Fas *in vivo* keine entscheidende Bedeutung für die Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis zu haben. Die Epidermis-spezifische Deletion des Fas-Proteins führte in unseren Kontaktdermatitis-Experimenten zu einer Erhöhung der Anzahl apoptotischer Keratinozyten. Die Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out-Mäuse zeigten ca. 50% mehr apoptotischer Zellen in der Epidermis. Die Fas-Deletion hatte in unseren Versuchen keinen erkennbaren Einfluss auf die Proliferation der Keratinozyten bei allergischer Kontakt-Dermatitis. Sowohl mittels Ki-67-, als auch BrdU-Färbung von proliferierenden Zellen wurden die gleichen Zellzahlen bei Epidermis-spezifischen Fas-Knock-out- und Kontroll-Mäusen gezählt. Bei Fas-Knock-out-Mäusen wiesen wir in zwei unabhängigen Versuchen mehr Sonnenbrandzellen nach UVB-Bestrahlung als bei Kontrollmäusen nach. Der Unterschied betrug sowohl nach 18 Stunden ab der Bestrahlung, als auch nach 24 Stunden ca. 35%.

In unseren *in-vitro*-Versuchen wuchsen Fas-defiziente Keratinozyten langsamer als parallel bei gleichen Bedingungen isolierte und kultivierte Kontrollzellen ohne Fas-Defizienz. Fas-defiziente Keratinozyten zeigten sowohl in normalem, als auch in konditioniertem Medium eine geringere BrdU-Inkorporation, obwohl die Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen nicht statistisch signifikant waren ( $p=0,557$  in konditioniertem Medium).

Unseren Ergebnissen nach hat die Fas-vermittelte Apoptose keine entscheidende Bedeutung bei der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis. Die Experimente wiesen auch nach, dass Fas für die UV-induzierte Apoptose der Keratinozyten nicht nötig ist. Beim Fehlen von aktivem Fas-Protein wurden mehr apoptotische Keratinozyten im Vergleich zur Kontrolle - sowohl in der Kontaktdermatitis, als auch in der UV-induzierten Dermatitis - nachgewiesen. Unser Modell gibt Evidenz dafür, dass Fas tatsächlich eine protektive Rolle hinsichtlich der in der Kontaktdermatitis sowie in der UV-induzierten Dermatitis auftretenden Apoptose hat.

## Literatur

1. Abremski K., Hoess R. (1984). Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chem.* 259, 1509-1514
2. Ahmed S.A., Talal N. (1990). Sex hormones and the immune system - Part 2. *Baillieres Clin. Rheumatol.* 4, 13-31
3. Akiba H., Kehren J., Ducluzeau M-T., Krasteva M., Horand F., Kaiserlian D., Kaneko F., Nicolas J-F. (2002). Skin Inflammation During Contact Hypersensitivity is Mediated by Early Recruitment of CD8+ T Cytotoxic 1 Cells Inducing Keratinocyte Apoptosis. *J. Immunol.* 168, 3079-3087
4. Alam A., Cohen L.Y., Aouad S. and Sekaly R.P. (1999). Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J. Exp. Med.* 190, 1879-1890
5. Albanell J., Codony-Servat J., Rojo F., Del Campo J.M., Sauleda S., Anido J., Raspall G., Giralt J., Roselló J., Nicholson R.I., Mendelsohn J., Baselga J. (2001). Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res.* 61, 6500-6510
6. Alderson M.R., Armitage R.J., Maraskovsky E., Tough T.W., Roux E., Schooley K., Ramsdell F., Lynch D.H. (1993). Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178, 2231-2235
7. Allombert-Blaise C., Tamiji S., Mortier L., Fauvel H. Tual M., Delaporte E., Piette F., DeLassale E.M., Formstecher P., Marchetti P., Polakowska R. (2003). Terminal differentiation of human epidermal keratinocytes involves mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway. *Cell Death Differ.* 10, 850-852

8. Aragane J., Kulms D., Metze D., Wilkes G., Poeppelmann B., Luger T.A., Schwarz T.(1998). Ultraviolet Light Induces Apoptosis via Direct Activation of CD95 (Fas/APO-1) Independently of Its Ligand CD95L. *J. Cell Biol.* 140, 171-182
9. Arnold R., Seifert M., Asadullah K., Volk H.D. (1999). Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas ligand interaction: modulation by cytokines. *J. Immunol.* 162, 7140-7147
10. Aubin F. (2003). Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression. *Eur J Dermatol.* 13, 515-523
11. Bang B., Gniadecki R., Larsen J.K., Baadsgaard O., Skov L. (2003). In vivo UVB irradiation induces clustering of Fas (CD95) on human epidermal cells. *Exp. Dermatol.*12, 791-798
12. Belleudi F., Leone L., Aimati L., Stirparo M.G., Cardinali G., Marchese C., Frati L., Picardo M., Torrisi M.R.(2006). Endocytic pathways and biological effects induced by UVB-dependent or ligand-dependent activation of the keratinocyte growth factor receptor. *FASEB J.* 20, 395-397
13. Bellgrau D., Gold D., Selawry H., Moore J., Franzusoff A., Duke R.C. (1995). A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature* 377, 630-632
14. Bérout C., Verdier F., Soussi T. (1996). p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res.* 24, 147-150
15. Berthou C., Michel L., Soulié A., Jean-Louis F., Flageul B., Dubertret L., Sigaux F., Zhang Y., Sasportes M. (1997). Acquisition of granzyme B and Fas ligand proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense. *J. Immunol.* 159, 5293-5300
16. Bhardwaj A., Aggarwal B.B. (2003). Receptor-Mediated Choreography of Life and Death. *J. Clin. Immunol.* 23, 317-332

17. Bour H., Peyron E., Gaucherand M., Garrigue J-L., Desvignes C., Kaiserlian D., Revillard J-P., Nicolas J-F.(1995). 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.* 25, 3006-3010
18. Bowen A.R., Hanks A.N., Murphy K.J., Florell S.R., Grossman D. (2004). Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. *Am. J. Dermatopathol.* 26, 177-81
19. Braun-Falco O. (2005). *Dermatologie und Venerologie*. 5. Auflage, Heidelberg: Springer.
20. Chinnaiyan A.M., Tepper C.G., Seldin M.F. O'Rourke K., Kischkel F.C., Hellbardt S., Krammer P.H., Peter M.E., Dixit V.M. (1996). FADD/MORT1 Is a Common Mediator of CD95 (Fas/APO-1) and Tumor Necrosis Factor Receptor-induced Apoptosis. *J. Cell Biol.* 271, 4961-4965
21. Claerhout S., Van Laethem A., Agostinis P., Garmyn M.(2006). Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5, 199-207
22. Daher A., Simbulan-Rosenthal C.M., Rosenthal D.S. (2006). Apoptosis induced by ultraviolet B in HPV-immortalized human keratinocytes requires caspase-9 and is death receptor independent. *Exp. Dermatol.* 15, 23-34
23. de Giorgi V., Sestini S., Massi D., Ghersetich I., Lotti T. (2007). Keratinocyte growth factor receptors. *Dermatol. Clin.* 25, 477-485
24. Famularo G., Nucera E., Marcellini S., De Simone C. (1999). Fas/Fas ligand on the road: an apoptotic pathway common to AIDS, autoimmunity, lymphoproliferation and transplantation. *Med. Hypotheses* 53, 50-62
25. Farley S.M., Dotson A.D., Purdy D.E., Sundholm A.J., Schneider P., Magun B.E., Iordanov M.S. (2006). Fas ligand elicits a caspase-independent proinflammatory response in human keratinocytes: implications for dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 126, 2438-2451

26. Farley S.M., Purdy D.E., Ryabinina O.P., Schneider P., Magun B.E., Iordanov M.S. (2007). Fas ligand-induced proinflammatory transcriptional responses in reconstructed human epidermis: Recruitment of the epidermal growth factor receptor and activation of MAP kinases. *J. Biol. Chem.* 283, 919-928
27. Ferguson T.A., Griffith T.S. (2007). The role of Fas ligand and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the ocular immune response. *Chem. Immunol. Allergy* 92, 140-154
28. Fijak M., Meinhardt A. (2006). The testis in immune privilege. *Immunol Rev.* 213, 66-81
29. Filipowicz E., Adegboyega P., Sanchez R.L., Gatalica Z. (2002). Expression of CD95 (Fas) In Sun-Exposed Human Skin and Cutaneous Carcinomas. *Cancer* 94, 814-819
30. Fisher G.H., Rosenberg F.J., Straus S.E., Dale J.K., Middleton L.A., Lin A.Y., Strober W., Lenardo M.J., Puck J.M. (1995). Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946
31. Fraser A., Evan G. (1996). A License to Kill. *Cell* 85, 781-784
32. French L.E., Hahne M., Viard I., Radlgruber G., Zanone r., Becker K., Mueller Ch., Tschopp J.: Fas and Fas Ligand in Embryos and Adult Mice (1996). Ligand Expression in Several Immune-privileged Tissues and Coexpression in Adult Tissues Characterized by Apoptotic Cell Turnover. *J. Cell Biol.* 133, 335-343
33. Furukawa F., Yoshimasu T. (2005). Animal models of spontaneous and drug-induced cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 4, 345-350
34. Gaspari A.A., Katz S.I. (2001). Contact hypersensitivity. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 4: Unit 4.2.
35. Gocinski B.L., Tigelaar R.E. (1990). Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.* 144, 4121-4128

36. Griffith T.S., Brunner T., Fletcher S.M., Green D.R., Ferguson T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* 270, 1189-1192
37. Griffith T.S., Ferguson T.A. (1997). The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol. Today* 18, 240-244
38. Grossman D., Kim P.J., Blanc-Brude O.P., Brash D.E., Tognin S., Marchisio P.C., Altieri D.C. (2001). Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J. Clin. Invest.* 108, 991-999
39. Gutierrez-Steil C., Wrono-Smith T., Sun X., Krueger J.G., Coven T., Nickoloff B.J. (1998). Sunlight-induced basal cell carcinoma tumor cells and ultraviolet-B-irradiated psoriatic plaques express Fas ligand (CD95L). *J. Clin. Invest.* 101, 33-39
40. Haase I., Hobbs R.M., Romero M.R., Broad S., Watt F.M. (2001). A role for mitogen-activated protein kinase activation by integrins in the pathogenesis of psoriasis. *J. Clin. Invest.* 108, 527-53
41. Haase I., Hunzelmann N. (2002). Activation of epidermal growth factor receptor/ERK signaling correlates with suppressed differentiation in malignant acanthosis nigricans. *J. Invest. Dermatol.* 118, 891-893
42. Haase I., Pasparakis M., Krieg T. (2004). Genetically Modified Mice as a Tool to Study Inflammatory Skin Diseases. *J. Dermatol.* 31, 704-719
43. Hafner M., Wenk J., Nenci A., Pasparakis M., Scharffetter-Kochanek K., Smyth N., Peters T., Kess D., Holtkötter O., Shephard P., Kudlow J.E., Smola H., Haase I., Schippers A., Krieg T., Müller W. (2004). Keratin 14 Cre transgenic mice authenticate keratin 14 as an oocyte-expressed protein. *Genesis* 38, 176-181
44. Hao Z., Hampel B., Yagita H., Rajewski K. (2004). T Cell-specific Ablation of Fas Leads to Fas Ligand-mediated Lymphocyte Depletion and Inflammatory Pulmonary Fibrosis. *J. Exp. Med.* 199, 1355-1365

- 44a. Hedrych-Ozimina A., Behrendt K., Hao Z., Pofahl R., Ussath D., Knaup R., Krieg T., Haase I. (2011). Enhanced contact allergen- and UVB-induced keratinocyte apoptosis in the absence of CD95/Fas/Apo-1. *Cell Death Differ.* 18, 155-163
45. Hill L.L., Ouhtit A., Loughlin S.M., Kripke M.L., Anathaswamy H.N., Owen-Schaub L.B.(1999). Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science* 275, 898-900
46. Hill L.L., Shreedhar V.K., Kripke M.L., Owen-Schaub L.B. (1999). A Critical Role for Fas Ligand in the Active Suppression of Systemic Immune Responses by Ultraviolet Radiation. *J. Exp. Med.* 189, 1285-1293
47. Iordanov M.S., Sundholm A.J., Simpson E.L., Hanifin J.M., Ryabinina O.P., Choi R.J., Korchevaq V.B., Schneider P., Magun B.E. (2005). Cell Death-Induced Activation of Epidermal Growth Factor Receptor in Keratinocytes: Implications for Restricting Epidermal Damage in Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 125, 134-142
48. Jost M., Gasparro F.P., Jensen P.J., Rodeck U. (2001). Keratinocyte Apoptosis Induced by Ultraviolet B Radiation and CD95 ligation – Differential Protection through Epidermal Growth Factor Receptor Activation and Bcl-xl Expression. *J. Invest. Dermatol* 116, 860-866
49. Jost M., Huggett T.M., Kari C., Boise L.H., Rodeck U. (2001). Epidermal Growth Factor Receptor-dependent Control of Keratinocyte Survival and Bcl-xl Expression through a MEK-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 6320-6326
50. Jung E.G., Moll I. (2002). *Dermatologie. Duale Reihe. 5. Auflage* , Stuttgart: Thieme
51. Kaegi D., Vignaux F., Ledermann B., Buerki K., Depraetere V., Nagata S., Hengartner H., Golstein P.(1999). Fas and Perforin Pathways as Major Mechanisms of T Cell- Mediated Cytotoxicity. *Science* 265, 528-530
52. Kamitani T., Nguyen H.P., Yeh E.T.H. (1997). Preferential modification of nuclear proteins by a novel ubiquitin-like molecule. *J. Biol. Chem.* 272, 14001-14004

53. Kashkar H., Wiegmann K., Yazdanpanah B., Haubert D., Kroenke M. (2005). Acid Sphingomyelinase Is Indispensable for UV Light-induced Bax Conformational Change at the Mitochondrial Membrane. *J. Biol. Chem.* 280, 20804-20813
54. Kataoka T., Shinohara N., Takayama H., Takaku K., Kondo S., Yonehara S., Nagai K. (1996). Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 156, 3678-3686
55. Kehren J., Desvignes C., Krasteva M., Ducluzeau M-T., Assossou O., Horand F., Hahne M., Kaegi D., Kaiserlian D., Nicolas J-F. (1999). Cytotoxicity Is Mandatory for T Cell-mediated Contact Hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 189, 779-786
56. Kerr J. F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 27, 181-182
57. Kerr J.F, Wyllie A.H., Currie A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-57
58. Kim P.K., Weller R., Hua Y. Billiar T.R.(2003).Ultraviolet irradiation increases FADD protein in apoptotic human keratinocytes. *Biochem. Biophys. Res. commun.* 302, 290-295
59. Kitanaka C., Kuchino Y. (1999). Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death. Differ.* 6, 508-515
60. Kock A., Schwarz T., Kirnbauer R., Urbanski A., Perry P., Ansel J.C., Luger T.A. (1990). Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J. Exp. Med.* 172, 1609-1614
61. Kroemer G., Martin S.J. (2005). Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* 11, 725-730

62. Krueger J.G., Wolfe J.T., Nabeya R.T., Vallat V.P., Gilleaudeau P., Heftler N.S., Austin L.M., Gottlieb A.B. (1995). Successful ultraviolet B treatment of psoriasis is accompanied by a reversal of keratinocyte pathology and by selective depletion of intraepidermal T cells. *J. Exp. Med.* 182, 2057-2068
63. Kulms D., Schwarz T. (2000). Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 16, 195-201
64. Kulms D. Zeise E. Poppelmann B., Schwarz T. (2002). DNA damage, death receptor activation and reactive oxygen species contribute to ultraviolet radiation-induced apoptosis in an essential and independent way. *Oncogene* 21, 5844-5851
65. Lee S.H., Jang J.J., Lee J.Y., Kim S.Y., Park W.S., Shin M.S., Dong S.M., Na E.Y., Kim K.M., Kim C.S., Kim S.H., Yoo N.J. (1998). Fas ligand is expressed in normal skin and in some cutaneous malignancies. *Br. J. Dermatol.* 139, 186-191
66. Leigh I.M., Lane E.B., Watt F.M. (1994). *The Keratinocyte Handbook*. Cambridge University Press.
67. Leist M., Jaatela M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 589-598
68. Leverkus M., Yaar M., Gilchrist B.A. (1997). Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 232, 255-262
69. Lippens S., Denecker G., Ovaere P., Vandenabeele P., Declercq W. (2005). Death penalty for keratinocytes: apoptosis versus cornification. *Cell Death Differ.* 12, 1497-1508
70. Lockshin R.A., Zakeri Z. (2004). Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23, 2766-2773
71. Matsue H., Kobayashi H., Hosokawa T., Akitaya T., Ohkawara A. (1995). Keratinocytes constitutively express the Fas antigen that mediates apoptosis in IFN $\gamma$ -treated cultured keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.* 287, 315-320

72. Melnikova V.O., Ananthaswamy H.N. (2005). Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat. Res.* 571, 91-106
73. Morita A., Werfel T., Stege H., Ahrens C., Karmann K., Grewe M., Grether-Beck S., Ruzicka T., Kapp A., Klotz L.O., Sies H., Krutmann J. (1997). Evidence that singlet oxygen-induced human T helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapy. *J. Exp. Med.* 186, 1763-1768
74. Murphy G., Young A.R., Wulf H.C., Kulms D., Schwarz T. (2001). The molecular determinants of sunburn cell formation. *Exp. Dermatol.* 10, 155-160
75. Nagata S. (1996). Fas-induced apoptosis, and disease caused by its abnormality. *Genes Cells* 1, 873-879
76. Nagata S. (1998). Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J. Hum. Genet.* 43, 2-8
77. Newton K., Harris A.W., Bath M.L., Smith K.G. and Strasser A. (1998). A dominant interfering mutant of FADD/MORT1 enhances depletion of autoreactive thymocytes and inhibits proliferation of mature T-lymphocytes. *EMBO J.* 17, 706-718
78. Niederkorn J.Y. (2006). See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat. Immunol.* 7, 354-349
79. Nishimura Y., Ishii A., Kobayashi Y., Yamasaki Y., Yonehara S. (1995). Expression and function of mouse Fas antigen on immature and mature T cells. *J. Immunol.* 154, 4395-4403
80. Norris D.A., Middleton M.H., Whang K., Schleicher M., McGovern T., Bennion S.D., David-Bajar K., Davis D. and R.C. Duke (1997). Human keratinocytes maintain reversible anti-apoptotic defenses in vivo and in vitro. *Apoptosis* 2, 136-148
81. Norsgaard H., Clark B.F., Rattan S.I. (1996). Distinction between differentiation and senescence and the absence of increased apoptosis in human keratinocytes undergoing cellular aging in vitro. *Exp. Gerontol.* 31, 563-570

82. Novotny E.A., Raveche E.S., Sharrow S., Ottinger M., Steinberg A.D. (1983). Analysis of thymocyte subpopulations following treatment with sex hormones. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 28, 205-217
83. Oishi M., Maeda K., Sugiyama S. (1994). Distribution of apoptosis-mediating Fas-antigen in human skin and effects of anti-Fas monoclonal antibody on human epidermal keratinocyte and squamous cell carcinoma cell lines. *Arch. Dermatol. Res.* 286, 396-407
84. Ouhtit A., Gorny A., Muller H.K., Hill L.L., Owen-Schaub L., Ananthaswamy H.N.(2000). Loss of Fas-ligand expression in mouse keratinocytes during UV-carcinogenesis. *Am. J. Pathol.* 157, 1975-81
85. Ozawa M., Ferenczi K., Kikuchi T., Cardinale I., Austin L.M., Coven T.R., Burack L.H., Krueger J.G. (1999). 312-nanometer ultraviolet B light (narrow-band UVB) induces apoptosis of T cells within psoriatic lesions. *J. Exp. Med.* 189, 711-718
86. Pasparakis M., Courtois G., Hafner M., Schmidt-Supprian M., Nenci a., Toksoy A., Goebeler M., Gillitzer R., Israel A., Krieg T., Rajewski K., Haase I. (2002). TNF- mediated inflammatory skin disease in mice with epidermis-specific deletion of IKK2. *Nature* 417, 861-866
87. Peter M.E., Krammer P.H. (2003). The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10, 26-35
88. Pinkoski M.J., Waterhouse N.J., Heibei J.A., Wolf B.B., Kuwana T., Goldstein J.C., Newmeyer D.D., Bleackley R.C., Green D.R. (2001). Granzyme B-mediated Apoptosis Proceeds Predominantly through a Bcl-2-inhibitable Mitochondrial Pathway. *J. Biol. Chem.* 276, 12060-12067
89. Piwocka K., Zablocki K., Wieckowski M.R., Skierski J., Feiga I., Szopa J., Drela N., Wojtczak L., Sikora E. (1999). Novel apoptosis-like Pathway, Independent of Mitochondria and Caspases, Induced by Curcumin in human Lymphoblastoid T (Jurkat) Cells. *Exp. Cell Res.* 249, 299-307

90. Ptak W., Dobrowolski Z., Marcinkiewicz J., Gryglewski A. (1988). Sex differences in regulation of contact sensitivity reaction in mice. 1. Influence of sex on the generation of contrasuppressor and afferent suppressor cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 47, 289-295
91. Raj D., Brash D.E., Grossman D. (2006). Keratinocyte Apoptosis in Epidermal Development and Disease. *J. Invest. Dermatol.* 126, 243-257
92. Rassner G., Steinert U., Schlegelhauff B. (2006). *Dermatologie. Lehrbuch und Atlas.* 8. Auflage, München: Urban & Fischer
93. Reed J.C. (2001). The Survivin saga goes in vivo. *J. Clin. Invest.* 108, 965-96
94. Reefman E., Limburg P.C., Kallenberg C.G.M., Bijl M. (2005). Apoptosis in Human Skin. Role in Pathogenesis of Various diseases and Relevance for Therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1051, 52-63
95. Rehemtulla A., Hamilton C.A., Chinnaiyan A.M., Dixit V.M. (1997). Ultraviolet Radiation-induced Apoptosis is Mediated by Activation of CD-95 (FAS/APO-1). *J. Cell Biol.* 272, 25783-25786
96. Rieux-Laucat F., Le Deist F., Hivroz C., Roberts I.A., Debatin K.M., Fischer A., de Villartay J.P. (1995). Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349
97. Rodeck U., Jost M., DuHadaway J., Kari C., Jensen P.J., Risse B., Ewert D.L. (1997). Regulation of Bcl-x1 expression in human keratinocytes by cell-substratum adhesion and the epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5067-5072
98. Rodeck U., Jost M., Kari C., Shih D-T., Lavker R.M., Ewert D.L., Jensen P.J. (1997). EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J. Cell Sci.* 110, 113-121

- 98 a. Roers A, Siewe L, Strittmatter E, Deckert M, Schlüter D, Stenzel W, Gruber AD, Krieg T, Rajewsky K, Müller W. (2004). T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation. *J. Exp. Med.* 200, 1289-97
99. Rossiter H., Beissert S., Mayer C., Schoen M.P., Wienrich G., Tschachler E., Kupper T.S. (2001). Targeted Expression of bcl-2 to Murine Basal Epidermal Keratinocytes Results in Paradoxical Retardation of Ultraviolet- and Chemical-induced Tumorigenesis. *Cancer Res.* 61, 3619-3626
100. Saint-Mezard P., Rosieres A., Krasteva M., Berard F., Dubois B., Kaiserlian D., Nicolas J-F. (2004). Allergic contact dermatitis. *Eur. J. Dermatol.* 14, 284-295
101. Santamaria A.B., Davis D.W., Nghiem D.X., McConkey D.J., Ullrich S.E., Kapoor M., Lozano G., Anathaswamy H.N.(2002). p53 and Fas ligand are required for psoralen and UVA-induced apoptosis in mouse epidermal cells. *Cell Death Differ.* 9, 549-560
102. Sayama K., Yonehara S., Watanabe Y., Miki Y. (1994). Expression of Fas Antigen on Keratinocytes In Vivo and Induction of Apoptosis in Cultured Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 103, 330-334
103. Schwarz A., Bhardwaj R., Aragane Y.(1995). Ultraviolet-B-induced apoptosis of keratinocytes: evidence for partial involvement of tumor necrosis factor-alpha in the formation of sunburn cells. *J. Invest. Dermatol.* 104, 922-927
104. Schwarz A., Grabbe S., Grosse-Heitmeyer K., Roters B., Riemann H., Luger T.A., Trinchieri G., Schwarz T. (1998). Ultraviolet light-induced immune tolerance is mediated via the Fas/Fas-ligand system. *J. Immunol.* 160, 4262-4270
105. Schwarz T. (1998). UV light affects cell membrane and cytoplasmic targets. *Photochem. Photobiol. B: Biology* 44, 91-96
106. Schwarz T. (2000). No eczema without keratinocyte death. *J. Clin. Invest.* 106, 9-10

107. Sheikh M.S., Antinore M.J., Huang Y., Fornace A.J. Jr. (1998). Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1. *Oncogene* 17, 2555-2563
108. Sitailo L.A., Shalini S.T., Denning M.F. (2002). Activation of Caspase-9 Is Required for UV-induced Apoptosis of Human Keratinocytes *J. Biol. Chem.* 277, 19346-19352
109. Srinivasula S.M., Ahmad M., Otilie S., Bullrich F., Banks S., Wang Y., Fernandes-Alnemri T., Croce C.M., Litwack G., Tomaselli K.J., Armstrong R.C., Alnemri E.S.(1997). FLAME-1, a Novel FADD-like Anti-apoptotic Molecule That Regulates Fas/TNFR1-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 18542-18545
110. Stoll S.W., Benedict M., Mitra R., Hiniker A., Elder J.T., Nunez G. (1998). EGF receptor signaling inhibits keratinocytes apoptosis: evidence for mediation by Bcl-xl. *Oncogene* 16, 1493-1499
111. Takahashi H., Ishida-Yamamoto A., Iizuka H. (2001). Ultraviolet B Irradiation Induces Apoptosis of Keratinocytes by Direct Activation of Fas Antigen. *J. Invest. Dermatol. Symposium Proceedings* 6, 64-68
112. Takahashi H., Kobayashi H., Hashimoto Y., Matsuo S., Iizuka H. (1995). Interferon-gamma-dependent stimulation of Fas antigen in SV40-transformed human keratinocytes: modulation of the apoptotic process by protein kinase C. *J. Invest. Dermatol.* 105, 810-815
113. Takahashi H., Manabe A., Ishida-Yamamoto A., Hashimoto Y., Iizuka H. (2002). Aberrant expression of apoptosis-related molecules in psoriatic epidermis. *J. Dermatol. Sci.* 28, 187-97
114. Takahashi H., Nakamura S., Asano K., Kinouchi M., Ishida-Yamamoto A., Iizuka H.(1999). Fas Antigen Modulates Ultraviolet B-Induced Apoptosis of SVHK Cells: Sequential Activation of Caspase 8, 3 and 1 in the Apoptotic Process. *Exp. Cell Res.* 249, 291-298

115. Tanaka T., Umesaki N. (2003). Fas antigen (CD95) mediates cell survival signals to regulate functional cellular subpopulations in normal human endometrial stromal cells. *Int. J. Mol. Med.* 11, 757-762
116. Teraki Y., Shiohara T. (1999). Apoptosis and the skin. *Eur. J. Dermatol.* 9, 413-426
117. Traidl C., Sebastiani S., Albanesi C., Merk H.F., Puddu P., Girolomoni G., Cavani A. (2000). Disparate Cytotoxic Activity of Nickel-Specific CD8+ and CD4+ Cell Subsets Against Keratinocytes. *J. Immunol.* 165, 3058-3064
118. Trautmann A., Akdis M., Kleemann D., Altnauer F., Simon H-U., Graeve T., Noll M., Broecker E-B., Blaser K., Akdis C. A. (2000). T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J. Clin. Invest.* 106, 25-35
119. Viard I., Wehrli P., Bullani R., Schneider P., Holler N., Salomon D., Hunziker T., Saurat J.H., Tschopp J., French L.E. (1998). Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. *Science* 282, 490-493
120. Vogel G. (2007). Nobel Prizes. A knockout award in medicine. *Science* 318, 178-179
121. Wang X., Bregegere F., Soroka Y., Kayat A., Redziniak G., Milner Y. (2004). Enhancement of Fas-mediated apoptosis in ageing human keratinocytes. *Mech. Ageing Dev.* 125, 237-249
122. Watanabe-Fukunaga R., Brannan C.I., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nagata S. (1992). Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317
123. Weber A., Langhanki L., Sommerer F., Markwarth A., Wittekind C., Tannapfel A. (2003). Mutations of the BRAF gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncogene* 22, 4757-4759
124. Wehrli P., Viard I., Bullani R., Tschopp J., French L.E.(2000). Death Receptors in Cutaneous Biology and Disease. *J. Invest. Dermatol.* 115, 141-148

125. Weil M., Raff M.C., Braga V.M.M. (1999). Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *Curr. Biol.* 9, 361-365
126. Weisfelner M.E., Gottlieb A.B. (2003). The role of apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J. Drugs Dermatol.* 4, 385-391
127. Xu B., Bulfone-Paus S., Aoyama K., Yu S., Huang P., Morimoto K., Matsushita T., Takeuchi T. (2003). Role of Fas/Fas ligand-mediated apoptosis in murine contact hypersensitivity. *Int. Immunopharmacol.* 3, 927-938
128. Yawalkar N., Hunger R.E., Buri C., Schmid S., Egli F., Brand Ch.U., Mueller Ch., Pichler W.J., Braathen L.R. (2001). A Comparative Study of the Expression of Cytotoxic Proteins in Allergic Contact Dermatitis and Psoriasis. *Am. J. Pathol.* 158, 803-808
129. Zhang J., Cado D., Chen A., Kabra N.H., Winoto A. (1998). Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300
130. Zhuang L., Wang B., Sauder D.N. (2000). Molecular Mechanism of Ultraviolet-Induced Keratinocyte Apoptosis. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 445-454
131. Zhuang L., Wang B., Shinder G.A., Shivji G.M., Mak T.W., Sauder D.N. (1999). TNF Receptor p55 Plays a Pivotal Role in Murine Keratinocyte Apoptosis Induced by Ultraviolet B Irradiation. *J. Immunol.* 162, 1440-1447
132. Ziegler A., Jonason A.S., Leffell D.J., Simon J.A., Sharma H.W., Kimmelman J., Remington L., Jacks T., Brash D.E. (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 372, 773-776



Vorabveröffentlichung

# Enhanced contact allergen- and UVB-induced keratinocyte apoptosis in the absence of CD95/Fas/Apo-1

A Hedrych-Ozimina<sup>1</sup>, K Behrendt<sup>1</sup>, Z Hao<sup>2</sup>, R Pofahl<sup>1</sup>, D Ussath<sup>1</sup>, R Knaup<sup>1</sup>, T Krieg<sup>1</sup> and I Haase<sup>1\*</sup>

Fas/CD95/Apo-1 is a ubiquitously expressed cell-surface receptor involved in the initiation of programmed cell death. Its function in epidermal keratinocytes has been incompletely defined. Available evidence from *in vitro* studies points to important roles of Fas in the pathogenesis of contact dermatitis and in keratinocyte apoptosis induced by ultraviolet light. To define functions of Fas in the epidermis *in vivo*, we have generated mice with epidermis-specific deletion of the *fas* gene and tested its requirement for 2,4-dinitrofluorobenzene-induced contact dermatitis and for ultraviolet light B (UVB)-induced keratinocyte apoptosis. We report here our unexpected finding that keratinocyte apoptosis induced by both a contact allergen and UVB irradiation was significantly enhanced in Fas-negative epidermis. Expression of Fas by epidermal keratinocytes was neither necessary for the normal development of contact hypersensitivity of the skin, nor required for keratinocyte apoptosis following UVB irradiation. Our study results thus show that in the epidermis *in vivo* Fas exerts antiapoptotic effects that outweigh its proapoptotic role in contact hypersensitivity responses of the skin and in the tissue response of the epidermis to UVB irradiation. *Cell Death and Differentiation* (2011) 18, 155–163; doi:10.1038/cdd.2010.83; published online 6 August 2010

Fas (APO-1/CD 95) is a widely expressed cell-surface receptor belonging to the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily. The receptor chains are expressed on the cell surface as preassociated homotrimers. Binding of its cognate ligand, FasL, is thought to result in super clustering to form oligomeric receptor complexes. As a consequence, several proteins accumulate next to the cytoplasmic domain of Fas and form the death-inducing signaling complex (DISC).<sup>1</sup> Two important components of the DISC are the adaptor protein Fas-associated death domain (FADD) and its binding partner caspase-8. Caspase-8 is a cysteine protease functioning as initiator of a cascade of proteolytic cleavage steps that finally leads to the activation of effector caspases. Effector caspases, such as the cysteine protease caspase-3, cleave various intracellular proteins thereby inducing cellular changes that cause the phenomenon of apoptosis. In cells, caspase-3 is sequestered as a zymogen (p32 caspase-3). On activation of the proapoptotic effector cascade, this is converted into active caspase-3 by proteolytic cleavage. Activation of caspase-3 can be detected in tissues and cells by immunostaining using cleavage site-specific antibodies.<sup>2</sup>

Epidermal keratinocytes have been shown to express Fas,<sup>3</sup> and ligation of Fas with a specific antibody can induce apoptosis of keratinocytes in culture after preincubation with  $\gamma$ -interferon. In addition, supernatant from activated human T lymphocytes containing both FasL and  $\gamma$ -interferon induced

apoptosis of cultured human keratinocytes. Apoptosis of Fas-expressing epidermal keratinocytes in association with T-lymphocytes-expressing FasL has also been described in contact dermatitis and atopic dermatitis and was thought to be important in the pathogenesis of these conditions.<sup>4</sup> The dissociation of epidermal keratinocytes with breakup of cell-cell contacts and formation of intra epidermal blisters, a phenomenon called spongiosis, has been thought to be mediated by Fas/FasL interactions. In addition to Fas/FasL interactions, perforin expressed by cytotoxic T lymphocytes can cause killing of keratinocytes. This additional mechanism of killing was shown to be of relevance in contact dermatitis in mice.<sup>5,6</sup>

In addition to its role in initiating apoptosis, Fas signaling has also been proposed to activate non-cell autonomous antiapoptotic mechanisms in eczematous dermatitis. On induction of Fas signaling, epidermal keratinocytes produce ligands for the epidermal growth factor receptor (EGFR) such as amphiregulin, transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) and others. These have been shown to activate antiapoptotic EGFR signaling in neighboring keratinocytes to protect them from apoptosis and thus restrict tissue damage. In addition, EGFR-dependent signals induced by Fas stimulation in keratinocytes have been implicated in the production of proinflammatory cytokines that could contribute to the inflammatory reaction in eczematous dermatitis.<sup>7,8</sup>

<sup>1</sup>Department of Dermatology, Center for Molecular Medicine, University of Cologne, Joseph-Stelzmann-Strasse 9, Cologne 50624, Germany and <sup>2</sup>The Campbell Family Institute for Cancer Research, Ontario Cancer Institute, University Health Network, Toronto, M5G 2C1 Ontario, Canada

\*Corresponding author: I Haase, Department of Dermatology, Center for Molecular Medicine, University of Cologne, Joseph-Stelzmann-Strasse 9, Cologne 50624 Germany. Tel: +4 92 214 788 6360; Fax: +4 92 214 788 6348; E-mail: Ingo.Haase@uni-koeln.de

**Keywords:** CD95; Fas; epidermis; apoptosis; sunburn cell; eczematous dermatitis

**Abbreviations:** DH, contact hypersensitivity; DISC, death-inducing signaling complex; DNFB, 2,4-dinitrofluorobenzene; EGFR, epidermal growth factor receptor; FADD, Fas-associated death domain; FasL, Fas ligand; FI, fixed; H/E, hematoxylin and eosin; KO, knockout; MEFs, murine embryonic fibroblasts; PI-3K, phosphatidylinositol-3-kinase; SBC, sunburn cells; TGF- $\alpha$ , transforming growth factor- $\alpha$ ; TNF, tumor necrosis factor; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling; UVB, ultraviolet light B

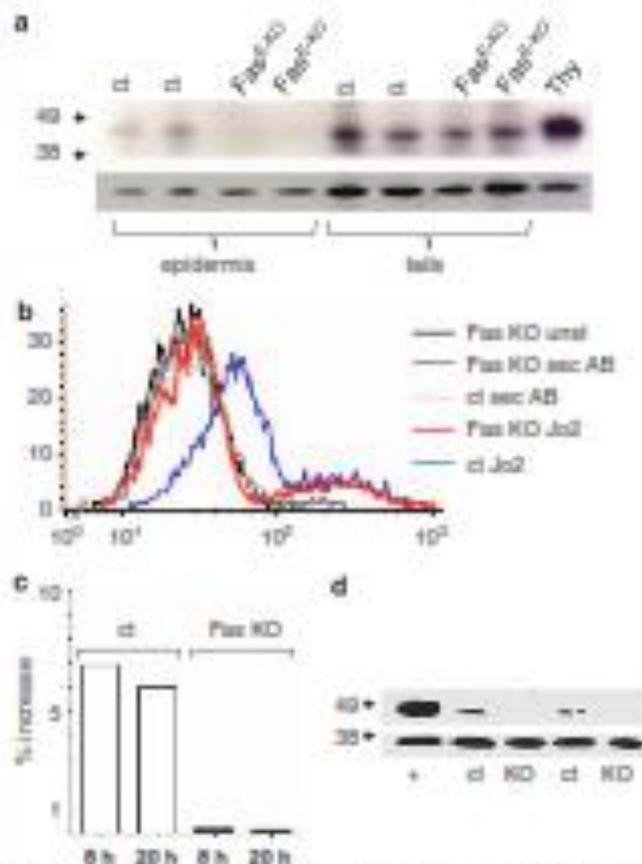
Received 26.11.09; revised 17.5.10; accepted 26.5.10; Edited by W Dederj; published online 06.8.10

Keratinocyte apoptosis in skin exposed to ultraviolet light (UV light) is characterized by the formation of sunburn cells (SBC). This is thought to be the main mechanism by which potentially transforming mutations are eliminated from the skin. UV light induces DNA damage that leads, in case of irreparability, to p53-mediated apoptosis of the damaged cell.<sup>9</sup> The activity of DNA repair mechanisms, which determines whether keratinocytes undergo apoptosis, can be regulated by factors of the extracellular milieu.<sup>10</sup> In addition to this DNA damage response, apoptosis of epidermal keratinocytes induced by UV light is regulated by Fas-dependent mechanisms.<sup>11</sup> Irradiation of human epidermal keratinocytes with UVB induces clustering of Fas on the cell surface in a ligand-independent manner and recruitment of FADD to the cytoplasmic domain of Fas. This is thought to trigger the same caspase-8-dependent proapoptotic signaling cascade that is also induced after binding of FasL to Fas and leads to the activation of caspase-3.<sup>11, 12</sup> Similar results have been described for murine epidermal keratinocytes.<sup>13, 14</sup> In line with this proposed mechanism, studies in mice with mutated FasL, suggested that upregulation of Fas and FasL expression after irradiation with high doses of UVB contribute to apoptosis of epidermal keratinocytes.<sup>15</sup> However, UVB-induced keratinocyte apoptosis has also been described to proceed through the internal, mitochondrial pathway. UV light is thought to damage the mitochondrial membrane thus leading to the activation of caspase-9, a critical step in the initiation of apoptosis via this pathway. Blocking caspase-9 as well as targeted deletion of Jun N-terminal kinase can inhibit UV-induced apoptosis,<sup>16, 17</sup> whereas blocking of caspase-8 did not prevent UV-dependent apoptosis in murine embryonic fibroblasts (MEFs).<sup>18, 19</sup> This suggested that caspase-8-mediated Fas signaling may not be essential for the proapoptotic response to UVB irradiation in MEFs.

Given partially contradictory results regarding functions of Fas in keratinocytes, we decided to use conditional gene targeting technology to further elucidate the role of Fas in the epidermis *in vivo*.

## Results

**Generation of epidermis-specific Fas knockout mice.** Mice with conditional ablation of Fas alleles have been described previously.<sup>20</sup> Female mice homozygous or heterozygous for the floxed (F1) Fas allele were bred to male mice homozygous or heterozygous for the F1 Fas allele and expressing Cre recombinase under the control of the keratin 14 promoter.<sup>21</sup> Samples of epidermis from ear and back skin as well as total tissue lysates from mouse tails for comparison were analyzed for the presence of wild-type and mutant Fas DNA (Supplementary Figure 1a) and of Fas protein using PCR and western blotting, respectively. Whereas epidermal samples from ear and back skin showed complete deletion of F1 Fas alleles, Fas was readily detected in total tissue lysates from tails (Figure 1a; Supplementary Figure 1b). This showed epidermis-specific deletion of Fas in mice with the genotype  $K14Cre^+ Fas^{fl/fl}$ , which will be referred to as  $Fas^{fl/KO}$  mice. Mice with the genotypes  $K14Cre^- Fas^{fl/fl}$ ,  $K14Cre^- Fas^{fl/+}$ ,  $K14Cre^+$



**Figure 1** Deletion of Fas in epidermal keratinocytes. Western blot (a, d) and FACS analyses (b) with antibodies against Fas (upper panels) and actin as loading control (lower panels). (a) Epidermis isolated from back skin as well as whole tissue of tail was used. (b, d) Primary epidermal keratinocytes isolated from newborn mice were analyzed for Fas expression by FACS analysis (b) and western blot (d). (c) Primary control and Fas KO keratinocytes were treated with 10 ng/ml (FN) for 48 h and then stimulated with 50 ng/ml of the agonistic Fas antibody Jo2 or left unstimulated. After 6 and 24 h, cultures were analyzed for TUNEL-positive cells. Bar graphs show percent increase in the number of TUNEL-positive cells after Jo2 stimulation in comparison to unstimulated cells. ct, control mice/keratinocytes; Thy, thymus extract as positive control; unal, unstimulated; sec AB, secondary antibody

$Fas^{fl/+}$  and  $K14Cre^- Fas^{fl/+}$  are referred to as control mice. Mice with the genotype  $K14Cre^+ Fas^{fl/+}$  were excluded from the analysis.

We also analyzed primary keratinocytes isolated from control and  $Fas^{fl/KO}$  mice. Western blot and FACS analyses showed expression of Fas by keratinocytes from control mice. This was not detectable in keratinocytes isolated from  $Fas^{fl/KO}$  mice (Figure 1b and d). In addition, we tested the response of interferon- $\gamma$ -treated control and Fas knockout (KO) keratinocytes to stimulation of Fas using the agonistic antibody Jo2.<sup>22</sup> Whereas control keratinocytes showed an increase in the percentage of apoptotic cells upon Jo2 stimulation, the number of apoptotic cells was not increased in the Fas KO keratinocyte population (Figure 1c).

$Fas^{fl/KO}$  mice did not show an overt phenotype (Supplementary Figure 2). Their skin was macroscopically and histologically indistinguishable from that of control mice. We also did not observe differences in the hair coat. Staining for

markers of proliferation and differentiation in the skin of Fas<sup>fl-KO</sup> mice and control mice did not show any differences (Supplementary Figure 3).

**Enhanced contact-dermatitis-induced keratinocyte apoptosis in Fas<sup>fl-KO</sup> mice.** Fas has been proposed to exert an important effect on the pathogenesis of contact dermatitis by mediating apoptosis of epidermal keratinocytes.<sup>2</sup> We induced a contact hypersensitivity (CH) reaction in the ears of 16 Fas<sup>fl-KO</sup> mice (9 females and 7 males) and 14 control mice (6 females and 8 males) by challenging them with 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) in acetone/olive oil (4:1), 6 days after sensitization. Ear swelling was determined at different time points after challenge as a marker for the strength of the inflammatory reaction. Ear thickness was determined on the day of sensitization and immediately before challenge. The average of these measurements formed the baseline value for the determination of ear swelling. Measurements of ear thickness were repeated 24, 48, 72 and 96 h after challenge. No significant differences were detected between Fas<sup>fl-KO</sup> mice and control mice at any time point (Figure 2a). Females showed stronger ear swelling than males through all time points. Both Fas<sup>fl-KO</sup> mice and control mice showed edema and an inflammatory infiltrate in the dermis with similar density and comparable numbers of inflammatory cells staining positive for CD3 (T lymphocytes) or CD11b (myeloid inflammatory cells) (Figure 2b). Similar numbers of F4/80-positive inflammatory cells (macrophages) were detected in the epidermis at sites of spongiosis both in control and Fas<sup>fl-KO</sup> mice.

Spongiosis was present in all skin samples of challenged Fas<sup>fl-KO</sup> mice, to a similar extent as in control mice (Figure 2b). We used immunostaining of activated caspase-3 and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining (Figure 3a) to visualize intraepidermal apoptotic cells in challenged ears of Fas<sup>fl-KO</sup> mice and control mice 96 h after challenge. Unexpectedly, the number of apoptotic cells in the epidermis was higher in both female and male Fas<sup>fl-KO</sup> mice as compared with controls. The differences between Fas<sup>fl-KO</sup> mice and control mice were significant (Figure 3b). We conclude that in the DNFB-induced CH reaction in mice (1) Fas expressed by epidermal keratinocytes is dispensable for the ear swelling reaction, the accumulation of an inflammatory infiltrate and spongiosis, and (2) the presence of Fas in the epidermis partially protects epidermal keratinocytes from apoptosis.

**Enhanced UVB-induced keratinocyte apoptosis in Fas<sup>fl-KO</sup> mice.** Fas has also been implicated in the apoptosis of keratinocytes following UVB irradiation. We therefore irradiated 15 Fas<sup>fl-KO</sup> mice and 15 age-matched control mice with a dose of 1 J/cm<sup>2</sup> UVB on their back after shaving. After 18 and 24 h, back skin from eight male Fas<sup>fl-KO</sup> mice and nine male control mice or seven female Fas<sup>fl-KO</sup> mice and four female controls was taken for analysis. Histological sections of paraffin-embedded skin were used for counting SBC and for TUNEL staining. Although there was no difference in the number of TUNEL-positive cells in the epidermis of control and Fas<sup>fl-KO</sup> mice,

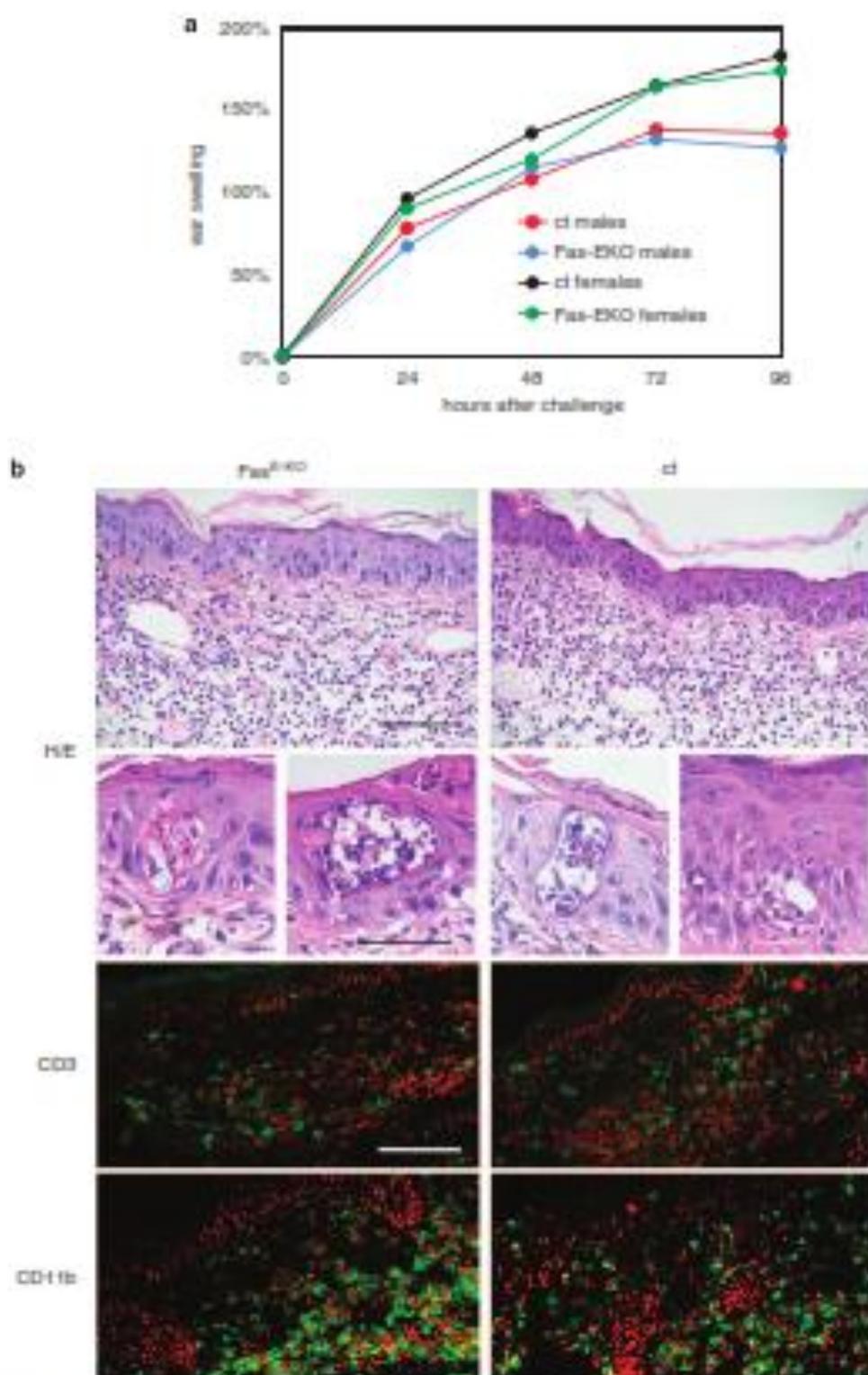
there were significantly more SBC present in the skin of Fas<sup>fl-KO</sup> mice (Figure 4b). Staining with an antibody against the macrophage marker F4/80 did not show positive cells within the epidermis. We conclude that expression of Fas by epidermal keratinocytes is not required for UVB-induced keratinocyte apoptosis *in vivo* and that the presence of Fas reduces the number of SBC upon UVB irradiation.

**No requirement for Fas in UVB-induced keratinocyte apoptosis *in vitro*.** *In vivo*, there is constant exchange of information between the epidermis and other skin compartments. To investigate whether deletion of Fas had an influence on cell autonomous mechanisms of keratinocyte apoptosis, we isolated keratinocytes from Fas-negative epidermis and control epidermis. Western blot and FACS analyses showed that keratinocytes isolated from Fas<sup>fl-KO</sup> mice (Fas<sup>fl-KO</sup> keratinocytes) did not express Fas protein (Figure 1b and d). Control and Fas<sup>fl-KO</sup> keratinocytes, three lines each, were then irradiated *in vitro* with 100 and 300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and analyzed by FACS using an antibody against Annexin V and by TUNEL staining. Results of both Annexin V and TUNEL staining showed similar numbers of apoptotic control and Fas<sup>fl-KO</sup> keratinocytes (Figure 5). We conclude that apoptosis of keratinocytes on UVB irradiation does not depend on the presence of Fas.

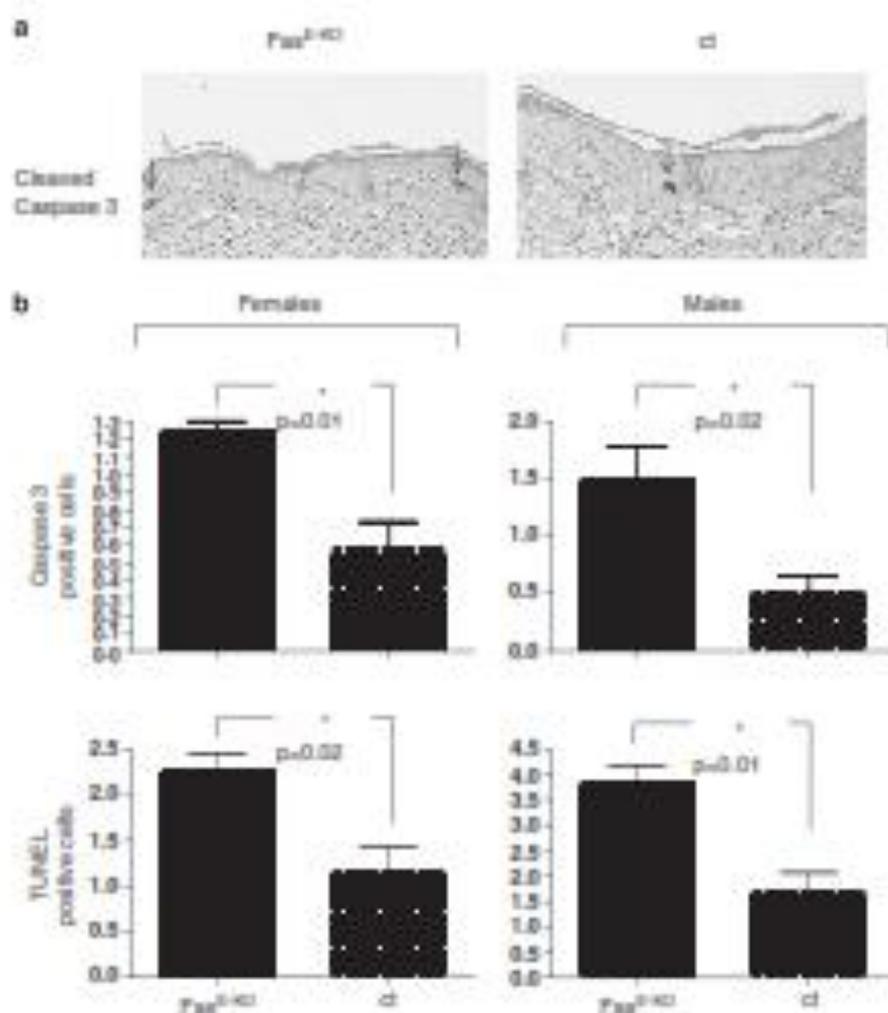
## Discussion

Epidermal keratinocytes constitutively express CD95<sup>2</sup> and Fas-induced keratinocyte death is currently thought to have a relevant role in the pathogenesis of a number of severe skin diseases, such as eczema and toxic epidermal necrolysis.<sup>4,23</sup> Although apoptosis of epidermal keratinocytes is considered as a hallmark of eczematous dermatitis,<sup>24</sup> the biological meaning of this is not well understood. The results from experimental models of contact dermatitis are inconclusive: the absence of Fas or FasL in mice has been reported to have no influence on the contact hypersensitivity response to DNFB.<sup>5</sup> In another study, however, oxazolone-induced contact dermatitis was found to be attenuated in Fas mutant (pr mice).<sup>25</sup> Because both studies were performed in animals with constitutive functional Fas or FasL deficiency, they were not able to specifically address contributions of epidermal keratinocytes to the tissue reaction. Our approach of an epidermis-specific deletion of Fas clearly shows that Fas expression by epidermal keratinocytes is dispensable for a normal contact hypersensitivity response, as ear swelling and inflammatory features were identical in control and Fas-deficient skin. The formation of spongiotic vesicles, which is seen as a characteristic sign of acute eczematous dermatitis and has been proposed to be induced by Fas-mediated keratinocyte killing,<sup>2</sup> occurred normally in the absence of epidermal Fas expression, showing that it is not Fas dependent. It is likely that, in the absence of Fas, keratinocyte killing is executed by perforin/granzyme-dependent mechanisms.<sup>6</sup>

In addition to its role in the induction of apoptosis, Fas has been suggested to elicit antiapoptotic and proinflammatory signals in the epidermis through the production of EOF receptor ligands, such as amphiregulin, TGF- $\alpha$  and numerous



**Figure 2** DNFB induced contact dermatitis in the absence of epidermal Fas expression. **(a)** 10 *Fas<sup>ESKO</sup>* mice (9 females and 7 males) and 14 control mice (8 females and 6 males) were challenged with DNFB 5 days after sensitization. Ear swelling was determined before (0 h) and 24, 48, 72 and 96 h after the challenge. Individual data points show the mean increase of ear swelling for each time point calculated from three consecutive measurements of ear thickness. **(b)** Micrographs and immunofluorescent images of ear skin of control and *Fas<sup>ESKO</sup>* mice 96 h after challenge with DNFB. The lower panel of pictures of H&E-stained sections shows spongiotic blister formation. The immunostainings show green fluorescence for CD3 and CD11b. Red staining shows nuclei. Scale bars in H&E staining: upper, 100  $\mu$ m; lower, 50  $\mu$ m. Scale bar in immunofluorescent staining = 100  $\mu$ m.

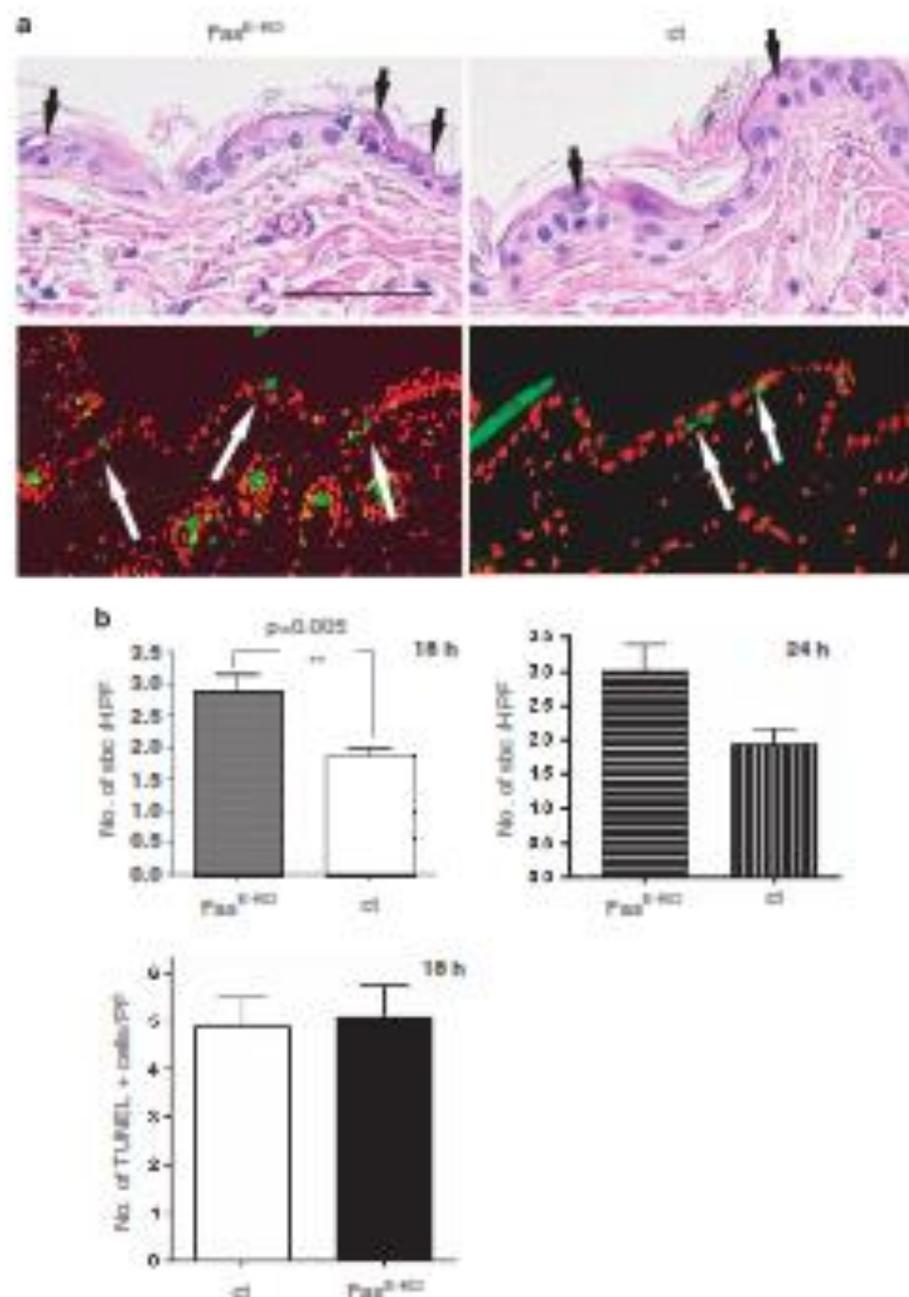


**Figure 3** Contact hypersensitivity induced keratinocyte apoptosis in Fas-negative epidermis. Apoptotic cells were detected 96 h after challenge by staining with an antibody against cleared caspase-3 and by TUNEL staining. (a) Microscopic images of skin sections of Fas<sup>-/-</sup> mice and control mice stained for active caspase-3. Arrows indicate apoptotic cells within the epidermis. (b) Bar graphs show mean numbers ± S.D. of caspase-3- or TUNEL-positive epidermal cells per power field in skin sections of male and female control and Fas<sup>-/-</sup> mice. A total of 150 power fields of caspase-3 and TUNEL-stained sections were counted. Asterisk (\*) indicates statistical significance of the difference. P-values are given below. (The color reproduction of the Figure is available on the html full text version of the paper.)

proinflammatory cytokines.<sup>7,8,26</sup> Recent work shows that the intracellular domain of Fas can be tyrosine phosphorylated, which can lead to the recruitment and activation of phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K).<sup>27</sup> These findings are based on *in vitro* studies of immortalized and primary human keratinocytes and other cell types; their relevance for the *in vivo* situation within the epidermis remained therefore unclear. Our unexpected study result showing that keratinocyte apoptosis on DNFB challenge is enhanced in Fas-negative epidermis shows an antiapoptotic function of Fas and it is possible that PI-3K signaling or BOP receptor ligands mediate this protective signal. This mechanism could indeed restrict extensive tissue damage in response to proapoptotic stimuli, thus contributing to the maintenance of an intact skin barrier.<sup>7</sup> Probably, this function of Fas is mediated in a non-cell autonomous justacrine way, as we did not detect the protective effect against apoptosis in cultures of Fas<sup>-/-</sup> keratinocytes. Although this is, in our view, the most likely mechanism explaining the accumulation of apoptotic cells in

the epidermis of Fas<sup>-/-</sup> mice, we cannot completely exclude the possibility that the deficiency of Fas in epidermal keratinocytes leads to an inhibition of their autophagocytic activity. This would result in a decreased elimination of apoptotic cells and thereby in their accumulation. Such a function for Fas has, however, so far not been reported. In contrast, the death effector domain containing cellular FLICE-like inhibitor protein c FLIP, which can be recruited to the DISC through the adapter protein FADD upon Fas ligation, has been shown to suppress autophagy.<sup>28</sup>

Stimulation of Fas in epidermal keratinocytes has also been reported to result in the production of proinflammatory cytokines that could facilitate the inflammatory response in eczematous dermatitis.<sup>8,26</sup> On the basis of these findings, a possible pathogenic role of Fas-induced cytokine production in eczema has been assumed.<sup>29</sup> We show here that epidermis-specific deficiency of Fas does not alter the contact hypersensitivity response to a DNFB challenge in mice. Although our study results do not exclude production of

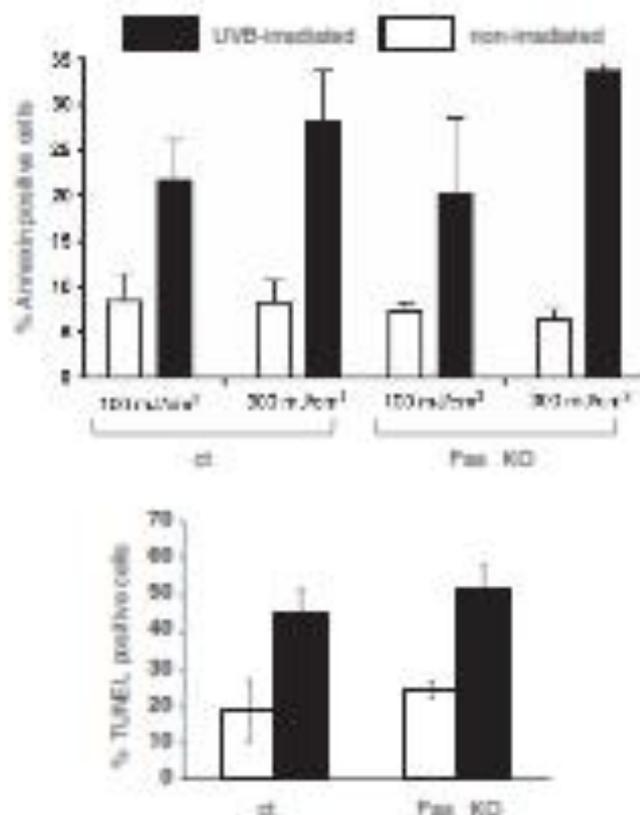


**Figure 4** Apoptosis of epidermal keratinocytes on UVB irradiation in Fas-negative epidermis. Detection of SBC and TUNEL-positive keratinocytes 18 and 24 h after UVB irradiation. (a) High-power images of skin sections of Fas<sup>0/0</sup> mice and control mice 18 h after UVB irradiation stained H&E (light microscopy) or with the TUNEL method (fluorescence microscopy). Black arrows indicate SBC, white arrows TUNEL-positive cells. (b) Bar graphs show mean numbers  $\pm$  S.D. of SBC per high-power field (upper panel) and TUNEL-positive epidermal cells per power field (lower panel) 18 and 24 h after UVB irradiation. To analyze numbers of SBC, we counted 170 and 110 power fields in the 18 and 24 h experiment, respectively. For TUNEL stainings, 120 (ctrl) and 252 (Fas<sup>0/0</sup>) power fields were counted. Asterisks (\*) indicate statistical significance. P-value is given above. Differences in SBC number were not significant after 24 h. SBC, sunburn cells; HPP, high-power field; PF, power field.

proinflammatory cytokines in the epidermis on Fas ligation, they show that the presence of Fas is not required for the pathogenesis of contact dermatitis *in vivo*.

Keratinocyte apoptosis on UV irradiation and subsequent elimination of apoptotic bodies from the skin are believed to be the mechanisms that protect the epidermis from cumulating DNA damage in sun-exposed skin. UV light is absorbed by nuclear, cytoplasmic or cell membrane-attached molecules

that serve as chromophores. Excitation of these chromophores can activate a number of signaling pathways leading to apoptosis. Fas has been shown to cluster on the surface of human epidermal keratinocytes upon UVB irradiation in a FasL-independent manner. This is followed by the recruitment of the adapter molecule FADD to the receptor complex, which then enables the recruitment of caspase-8. Both a dominant-negative FADD construct and inhibition of caspase-8 could



**Figure 5** UVB-induced apoptosis of Fas-negative keratinocytes *in vitro*. Primary murine keratinocytes in passages 2–4 isolated from control mice (ct) and Fas<sup>KO</sup> mice (Fas KO) were irradiated with 100 or 300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB, respectively. Upper part: FACS analysis of Annexin V exposure on the cell surface was carried out after 16 h. Bar graphs show the percentage of Annexin-V-positive keratinocytes in the population-isotype-negative population  $\pm$  S.D. Results are from three control and Fas KO primary isolates analyzed in at least two independent experiments. Lower part: Primary keratinocytes were irradiated with 300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB and labeled with the TUNEL technique 16 h later. Bar graphs show the percentage of TUNEL-positive keratinocytes in the total adherent cell population  $\pm$  S.D. in two independent experiments using keratinocytes from three control and three Fas<sup>KO</sup> mice.

reduce UVB-induced apoptosis, suggesting a causal role of the Fas- FADD-caspase-8 interaction in the induction of apoptosis.<sup>11–13,20</sup> This role of Fas was further supported by the finding that 500 mJ/cm<sup>2</sup> UVB irradiation of C3H/HeJ mice with mutated FasL (gld/gld mice) resulted in less apoptosis as compared with wild-type controls.<sup>10</sup> In contrast to these findings, we show here that in C57/Bl6 mice the Fas/FasL signaling system is not essentially involved in UVB-induced keratinocyte apoptosis. Both counting of SBC and TUNEL staining revealed that there is no decrease in the numbers of apoptotic keratinocytes in Fas-negative epidermis as compared to control epidermis. This is further supported by our *in vitro* analysis of UVB-irradiated Fas KO and control keratinocytes, which did not show differences in Annexin V and TUNEL staining. These results are consistent with data showing that deletion or blockade of caspase-8 does not prevent UVB-induced apoptosis of MEPs.<sup>18,19</sup> Furthermore, the increased number of SBC in the epidermis of Fas<sup>KO</sup> mice suggests that, *in vivo*, Fas exerts antiapoptotic effects. TUNEL staining did not show a difference in the numbers of apoptotic keratinocytes between Fas<sup>KO</sup> and control mice.

This is most likely due to the relatively late time point of 16 h after irradiation, which was chosen primarily for the detection of SBC.

The difference between our study results and that from other models of UVB-induced keratinocyte apoptosis may be explained by variations in the UV response between mouse strains. Another explanation could be a gradual involvement of different proapoptotic mechanisms depending on the UVB dose, as Hill et al.<sup>14</sup> used 500 mJ/cm<sup>2</sup> whereas we used 300 mJ/cm<sup>2</sup>. A third hypothetical explanation is offered by the fact that gld/gld mice are not deficient for FasL, but carry a point mutation within the protein that disables proapoptotic Fas signaling.<sup>21</sup> As a consequence, mutant FasL mRNA is constitutively and strongly expressed in lymphoid cells of gld/gld mice.<sup>22</sup> It is therefore conceivable that mutant FasL in these mice, although not able to stimulate proapoptotic Fas signaling, can still bind to CD95 expressed on the surface of epidermal keratinocytes and activate its antiapoptotic signaling mechanisms. This would then lead to the stimulation of survival signals in keratinocytes and thus result in decreased apoptosis. The ability of Fas to stimulate pathways involved in cell survival has been demonstrated recently.<sup>23</sup> In addition, signaling through c-FLIP, which is known to exert strong antiapoptotic effects by binding to the adapter protein FADD and competing for the recruitment of caspase-8, could be a mechanism mediating antiapoptotic activities of Fas.<sup>24</sup>

In summary, we here provide genetic evidence showing conclusively that, in murine skin, Fas is an essential element of pathways that restrict keratinocyte apoptosis in eczematous dermatitis and on UVB irradiation. Neither contact allergen- nor UVB-induced keratinocyte apoptosis depend on the expression of Fas by epidermal keratinocytes *in vivo*. Moreover, both the inflammatory tissue reaction and spongiosis in acute eczematous dermatitis can proceed in the absence of epidermal Fas expression. The exact mechanisms of antiapoptotic Fas signaling remain unclear here; both Fas-mediated autocrine stimulation of EGF-receptor-dependent signals<sup>7</sup> and activation of PI-3K<sup>25</sup> could be relevant in this context. Both in contact dermatitis and on UVB irradiation the protective effects of Fas apparently outweigh Fas-induced keratinocyte death. It therefore seems possible that, for the maintenance of tissue integrity within the epidermis, antiapoptotic functions of Fas are at least as important as its proapoptotic functions.

#### Materials and Methods

**Generation of mice with epidermis-specific Fas deficiency and UV irradiation.** Mice with conditionally targeted Fas alleles have been described previously.<sup>20</sup> These mice were crossed with mice expressing Cre recombinase under the control of the keratin 14 promoter.<sup>27</sup> Deletion of Fas alleles and presence of the Cre recombinase transgene were analyzed by PCR as described therein. For UVB treatment mice were anesthetized, shaved on their backs and irradiated with a dose of 300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB using a Waldmann UV 801 lamp (Waldmann, Villingen-Schwenningen, Germany) equipped with UVB1 bulbs emitting UV light in the range of 280–380 nm with an emission maximum at about 314 nm. The UV dose was determined using a Vinten UV radiometer (Waldmann). Mice were killed after 16 or 24 h and skin was taken for analysis.

**Western blot analysis of epidermis and cultured keratinocytes.** Epidermis was separated from dermis with forceps after 30 min of incubation in 3.0% ammonium thiocyanate dissolved in lysis buffer

(pH 7.5) at 4 °C. Epidermis samples were minced and homogenized for 2 min on ice using an MM300 ultrasound tissue homogenizer (Retsch GmbH, Haan, Germany), extracted for 1 h in modified RIPA buffer containing 5 mM EDTA, 1% Triton 100 ×, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate, 20 μM leupeptin, 1 mM PMSF, 0.5 mg/ml soybean trypsin inhibitor, 0.5 mM NaVO<sub>3</sub> and 10 mg/ml p-nitrophenylphosphate, and centrifuged at 14000 × g for 10 min at 4 °C. The supernatant was used for protein analysis. Keratinocytes were lysed *in situ* using the same buffer, scraped from the dishes and sonicated for 30 s at full power. Lysates were centrifuged at 14000 × g for 10 min and the supernatant was used for western blot analysis. Protein (30 μg) was separated by SDS-PAGE and blotted onto nitrocellulose LC 2000 membranes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After blocking with 5% milk powder solution the membrane was probed with the following antibodies: rabbit polyclonal anti-Fas M-20 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and mouse monoclonal anti-actin antibody (MP Biomedicals, Aurora, OH, USA). Immunoreactive proteins were visualized with HRP-coupled secondary antibodies on Hyperfilm by chemiluminescence (Western Lightning; PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Protein quantification was carried out using the Pierce protein quantification kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

**Induction of contact dermatitis.** Mice were anesthetized on day 0 and the thickness of the left ear was measured twice. Mice were shaved on the abdomen and 25 μl of a 0.5% DNFB solution in acetone/olive oil (1:1) was applied and allowed to dry. After 8 days, the mice were again anesthetized and the thickness of the left ear was determined twice. The mean of thickness measurements on days 0 and 8 formed the 0 value for the stimulation experiment. A 0.2% DNFB solution (10 μl) was applied to the front and back sides of the left ear. On days 7–10 after sensitization, mice were anesthetized and the thickness of the left ear was determined twice. The relative increase in ear thickness was calculated for each time point.

**Histopathological analysis and immunostaining.** After excision, tissue samples were fixed in 4% paraformaldehyde or embedded in OCT compound and frozen immediately. Further processing, paraffin embedding of paraformaldehyde-fixed tissue and hematoxylin and eosin (H&E) staining was carried out according to standard histopathological procedures. Immunostaining of keratin 14, keratin 10 and Irf1 was performed as described in Strata et al.<sup>23</sup> For immunostaining against activated caspase-3 on paraffin-embedded tissue, a rabbit antibody against cleaved caspase-3 (Cell Signaling Technology Inc., Denver, CO, USA) at a dilution of 1:50 was used according to the manufacturer's instructions.

**TUNEL staining.** TUNEL staining of tissue sections and cells was carried out with the Dead End Fluorescent TUNEL System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

**Isolation and culture of epidermal keratinocytes, UV irradiation and Fas stimulation.** Epidermal keratinocytes were isolated from transgenic and wild-type newborn mice as described in Tschammler et al.<sup>24</sup> For UVB irradiation, keratinocytes were grown to subconfluency without feeder cells, washed with PBS and then irradiated with 100 or 300 mJ/cm<sup>2</sup> UVB using a Bio Sun-1 System at 312 nm (Vibor Lourmat, Marne-la-Vallée, France). After 16 h of culture keratinocytes were trypsinized and analyzed by FACS or TUNEL staining. For stimulation of Fas, primary epidermal keratinocytes were incubated with 10 ng/ml IFN-γ (kindly provided by Jonathan Howard, University of Cologne) to increase Fas expression. After 48 h cells were stimulated with 50 ng/ml Jo2 antibody (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA, catalog no. 354256) or left unstimulated. After 8 or 20 h keratinocytes were fixed and numbers of TUNEL-positive cells were determined.

**FACS analysis.** Keratinocytes were trypsinized and resuspended in HEPES incubation buffer. Staining of Annexin V was performed using the Annexin V PLUS Staining Kit (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). Analysis was performed with a FACSCalibur (Becton Dickinson).

**Statistics.** Determination of significance between samples was performed using the Student's *t*-test (GraphPad Prism software, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). For all statistical tests, the 0.05 level of the confidence interval was accepted as statistically significant.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** This work was supported by a grant from the Medical Faculty, University of Cologne for AH (Koslin-Fortuna program), by the Center for Molecular Medicine, University of Cologne and by Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB-529). We are grateful to Jonathan Howard, University of Cologne, for providing interferon-γ and to Gian Paolo Marcuzzi for supporting mouse work.

- Peter ME, Kramer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2002; **10**: 26–35.
- Owen AM, Willingham MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem* 2002; **50**: 445–454.
- Matsu H, Kobayashi H, Hosokawa T, Akita T, Ohkawara A. Keratinocytes constitutively express the Fas antigen that mediates apoptosis in IFN gamma-treated cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1995; **287**: 315–320.
- Tschammler A, Akita M, Eisenmann O, Altmeppen P, Simon HU, Dravus T et al. T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenic role in eczematous dermatitis. *J Clin Invest* 2000; **105**: 25–35.
- Kelton J, Desjardins C, Kravets M, Duchesneau MT, Assouzi O, Yoness F et al. Cytotoxicity is mandatory for CD95(+)-T cell-mediated contact hypersensitivity. *J Exp Med* 1999; **190**: 779–785.
- Kagi D, Vignaux P, Ledermann B, Bürki K, Depraetere V, Nagata S et al. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1989; **245**: 525–530.
- Iordanov MS, Sridharan AJ, Simpson EL, Hartle JM, Ryabinina OP, Choi RJ et al. Cell death-induced activation of epidermal growth factor receptor in keratinocytes: implications for restricting epidermal damage in dermatitis. *J Invest Dermatol* 2002; **120**: 134–142.
- Farley SM, Purdy DE, Ryabinina OP, Schneider P, Magun BE, Iordanov MS. Fas ligand-induced proinflammatory transcriptional responses in reconstructed human epidermis: Recruitment of the epidermal growth factor receptor and activation of MAP kinases. *J Biol Chem* 2002; **277**: 619–628.
- Ziegler A, Jonason AS, Leffel GJ, Simon JA, Sharma HW, Kimmelman J et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994; **372**: 773–776.
- Schwarz A, Ständer S, Bernburg M, Blum M, Kuhn D, van Steeg H et al. Interleukin-12 suppresses ultraviolet radiation-induced apoptosis by inducing DNA repair. *Nat Cell Biol* 2002; **4**: 20–21.
- Kuhn D, Pöppelmann B, Yarovoi O, Lager TA, Krumm J, Schwarz T. Nuclear and cell membrane effects contribute independently to the induction of apoptosis in human cells exposed to UVB radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 7074–7079.
- Arangas V, Kuhn D, Motta O, Wilkes O, Pöppelmann B, Lager TA et al. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 1998; **140**: 171–182.
- Takahashi H, Ichida-Yamamoto A, Isaka H. Ultraviolet B irradiation induces apoptosis of keratinocytes by direct activation of Fas antigen. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2001; **6**: 84–88.
- Takahashi H, Nakamura S, Amano K, Kinouchi M, Ichida-Yamamoto A, Isaka H. Fas antigen modulates ultraviolet B-induced apoptosis of SV40 cells: sequential activation of caspases 8, 3, and 1 in the apoptotic process. *Exp Cell Res* 1999; **249**: 291–298.
- Hill JL, Ouhri A, Loughlin SM, Kopke RL, Arentz-Hansen HN, Dean-Schubert LB. Fas ligand: a sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science* 1999; **285**: 898–900.
- Stello LA, Thibodeau SS, Derringer MP. Activation of caspase-9 is required for UV-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* 2002; **277**: 15246–15252.
- Toumieux C, Heas P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimmual A et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 2000; **288**: 870–874.
- Nak E, Michalak EM, Wluriger A, Adams JM, Sliemers A. Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the DR5-only protein Fas. *J Cell Biol* 2007; **178**: 415–424.
- Verhulst-van Vliet EE, Schudman M, Lutz V, Chantrelukhal N, Beckmann JS, Mel L et al. Targeted disruption of the mouse caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR5 and is lethal perinatally. *Immunity* 1998; **9**: 267–275.
- Hao Z, Hempel B, Faght H, Rajewsky K. T cell-specific ablation of Fas leads to Fas ligand-mediated lymphocyte depletion and inflammatory pulmonary illness. *J Exp Med* 2004; **198**: 1325–1335.
- Haber M, Wenk J, Nenci A, Pappasaki M, Schaffhake-Kochanski K, Smyth N et al. Keratin 14 Cre transgenic mice subvert keratin 14 as an oncogene-expressed protein. *Oncogene* 2004; **23**: 175–181.
- Opasanos J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Malacouros A, Kasugai T, Kitamura Y et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* 1992; **359**: 806–809.

23. Boehm AT, Lee J, Nagata SM, Chavira CE, Seresht M, Siemsen-Johnson syndrome and toxic epidermal necrolysis. *Autoimmun Rev* 2008; **7**: 895-898.
24. Schwarz T. No eczema without keratinocyte death. *J Clin Invest* 2008; **118**: 9-10.
25. Xu B, Buffone-Paul S, Kojima K, Yu S, Huang P, Morimoto K et al. Role of Fas/Fas ligand-mediated apoptosis in murine contact hypersensitivity. *Int Immunopharmacol* 2002; **3**: 627-638.
26. Parley SM, DeLeon AD, Purdy CE, Sundholm AJ, Schneider P, Magun BE et al. Fas ligand elicits a caspase-independent proinflammatory response in human keratinocytes: implications for dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 2438-2451.
27. Sanchez-Bartra I, Martin-Villalba A. Tyrosine phosphorylation and CD95: a Fas-binding switch. *Cell Cycle* 2009; **8**: 838-842.
28. Lee JS, Li Q, Lee JY, Lee SH, Jeong JH, Lee YH et al. FLP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 1325-1332.
29. Lovelace M, Trautman A. CD95-mediated signals in the skin: going out with an inflammatory bang? *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 2264-2266.
30. Reberak A, Hamilton CA, Chinnayyan AM, Dall VM. Ultraviolet radiation-induced apoptosis is mediated by activation of CD-95 (Fas/PO-1). *J Biol Chem* 1997; **272**: 25783-25786.
31. Takahashi T, Tanaka M, Brennan C, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T et al. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* 1994; **76**: 903-916.
32. Watanabe D, Suda T, Hashimoto H, Nagata S. Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. *EMBO J* 1995; **14**: 13-15.
33. Kaber S, Sanchez-Bartra I, Winkler B, Basel A, Gellera C, He D et al. Tsc and PI3K bind CD95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* 2008; **13**: 235-248.
34. Dagnol M, Carver S, Muzzarelli D. Cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) signaling: a key regulator of receptor-mediated apoptosis in physiologic context and in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; **42**: 213-213.
35. Shinkai A, Pasparakis M, Meeker D, Knapp R, Pohl R, Metzger D et al. Localized inflammatory skin disease following inducible ablation of I kappa B kinase 2 in murine epidermis. *J Invest Dermatol* 2008; **128**: 614-620.
36. Tachamke R, Pohl R, Chrostki-Grahoff A, Smyth N, Nasser C, Nemann C et al. Impaired epidermal wound healing in vivo upon inhibition or deletion of Rac1. *J Cell Sci* 2007; **120** (Part 8): 1480-1490.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

# **Alina Hedrych-Ozimina, geborene Hedrych**

## Angaben zur Person

Geburtsdatum und -ort: 23. September 1980, Gdańsk (Danzig, Polen)  
Adresse: Jantarowa 15/2, 84-230 Rumia, Polen  
E-Mail: ahedrych@tlen.pl  
Telefon: +48 505 319 599

## Ausbildung

1995 – 1999 Allgemeinlyzeum Nr. 6, Gdynia (Gdingen, Polen), Abitur  
1999 - 2005 Studium der Humanmedizin  
an der Medizinischen Universität zu Danzig,  
Abschluss mit dem Arzttitel und der Gesamtnote sehr gut  
Sept. 2002 – Juli 2003 4. Studienjahr - an der Universität zu Köln,  
Sokrates/Erasmus Austauschprogramm  
ab April 2005 Dissertation in der Hautklinik der Universität zu Köln,  
Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Thomas Krieg  
Priv. Doz. Dr. med. Dr. phil. Ingo Haase

## Famulaturen in Deutschland

März 2003 Chirurgie, MediaPark Klinik, Köln  
Juli 2003 Innere Medizin, Universität zu Köln  
Juli 2004 Frauenheilkunde, Chirurgie - Universität zu Jena

## berufliche Erfahrung

Januar 2003 – April 2003 OP-Hilfe in der MediaPark Klinik in Köln  
April 2005 – Juni 2006 Gastwissenschaftlerin im Labor der Hautklinik  
der Universität zu Köln  
Oktober 2006 – Februar 2009 Arzt im Praktikum in Szpital Morski im. PCK in Gdynia  
ab Juli 2009 Facharztausbildung in Klinik der Plastischen Chirurgie  
der Medizinischen Universität zu Danzig