

# **GM-CSF**

*(Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor):*

## **Modulation der durch UV-B- Strahlung induzierten Hautkarzinogenese**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Kerstin Niekisch  
geb. in Worms

Mainz 2007

## **Publikationsliste**

**Mann, A., Niekisch, K., Schirmacher, P. und Blessing M. (2006).**

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is essential for normal wound healing.  
*J Investig Dermatol Symp Proc* **11**, 87-92.

**Mann, A., Niekisch, K., Schirmacher, P. und Blessing M. (2006).**

Towards better wound healing with granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor  
5<sup>th</sup> Leipzig Research Festival for Life Sciences; *Abstract book ISBN 3-9810760-1-X*.

**Mann, A., Niekisch, K. und Blessing, M. (2005).**

Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor accelerates  
wound healing in a transgenic mouse model.  
4<sup>th</sup> Biotechnology Symposium of the University of Leipzig; *Poster*

**Mann, A., Niekisch, K., Schirmacher, P. und Blessing, M. (2005).**

Impaired wound healing in a transgenic mouse model overexpressing a GM-CSF  
antagonist in the epidermis.  
4<sup>th</sup> Leipzig Research Festival for Life Sciences; *Abstract book ISBN 3-9810760-0-1*.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 UV-Strahlung	1
1.2 Haut	2
1.2.1 UV-B-induzierte DNA-Schäden in den Keratinozyten	3
1.2.1.1 Tumorsuppressorgen <i>p53</i>	4
1.2.1.2 UV-B-induzierte Apoptose	6
1.2.2 Wirkung der UV-B-Strahlung auf das Immunsystem der Haut	7
1.3 Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)	10
1.3.1 Einfluss von GM-CSF auf Zellen des hämatopoetischen Systems	11
1.3.2 Wirkung von GM-CSF auf nicht-hämatopoetische Zellen	12
1.3.3 GM-CSF und Krebs	12
1.3.3.1 Die Rolle von GM-CSF in der chemisch induzierten Hautkarzinogenese	14
1.4 Ziel der Arbeit	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1 Material	17
2.1.1 Versuchstiere	17
2.1.2 Chemikalien und Enzyme	17
2.1.3 Wasser	17
2.1.4 Histochemische Reagenzien	17
2.1.5 Material für die histochemischen Methoden	18
2.1.6 Material für die immunchemischen Methoden	18
2.1.7 Geräte	18
2.1.8 Kits	20
2.1.9 Oligonukleotide	20
2.1.10 Benutzte Puffer und Medien	26
2.2 Methoden	28
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	28
2.2.1.1 DNA-Präparation	28
2.2.1.2 Plasmidisolierung/alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979)	28
2.2.1.3 DNA-Restriktion und DNA-Gelelektrophorese	28
2.2.1.4 Klonierung der DNA-Fragmente	29

---

2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR), (Saiki <i>et al.</i> , 1985)	29
2.2.1.6 Ethanol-Fällung	30
2.2.1.7 Isolierung von RNA aus Geweben	30
2.2.1.8 Reverse Transkription	31
2.2.1.9 Fluoreszenzmarkierung von cDNA	31
2.2.1.10 Fluoreszenzgelelektrophorese von cDNA	32
2.2.1.11 cDNA- <i>Microarray</i>	32
2.2.1.12 Hybridisierung auf den <i>Microarray</i>	33
2.2.1.13 Fluoreszenz-Detektion	33
2.2.1.14 Lightcycler <i>Real-Time</i> -PCR	34
2.2.2 Histologische Methoden	35
2.2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	35
2.2.2.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG)	35
2.2.2.3 Naphtol AS-D Chlorazetatesterase-Färbung	35
2.2.3 Immunhistochemische Methoden	36
2.2.3.1 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	36
2.2.3.2 BrdU-Markierung proliferierender Zellen	37
2.2.4 UV-B-Karzinogenese Experimente	37
2.2.4.1 Akute UV-B-Karzinogenese	37
2.2.4.2 Chronische UV-B-Karzinogenese	38
2.2.5 Bioinformatische Methoden	39
2.2.5.1 Auswertung der <i>Microarray</i> -Daten	39
2.2.5.2 Auswertung der <i>Lightcycler</i> -Daten	39
2.2.5.3 Statistik	39
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1 Chronische UV-B-Karzinogenese	40
3.1.1 Inzidenz der benignen Läsionen	41
3.1.2 Karzinominzidenz	42
3.1.3 Konversionsraten der beiden transgenen Linien	44
3.1.4 Klassifizierung der Plattenepithelkarzinome	45
3.2 Akute UV-B-Karzinogenese	47
3.2.1 Histopathologie der Haut	48
3.2.1.1 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung	48

3.2.1.2 Proliferierende Zellen in der Epidermis	50
3.2.1.3 Infiltration von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten in die Dermis	52
3.2.2 Charakterisierung der beiden GM-CSF-transgenen Mausmodelle mittels <i>low-density-cDNA-Microarray</i>	57
3.2.3 Verifizierung mit der <i>Real-Time-PCR</i> (RT-PCR)	59
3.2.4 Zytokine in der Haut	60
3.2.4.1 Konzentration von GM-CSF bzw. dem GM-CSF-Antagonisten in der Haut nach UV-B-Bestrahlung	60
3.2.4.2 Konzentration von IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-4 und IL-6 in der Haut nach UV-B-Bestrahlung	62
3.2.4.3 Konzentration von IL-12p40 und IFN- $\gamma$ in der Haut nach UV-B-Bestrahlung	68
<b>4. Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1 Bedeutung von GM-CSF in der UV-B-induzierten Tumorentwicklung	71
4.2 Effekt von GM-CSF auf die Proliferation, Apoptose und die Differenzierung der Keratinozyten nach UV-B-Bestrahlung	72
4.3 Einfluss von GM-CSF auf die Hautstruktur und die Infiltration von Zellen nach UV-B-Bestrahlung	74
4.4 Modulation des Zytokinprofils durch GM-CSF nach UV-B-Bestrahlung	77
4.4.1 Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der UV-B-induzierten Hautkarzinogenese	79
4.4.2 Identifizierung von Zielgenen von GM-CSF in der unbestrahlten Haut	80
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>83</b>
<b>A. Literaturverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>B. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>114</b>
<b>C. Darstellungsverzeichnis</b>	<b>119</b>
C. I Abbildungen	119
C. II Tabellen	121
<b>D. Anhang</b>	<b>122</b>

## 1. Einleitung

Jedes Jahr erkranken etwa 2 bis 3 Millionen Menschen weltweit an einem Hautkarzinom, wie etwa dem Basaliom oder dem Plattenepithelkarzinom (WHO, Jahresbericht 2004). Hauptursache für die Entstehung dieser Hautkarzinome ist die ultraviolette (UV-)B-Strahlung (Fears *et al.*, 1977), die infolge der Zerstörung der Ozonschicht weltweit anwächst. Die UV-B-Strahlung liegt mit einer Wellenlänge von 280 bis 315 nm zwischen dem kurzwelligeren UV-C (100 bis 280 nm) und dem langwelligeren UV-A (315 bis 380 nm) und ist Teil des elektromagnetischen Spektrums.

### 1.1 UV-Strahlung

UV-C wird von dem Sauerstoff der oberen Stratosphäre oder der Mesosphäre sowie durch die Ozonschicht fast völlig absorbiert. Dabei spaltet die UV-C-Strahlung das Sauerstoffmolekül  $O_2$  in atomaren Sauerstoff, der sich mit einem weiteren Sauerstoffmolekül zu  $O_3$  (Ozon) verbindet und so für die Aufrechterhaltung der Ozonschicht sorgt.

UV-A ist die vorherrschende Komponente der solaren UV-Strahlung (90 bis 99 Prozent), da es durch das stratosphärische und troposphärische Ozon nur sehr wenig geschwächt wird. Es durchdringt sowohl die Epidermis als auch die Dermis (Abb. 1.1) und wird aufgrund seiner längeren Wellenlänge kaum von den Biomolekülen absorbiert. Allerdings scheint es trotzdem an der Hautkarzinogenese beteiligt zu sein bzw. diese sogar initiieren zu können (Sternberg und van der Leun, 1990; Kelfkens *et al.*, 1991; Stary *et al.*, 1997; de Laat *et al.*, 1997; de Gruijl, 2002). Es wird angenommen, dass UV-A vor allem durch die Bildung von freien Radikalen schädigend wirkt (Tyrrell, 1995; 2000). Außerdem verursacht es in den Endothelzellen Nekrose, was zu einer Verletzung der dermalen Blutgefäße führt (Willis und Cylus, 1977; Rosario *et al.*, 1979).

Obwohl UV-B in der Ozonschicht um zirka 95 Prozent geschwächt wird, sodass nur ein geringer Anteil die Erdoberfläche erreicht, gilt es als Hauptursache für das Entstehen von aktinischer Keratose, Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen (Ziegler *et al.*, 1993). Veränderungen in der Haut können bereits nach einmaliger UV-B-Exposition festgestellt werden. Dazu gehören Erytheme (Cox *et al.*, 1992; Kripke, 1994), vaskuläre Hyperpermeabilität, Dilatation der dermalen Blutgefäße und epidermale Hyperplasie (Pearse *et al.*, 1987; Berton *et al.*, 1997). UV-B-Bestrahlung über einen längeren Zeitraum wirkt

karzinogen (Kripke, 1994). UV-B-induzierte Hautkarzinogenese ist ein komplexer Prozess, bei dem vor allem die mutagenen und immunsuppressiven Wirkungen der UV-B-Strahlung von Bedeutung sind (Soehnge *et al.*, 1997; Ouhtit und Ananthaswamy, 2001).

## 1.2 Haut

Die Haut (*Derma, Cutis*) stellt mit fast 16 Prozent des Körpergewichts das größte Organ des menschlichen Körpers dar. Sie ist bei allen Säugetieren die Abgrenzung zur Außenwelt und dient dem Schutz vor physikalischen und chemischen Einwirkungen sowie einer aktiven wie auch passiven Abwehr von Krankheitserregern.

Die Haut bedeckt die Oberfläche des Körpers und besteht aus zwei Hauptkompartimenten: dem Oberflächenepithel (*Epidermis*) und der darunter liegenden Bindegewebsschicht (*Corium, Dermis*). Unter der *Dermis* befindet sich eine gefäßreiche, lockere Bindegewebsschicht, die *Hypodermis*, die an vielen Stellen in subkutanes Fettgewebe umgewandelt ist. Die *Hypodermis* gehört entwicklungsgeschichtlich nicht zur Haut, verbindet diese aber locker mit dem darunter liegenden Gewebe (Abb. 1.1).

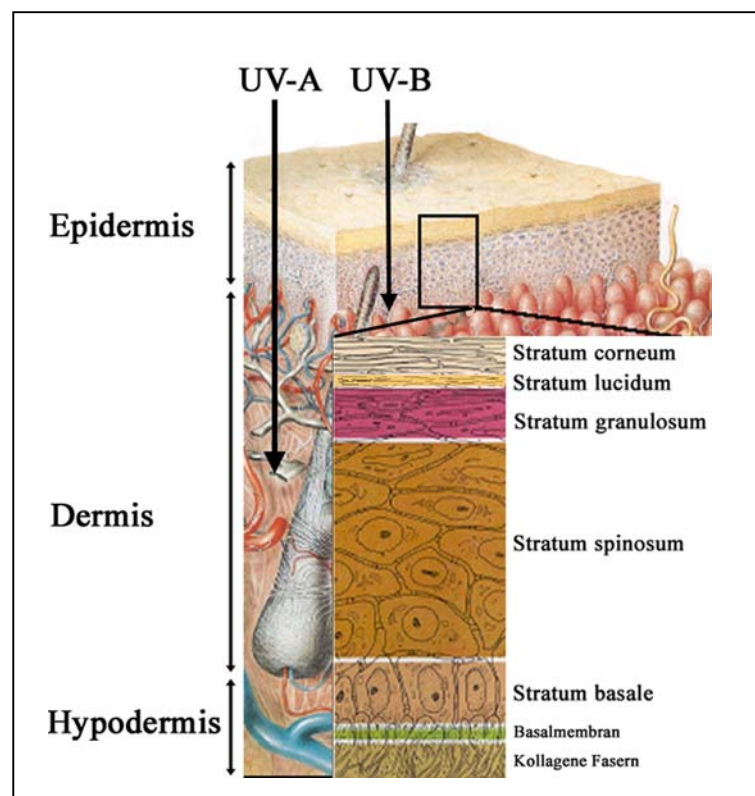


Abb. 1.1: Aufbau der Haut und der Epidermis. Penetrationstiefe der UV-A- und UV-B-Strahlen (modifiziert nach Schäfer-Korting, 2004).

Bei der *Epidermis* handelt es sich um ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, dessen Hauptzellpopulation (90 Prozent) Keratinozyten darstellen. In Abschnitten perpendicular zur Oberfläche können fünf Schichten unterschieden werden. Die tiefste Schicht wird *Stratum germinativum* oder *Stratum basale* genannt. Ihre Zellen stehen in direktem Kontakt zur Dermis. Darüber liegt das *Stratum spinosum*, dann das *Stratum granulosum*, gefolgt von dem *Stratum lucidum* und dem *Stratum corneum* (Abb. 1.1).

Die keratinisierten Oberflächenzellen blättern kontinuierlich ab und werden durch neue Zellen ersetzt, welche durch mitotische Aktivität in der Basalschicht der Epidermis entstehen. Die dort produzierten Zellen wandern sukzessive zu den oberen Schichten, indem unter ihnen neue Zellen produziert werden (Regnier *et al.*, 1986; Miller *et al.*, 1993). Für den Grad der epithelialen Differenzierung sind Zytokeratine biochemische Marker, die als Heterodimere exprimiert werden (Fuchs und Green, 1980; Moll *et al.*, 1982; Roop, 1987). Die Zytokeratine 5 und 14 (K5/K14) werden in der Basalschicht der interfollikulären Epidermis und der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel gebildet, die Zytokeratine 1 und 10 (K1/K10) dagegen in den suprabasalen interfollikulären Regionen. Die Zytokeratine 6 und 16 (K6/K16) werden nach Stresssituationen in der Epidermis und den Haarfollikeln exprimiert, z.B. nach Verwundungen (Martin, 1997; Fuchs und Cleveland, 1998). Neben den Keratinozyten kommen noch Mastzellen, Melanozyten, Langerhans-Zellen (LC) und neuroendokrine Merkelzellen in der Epidermis vor. Aufgrund der hohen Anzahl von Immunzellen in der Haut, die nach Aktivierung eine Vielzahl von Zytokinen exprimieren können, dient vor allem die Epidermis als Induktionsorgan der Immunantwort (Luger und Schwarz, 1990).

### 1.2.1 UV-B-induzierte DNA-Schäden in den Keratinozyten

Die heterozyklischen Basen der DNA absorbieren das UV-B-Licht (Ely und Ross, 1949). Dies kann mutagene Photoprodukte oder Läsionen in der DNA zwischen benachbarten Pyrimidinen in Form von Dimeren induzieren (Ananthaswamy, 1997), die zu C→T- und CC→TT- Transitionen führen. Man unterscheidet hauptsächlich zwei Dimerformen:

(1) Zyklobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) zwischen benachbarten Thyminen (T) oder Zytosinen (C) und (2) Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon-Photoprodukte zwischen benachbarten Pyrimidinen (Lippke *et al.*, 1981; Mitchell *et al.*, 1992). Zyklobutan-Pyrimidin-Dimere

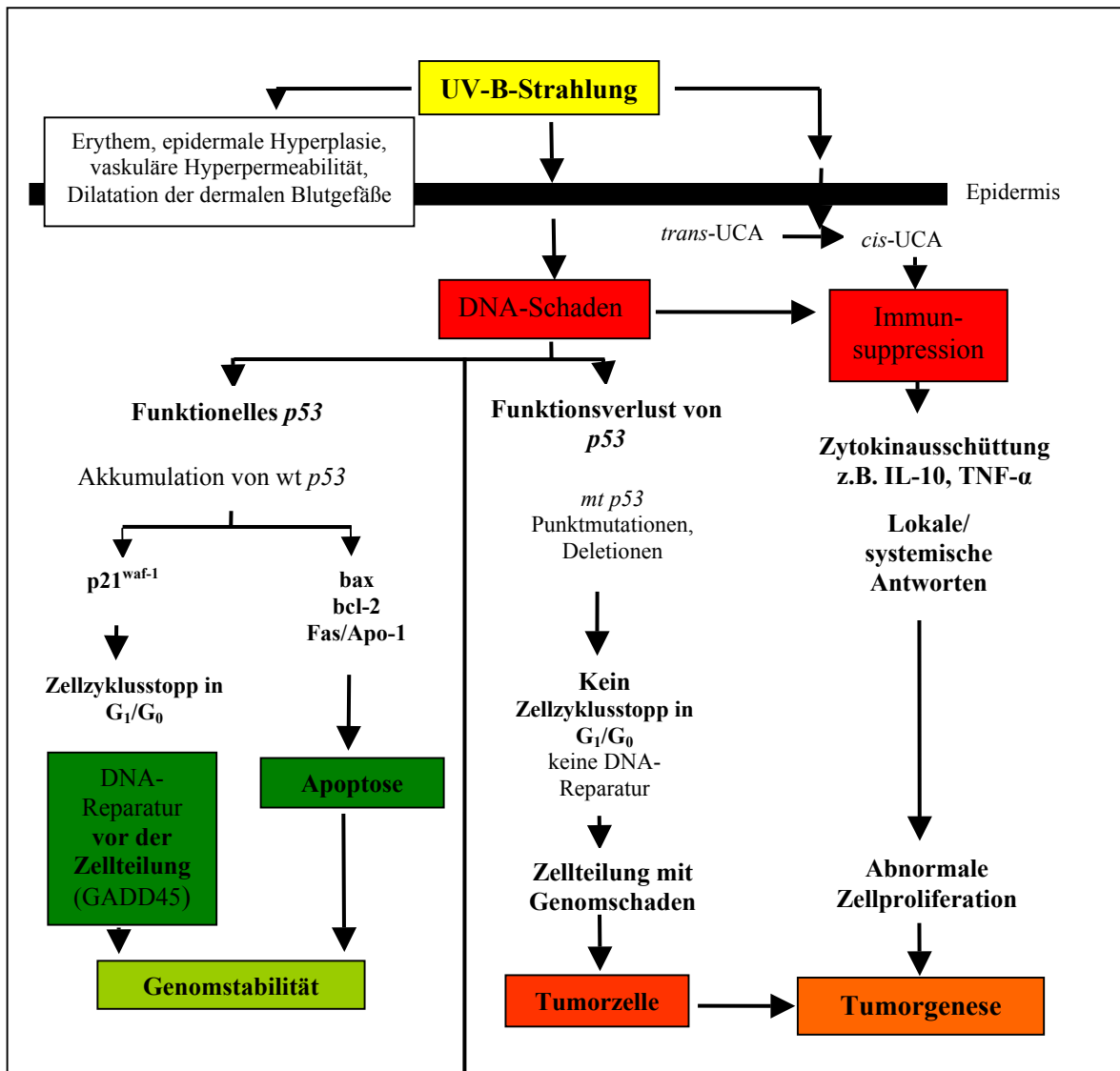


entstehen etwa dreimal so oft wie (6-4)-Photoprodukte (Tornaletti und Pfeiffer, 1996). Fast die Hälfte der auftretenden Pyrimidin-Dimere sind Thymin-Thymin-Dimere (Vink *et al.*, 1993). Beide Läsionen entstehen am häufigsten an Tandem-Pyrimidin-Stellen, die auch *hot spots* von UV-induzierten Mutationen genannt werden (Kanjilal und Ananthaswamy, 1996). Sie treten in den basalen und suprabasalen Schichten der Epidermis auf und werden in den Langerhans-Zellen und den Keratinozyten gefunden (Vink *et al.*, 1994). Obwohl beide Läsionen potenziell mutagen sind, geht man davon aus, dass hauptsächlich die CPDs Mutagenese und Tumorentstehung bei Säugetieren initiieren (Hart *et al.*, 1977; Tornaletti und Pfeiffer, 1996), da (6-4)-Photoprodukte in Säugetierzellen schneller repariert werden als CPDs (Mitchell und Nairn, 1989). Häufig findet man diese UV-Signatur-Mutationen z.B. in dem Gen *p53* (Brash *et al.*, 1991; Rady *et al.*, 1992; Kress *et al.*, 1992; Ziegler *et al.*, 1993; Kanjilal *et al.*, 1993; Nataraj *et al.*, 1995; Ananthaswamy *et al.*, 1997).

#### 1.2.1.1 Tumorsuppressorgen *p53*

Das *p53*-Gen ist das bekannteste Tumorsuppressorgen bei epidermalen Tumoren. *p53*-Alterationen sind bei 60 bis 75 Prozent der Plattenepithelkarzinome und bei 50 Prozent der Basalkarzinome und aktinischen Keratosen immunhistologisch nachweisbar (Stadler und Hartig, 2003). Das *p53*-Tumorsuppressorgen kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Durch die Regulation von mindestens sechs nachgeschalteten Zielgenen (u.a. *p21/Waf-1/Cip1*, *mdm2*, *GADD45*, *Cyclin G*, *bax*, *IGF-BP3*) nimmt es auf der RNA-Ebene Einfluss auf das DNA-Reparatur-, Apoptose- und Proliferationsprogramm der Zelle (Abb. 1.2; Levine *et al.*, 1991; Vogelstein und Kinzler, 1992; Smith *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Harris, 1996; Li *et al.*, 1996; 1997).

Es wurde gezeigt, dass *p53* eine Genaktivierungskaskade vermittelt, durch welche schließlich der Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase angehalten wird (Xiong *et al.*, 1993; Jacks und Weinberg, 1996). Durch den Zellzyklus-Stopp können Reparaturprozesse an der DNA ablaufen, bevor die Replikation in der S-Phase stattfindet (Abb. 1.2; Kuerbitz *et al.*, 1992). Darüber hinaus kontrolliert *p53* den Zellzyklus auch an einem G<sub>2</sub>/M- sowie an einem dritten G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-S-Phasen-Checkpoint (Levine, 1997). Offensichtlich wirkt *p53* als „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992), indem es die Intaktheit der DNA kontrolliert und nach eingetretenem DNA-Schaden der Zelle Zeit gibt, Defekte vor der nächsten Synthesephase zu reparieren.



**Abb. 1.2: Wirkung der UV-B-Strahlung auf die Haut und das Immunsystem** (nach Ouhit und Ananthaswamy, 2001). Dargestellt sind die verschiedenen Signalwege, die an der Entwicklung von Hautkarzinomen nach UV-B-Strahlung beteiligt sind.

Gelingt bei großem Schaden die Reparatur nicht, so wird die Zelle durch den programmierten Zelltod – die Apoptose – eliminiert (Abb. 1.2; Lowe *et al.*, 1993).

Zellen, die durch Mutationen oder durch Komplexbildung funktionell inaktives *p53* exprimieren, bleiben nach DNA-Schädigung nicht in der G<sub>1</sub>-Phase stehen, sondern beginnen unkontrolliert die Synthesephase und können durch klonale Expansion

Mutationen anreichern. Mutiertes *p53* ist nicht in der Lage, die Apoptose dieser Zellen einzuleiten. Nach wiederholter Schädigung nimmt demnach die Anzahl sterbender Zellen ab, während die Zahl transformierter Zellen zunimmt (Abb. 1.2; Kamb, 1994). Inzwischen konnte diese Vorstellung von der Entstehung der aktinischen Keratose im Mausmodell bewiesen werden (Ziegler *et al.*, 1994).

In epidermalen Zellen mit einer heterozygoten Mutation im *p53*-Gen nach UV-bedingter DNA-Schädigung wurde eine verminderte Apoptoserate nachgewiesen (Cross *et al.*, 1995). Tumore, die solche Alterationen des *p53*-Gens aufweisen, besitzen in der Regel eine wesentlich höhere Malignität bei insgesamt schlechterer Ausdifferenzierung (Ruggeri *et al.*, 1991). Tumore des Menschen mit Mutationen im *p53*-Gen sprechen schlechter auf Chemo- und Strahlentherapie an, vermutlich, weil eine Auslösung der Apoptose nicht mehr möglich ist (Schlichtholz *et al.*, 1992). Außerdem sind *p53-knock-out*-Mäuse anfälliger für UV-B-Karzinogenese (Jiang *et al.*, 1999).

#### 1.2.1.2 UV-B-induzierte Apoptose

Die durch UV-B-Strahlung induzierte Apoptose eliminiert Keratinozyten, die UV-B-induzierte Mutationen in ihrer DNA besitzen (Ziegler *et al.*, 1994). Solche apoptotischen Keratinozyten kann man histologisch als *sunburn cells* identifizieren (Daniels *et al.*, 1961). Die Apoptose ist ein komplexer, hochgradig regulierter Prozess, bei dem unter anderem (1) Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie und (2) spezielle Oberflächenrezeptoren der Zielzellen, wie zum Beispiel das als Fas- oder APO-1-Rezeptor bezeichnete CD95-Membranprotein, von Bedeutung sind (Abb. 1.2; Krammer *et al.*, 1994).

(1) Überexpressionsstudien und Tierversuche haben gezeigt, dass Bcl-2 der Protagonist einer ganzen Familie homologer Proteine ist, die zum Teil Apoptose einleiten können, während andere einen protektiven Effekt ausüben. Zu den proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie gehören Bcl-X<sub>S</sub>, Bax, Bad und Bak, zu den antiapoptotischen unter anderem Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1 und A1. Die Feinsteuerung dieses Systems erfolgt durch Ausbildung von Homo- und Heterodimeren zwischen diesen beiden Gruppen. Dabei ist für das Überleben oder den Tod einer Zelle das Ausmaß der Heterodimerisierung zwischen Bcl-2 und seinem Hauptantagonisten entscheidend (Reed, 1996; Kroemer, 1997). Die Expression von Bcl-2 in der Epidermis beschränkt sich auf die Basalschicht und die Haarfollikel (Hockenberry *et al.*, 1991; Stenn *et al.*, 1994). Dagegen wurde Bcl-X<sub>L</sub> vor

allem in den suprabasalen Schichten der Epidermis nachgewiesen. Bax zeigte eine schwache und Bak eine starke Expression in allen Epidermisschichten (Krajewski *et al.*, 1994a; 1994b; 1996). UV reguliert die Bcl-2-Expression sowohl in normaler Haut als auch in DNA-reparaturdefizienten Fibroblasten herunter (Isoherranen *et al.*, 1999; Washio *et al.*, 1999). Dabei sind die durch *p53* vermittelte Hochregulierung der Bax-Expression und das Herunterregulieren der Bcl-2-Expression von Bedeutung (Harris, 1996).

(2) Keratinozyten exprimieren den CD95 (= Fas)-Rezeptor sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Aragane *et al.*, 1998). Nach geeigneter Stimulation kommt es durch Bindung mit dem beispielsweise auf zytotoxischen T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen exprimierten Liganden CD95-L bzw. durch spezifische Antikörper, wie anti-APO-1, an den CD95-Rezeptor zur Rekrutierung des intrazellulären Adaptermoleküls FADD (FADD = *Fas-associated protein with death domain* = MORT1; Kischkel *et al.*, 1995). FADD und CD95-Rezeptor besitzen sogenannte „Todesregionen“, mit deren Hilfe sie Heterodimere ausbilden können. Diese Oligomerisierung von CD95-Rezeptormolekülen führt zur Ausbildung eines Signalkomplexes DISC (*Death inducing signal complex*), der in weiterer Folge zur schnellen Aktivierung einer Proteasenkaskade führt. Die Enzyme, die hier eine Rolle spielen, gehören zu einer größeren Gruppe von Zysteinproteasen, der sogenannten ICE-Familie (ICE = *Interleukin-1beta-converting enzyme* = Caspase-1).

UV-Exposition induziert über *p53* die Hochregulierung der so genannten „Todesrezeptoren“ der TNF-Rezeptorfamilie (TNF und Fas) und deren Liganden (Kibitel *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1999). Die nachfolgenden Rezeptor-Liganden-Interaktionen führen zur Bildung der *sunburn cells*. Der TNF-Rezeptor und Fas können auch ligandenunabhängig, nur über eine UV-induzierte Trimerisierung, Apoptose verursachen (Aragane *et al.*, 1998; Kibitel *et al.*, 1998; Sheikh *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1999).

### **1.2.2 Wirkung der UV-B-Strahlung auf das Immunsystem der Haut**

Für die UV-B-vermittelte Hautkarzinogenese ist neben der mutagenen Wirkung der UV-B-Strahlung auch der modulierende Effekt von UV-B-Strahlung auf das Immunsystem verantwortlich (Abb. 1.2; Nishigori *et al.*, 1996). Zunächst können Entzündungsreaktionen beobachtet werden, die Folge der durch UV-B verursachten Infiltration von Makrophagen, Granulozyten und T-Zellen in die Epidermis sind (Cooper *et al.*, 1993; Di Nuzzo *et al.*, 1998). Infiltrierende Makrophagen können CD4<sup>+</sup>-autologe Suppressor-T-Zellen aktivieren

(Baadsgaard *et al.*, 1990). Basierend auf ihrem Zytokinprofil können die CD4<sup>+</sup>T<sub>h</sub>-Zellen in zwei Effektor-Populationen unterteilt werden. Die T<sub>h</sub>1-Populationen produzieren vor allem IL-2, Lymphotoxin und IFN- $\gamma$ . Die T<sub>h</sub>2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 (Abbas *et al.*, 1996). Es wird angenommen, dass vor allem T<sub>h</sub>1-vermittelte Antworten sensitiv für UV-B-Bestrahlung sind (Araneo *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 1994; Ullrich, 1996). So supprimiert UV-B-Strahlung CHS (*contact hypersensitivity* = Kontakthyper-sensitivität)-, DTH (*delayed-type hypersensitivity* = Hypersensitivität vom verzögerten Typ)-Antworten und Reaktionen auf Alloantigene (Toews *et al.*, 1980; Rivas und Ullrich, 1992; Rattis *et al.*, 1995).

Dieser immunsupprimierende Effekt von UV-B-Strahlung wurde in den letzten Jahren umfassend untersucht (Kripke, 1994; Duthie *et al.*, 1999; Meunier, 1999; Nghiem *et al.*, 2002). Die durch UV-B induzierte lokale und systemische Immunsuppression lässt sich dabei hauptsächlich auf drei verschiedene Mechanismen zurückführen:

(1) UV-B-Strahlung führt zum einen zu einer Reduktion der epidermalen Langerhans-Zellen (LC) und der dendritischen epidermalen T-Zellen (DETC) (Toews *et al.*, 1980; Aberer *et al.*, 1986; Cooper *et al.*, 1993, Schwarz, 2005): Erstens durch erhöhte Migration in Richtung Lymphknoten (Moodycliffe *et al.*, 1992; Sontag *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 2006) und zweitens durch Zelltod (Tang und Udey, 1992). Die LCs, DETCs und Makrophagen aus UV-bestrahlter Epidermis können hapten-spezifische Immunsuppression und Toleranz induzieren (Cruz *et al.*, 1989; Hammerberg *et al.*, 1994; Dai und Streilein, 1995; Kremer *et al.*, 1996). Der durch UV-B induzierte DNA-Schaden und die hemmende Wirkung von UV-B auf die Hochregulierung von kostimulatorischen Molekülen führt zu einer Induktion von regulatorischen T-Zellen, die antigenspezifische Toleranz induzieren (Noonan *et al.*, 1981; Elmetts *et al.*, 1983; Simon *et al.*, 1990; 1991; Weiss *et al.*, 1995; Denfeld *et al.*, 1998; Schwarz *et al.*, 2004; 2005) und hohe Mengen an IL-10 produzieren (Beissert *et al.*, 2006). UV-B führt zu einer transienten Erscheinung von IL-4<sup>+</sup>-neutrophilen Granulozyten, die IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  sekretieren und die Entwicklung von T<sub>h</sub>2-Antworten unterstützen (Teunissen *et al.*, 2002).

(2) UV-B ist in der Lage, normale Chromophore in der Haut in immunsuppressive umzuwandeln, wie zum Beispiel die Änderung von der *trans*-Urocansäure (UCA) in die *cis*-Urocansäure (DeFabo und Noonan, 1983; Vink *et al.*, 1996). UCA ist ein Histidin-derivat, welches von Keratinozyten synthetisiert wird und in der Epidermis akkumuliert,

solange keine katabolischen Enzyme vorhanden sind. *Cis*-UCA wirkt immunsuppressiv, indem es zelluläre Immunreaktionen und die Fähigkeit von LCs inhibiert, Tumorantigene zu präsentieren (Ross *et al.*, 1986; Beissert *et al.*, 1997; 2001).

(3) UV-B moduliert die Transkription einer großen Anzahl von aus Keratinozyten stammenden Zytokinen. Nach UV-B-Bestrahlung werden direkt durch den verursachten DNA-Schaden die Zytokine IL-10 und TNF- $\alpha$  freigesetzt (Nishigori *et al.*, 1996; Kibitel *et al.*, 1998). Gleichzeitig kommt es zu einer autokrinen Stimulation der Keratinozyten durch IL-1 $\alpha$ , was eine erhöhte Produktion von IL-1 $\alpha$ , IL-6 und GM-CSF zur Folge hat (Ansel *et al.*, 1988; Kirnbauer *et al.*, 1991; Gallo *et al.*, 1991; Nozaki *et al.*, 1991).

IL-10 und TNF- $\alpha$  wirken vor allem immunsuppressiv, indem sie T-Zell-vermittelte Immunantworten verhindern (Enk *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 1994; Ullrich, 1994; 1995). IL-10 beeinflusst die B7-Expression auf Langerhans-Zellen direkt und modifiziert somit die Antigenpräsentation zu den T<sub>h</sub>-Zellen in den Lymphknoten (Weiss *et al.*, 1995). Außerdem stimuliert es die T<sub>h</sub>2-Zellen, während es selektiv die Proliferation, Effektorfunktion und Entwicklung der T<sub>h</sub>1-Zellen inhibiert (Mosmann und Moore, 1993). Aus diesem Grund wird es von vielen Experten als der primäre Vermittler einer sowohl lokalen als auch systemischen Immunsuppression gesehen (Takashima und Bergstresser, 1996). So supprimiert es zum Beispiel auch die Produktion von IL-12 nach UV-Bestrahlung (D'Andrea *et al.*, 1993). IL-12 ist in vielen seiner Funktionen und Wirkungen reziprok zu denen von IL-10. So führt zum Beispiel die Gabe von IL-12 zur Aufhebung der UV-induzierten Immunsuppression und zur Überwindung der UV-induzierten Toleranz (Muller *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1996; Beissert *et al.*, 2001). Die durch UV-B induzierte Hautkarzinogenese wird dabei hauptsächlich von IL-12-abhängigen DNA-Reparaturmechanismen verhindert (Meeran *et al.*, 2006a; 2006b; Maeda *et al.*, 2006). Außerdem induziert IL-12 die Entwicklung von T<sub>h</sub>1-Zellen und führt so zur Freisetzung von IFN- $\gamma$  (D'Andrea *et al.*, 1995; Trinchieri, 1995).

Die immunsuppressive Wirkung von TNF- $\alpha$  nach UV-B-Bestrahlung beruht hauptsächlich auf seiner Eigenschaft, die Morphologie der Langerhans-Zellen zu verändern, deren Migration in Richtung Lymphknoten zu verstärken (Vermeer und Streilein, 1990; Moodycliffe *et al.*, 1994) und die dermalen Mastzellen zu verringern (Hart *et al.*, 1998).

IL-6 ist ein Wachstumsfaktor für T<sub>h</sub>2-Zellen, indem es die Transkription von IL-4 aktiviert (Rincon *et al.*, 1997). Die genaue Funktion von IL-6 im Haut-Immunsystem ist unbekannt.

Es gibt jedoch einige Anzeichen dafür, dass es das Vorhandensein von IL-10 im Plasma reguliert (Nishimura *et al.*, 1999).

### **1.3 Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF)**

GM-CSF gehört zur Familie der koloniestimulierenden Faktoren (*colony-stimulating factors* = *CSFs*). Diese sind humorale Faktoren, die zur *in vitro*-Proliferation und Differenzierung bestimmter hämatopoetischer Vorläuferzellen benötigt werden. Sie stimulieren in einer semisoliden Kultur aus Knochenmarkzellen die Bildung von Granulozyten- und Makrophagenkolonien (Bradley und Metcalf, 1966). Die koloniestimulierenden Faktoren werden von zahlreichen Zellen produziert, u. a. auch von Fibroblasten, Endothelzellen, Stromazellen und Lymphozyten (Metcalf, 1988). In einem gesunden Organismus sind sie systemisch jedoch fast nicht nachweisbar. Als Antwort auf Stimuli, wie zum Beispiel eine Infektion, findet aber eine schnelle Hochregulierung statt (Metcalf, 1988; Gasson, 1991).

Zu der Familie der Wachstumsfaktoren gehören außerdem noch G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) und IL-3 (*Interleukin-3*, auch bekannt als Multi-CSF) (Stanley und Heard, 1977; Ihle *et al.*, 1982; Nicola *et al.*, 1983). Unter dem Einfluss von G-CSF entwickeln sich hämatopoetische Vorläuferzellen hauptsächlich zu neutrophilen Granulozyten und ihren Vorläuferzellen (Metcalf und Nicola, 1983). M-CSF fördert primär die Bildung von Makrophagen (Stanley und Heard, 1977). Im Gegensatz dazu enthalten die Kolonien viele verschiedene Zelllinien, die unter dem Einfluss von IL-3 gewachsen sind.

GM-CSF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Proliferation, Differenzierung und das Überleben verschiedener hämatopoetischer Zelllinien stimuliert (Metcalf *et al.*, 1986; Nishijima *et al.*, 1995; Caux *et al.*, 1996). Es wird von vielen Zellen hergestellt und sezerniert, etwa von T- und B-Zellen (Cline und Golde, 1974; Wong *et al.*, 1985; Robertson *et al.*, 1994), Makrophagen (Thorens *et al.*, 1987), Mastzellen (Plaut *et al.*, 1989), Fibroblasten (Yamato *et al.*, 1989), Endothelzellen (Bagby *et al.*, 1986), Mesothelialzellen und Keratinozyten (Braunstein *et al.*, 1994; Kaplan *et al.*, 1992). Meist erfolgt die Ausschüttung nach einem Reiz, dem die Zelle ausgesetzt ist. T-Lymphozyten sezernieren GM-CSF unter anderem nach einem Lektin- oder IL-1-Stimulus (Cline und Golde, 1974), B-Lymphozyten nach Gabe von Polysacchariden (LPS) oder Phorbolestern

(Pluznik *et al.*, 1989), Makrophagen nach Stimulation durch FKS oder LPS (Thorens *et al.*, 1987; Fibbe *et al.*, 1988).

GM-CSF übt seine biologische Funktion durch Bindung an den heterodimeren GM-CSF-Rezeptor aus, der auf Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und alveolaren Epithelzellen exprimiert wird (Griffin *et al.*, 1990). Dieser besteht (1) aus einer ligandenspezifischen  $\alpha$ -Untereinheit, die alleine nicht in der Lage ist, GM-CSF zu binden, und (2) aus einer  $\beta$ -Untereinheit, die gemeinsam ist für GM-CSF, IL-3 und IL-5, und die GM-CSF alleine nur mit einer sehr schwachen Affinität bindet (Miyajima, 1992). Erst zusammen mit der  $\alpha$ -Untereinheit bildet sich der hoch affine heterodimere GM-CSF-Rezeptor (Kastelein und Shanafelt, 1993). Dies führt zu einer Aktivierung von vor allem drei unterschiedlichen intrazellulären Signaltransduktionswegen in den jeweiligen Zielzellen: (1) den JAK/STAT-Signalweg, (2) MAPK-Signalwege und (3) die PI3-K-Kaskade (Guthridge *et al.*, 1998; DeGroot *et al.*, 1998; Adachi und Alam, 1998; Scott und Begley, 1999; Woodcock *et al.*, 1999).

### 1.3.1 Einfluss von GM-CSF auf Zellen des hämatopoetischen Systems

GM-CSF beeinflusst die Proliferation, die Reifung und das Überleben vieler Zellen des hämatopoetischen Systems. Es ist ein potenter Wachstumsfaktor für Vorläuferzellen der myeloiden Reihe (CD34<sup>+</sup>), aus der sich sowohl neutrophile und eosinophile Granulozyten als auch Monozyten entwickeln (Donahue *et al.*, 1986; 1996; Dibbert *et al.*, 1998). Epidermale LCs sind professionelle antigenpräsentierende Zellen, die ebenfalls aus den CD34<sup>+</sup>-Vorläuferzellen entstehen (Banchereau und Steinmann, 1998). GM-CSF verhindert *in vitro* das Absterben von Langerhans-Zellen (Heufler *et al.*, 1988) und fördert deren Reifung und Funktionsfähigkeit (Caux *et al.*, 1992; Caux *et al.*, 1996; Herbst *et al.*, 1998). GM-CSF kann außerdem *in vitro* unter bestimmten Bedingungen die Proliferation von Zellen der erythroiden Reihe stimulieren (Sieff *et al.*, 1985). Kontrovers wird die Rolle von GM-CSF in Bezug auf die Stimulation der Proliferation und Funktion von T-Zelllinien diskutiert (Kupper *et al.*, 1986; Masucci *et al.*, 1990; Shi *et al.*, 2006). Ob diese Effekte auf einen direkten Einfluss von GM-CSF auf die Lymphozyten zurückzuführen sind, ist fraglich, da bisher noch kein GM-CSF-Rezeptor auf T-Zellen nachgewiesen werden konnte.



In Zellen des hämatopoetischen Systems wird vor allem die Fähigkeit von Granulozyten und Makrophagen beeinflusst, Pathogene und körperfremde Substanzen zu eliminieren. Zu diesem Zweck induziert GM-CSF die Degranulation von Neutrophilen (Richter *et al.*, 1989), inhibiert deren Migration (Gasson *et al.*, 1984), fördert die Zytokinausschüttung, zum Beispiel von IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und IFN- $\gamma$  (Lindemann *et al.*, 1989), moduliert die Zelloberflächenexpression von Rezeptoren, zum Beispiel CD11a, CD11b und CD11c, und fördert so die Phagozytose von Bakterien (Fleischmann *et al.*, 1986). Die Lebensdauer und Migration von Eosinophilen, deren Zytotoxizität (Lopez *et al.*, 1986) und Leukotriensynthese (Silberstein *et al.*, 1986) werden ebenso induziert wie die Exozytose von Histamin (Haak-Frendscho *et al.*, 1988) und die Expression des Komplementrezeptors C3a in Basophilen. In Makrophagen wird die Zytokinausschüttung moduliert (Hart *et al.*, 1988) sowie die Expression von Oberflächenrezeptoren (Hancock *et al.*, 1988) und Zelladhäsionsmolekülen reguliert (Gamble *et al.*, 1989).

### **1.3.2 Wirkung von GM-CSF auf nicht-hämatopoetische Zellen**

GM-CSF verstärkt die Proliferation, Migration und Aktivierung von Endothelzellen (Bussolino *et al.*, 1989). Keratinozyten produzieren GM-CSF, sind jedoch gleichzeitig auch seine Zielzellen. Es konnte gezeigt werden, dass GM-CSF sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ein potentes Mitogen für Keratinozyten ist (Kupper *et al.*, 1988; Hancock *et al.*, 1988; Braunstein *et al.*, 1994; Pastore *et al.*, 1997; Kawada *et al.*, 1997). In zahlreichen Studien wurde die Empfänglichkeit für GM-CSF von verschiedenen Tumorzelllinien nicht-hämatopoetischen Ursprungs beschrieben, zum Beispiel von kleinzelligen Lungenkarzinomen (SCCL) (Ruff *et al.*, 1986), von bestimmten Osteosarkom-Linien, Brustkarzinom-Zelllinien (Dedhar *et al.*, 1988) und Kolonkarzinom-Zelllinien (Berdel *et al.*, 1989).

### **1.3.3 GM-CSF und Krebs**

Im Falle von Krebserkrankungen sind die Daten zu GM-CSF widersprüchlich. Zum einen wurde *in vitro* gezeigt, dass GM-CSF ein notwendiger Faktor für das Wachstum von Leukämiezellen ist. Bestimmte akute myeloide (AMLs) und lymphoblastische Leukämien reagieren auf auto- und parakrin wirkendes GM-CSF mit unkontrollierter Proliferation

(Young und Griffin, 1986; Russell, 1992; Freedman *et al.*, 1993). Zahlreiche Krebszelllinien produzieren *in vitro* hohe Mengen an GM-CSF (Pak *et al.*, 1995), ebenso wie solide Tumore (Zinzar *et al.*, 1985; Mano *et al.*, 1987), Plattenepithelkarzinome (Mann *et al.*, 1992; Mueller und Fusenig, 1999; Mueller *et al.*, 2001; Gutschalk *et al.*, 2006), Osteosarkome (Rochet *et al.*, 1999), Glioblastome (Mueller *et al.*, 1999) und pulmonare Adenokarzinome (Wislez *et al.*, 2001). Humaner Prostatakrebs und Melanome exprimieren ebenfalls nachweisbare Mengen des Wachstumsfaktors (Rokhlin *et al.*, 1996; Bronte *et al.*, 1999). Da die Expression von GM-CSF oft mit der Ko-Expression des dazugehörigen Rezeptors verbunden ist, nimmt man an, dass dies der autokrinen Stimulation des Tumorzellwachstums, der Migration, Invasion und Metastasierung dient (Nishino *et al.*, 1998; Mueller und Fusenig, 1999; Mueller *et al.*, 1999; 2001; Tachibana *et al.*, 2000; Kyo *et al.*, 2000). Zusätzlich zu diesen autokrinen Effekten scheint GM-CSF parakrin auf das tumorumgebende Stroma zu wirken, zum Beispiel durch Angiogenese (Lathers *et al.*, 2001; Mann *et al.*, 2001b; Bussolino *et al.*, 1993; Bikfalvi und Han, 1994). Außerdem geht eine konstitutive Expression von GM-CSF mit Leukozytose (Tsukuda *et al.*, 1993; Horii *et al.*, 1997; Ota *et al.*, 1998; Ichiishi *et al.*, 2000) und einer höheren Überlebensrate der infiltrierenden Neutrophilen (Wislez *et al.*, 2001) einher. GM-CSF scheint auch die Fähigkeit zur Metastasierung von Tumoren in Versuchstieren positiv zu beeinflussen (Takeda *et al.*, 1991).

Die beschriebenen Daten deuten darauf hin, dass der Wachstumsfaktor GM-CSF die Entwicklung von Neoplasien eher unterstützt, da er von diesen quantitativ exprimiert wird und autokrin auf sie wirkt. Transplantationsversuche mit B16-Melanom-Zelllinien belegen jedoch, dass GM-CSF auch die Tumorabstoßung und Tumorrückbildung positiv beeinflusst (Dranoff *et al.*, 1993). Die Injektion mit bestrahlten parentalen B16-Zellen schützt das Versuchstier nicht vor der Bildung von Tumoren, wenn anschließend unbestrahlte lebende Zellen transplantiert werden. Die Vakzinierung mit bestrahlten Melanomzellen, die GM-CSF exprimieren, führt hingegen zur Ausbildung einer Antitumor-Immunität, die das Tier vor Tumorneubildung schützt. Die erfolgreichen Versuche zur Induktion einer Antitumor-Immunität gegen B16-Melanomzellen haben dazu geführt, dass in ersten klinischen Behandlungen Hautkrebspatienten mit GM-CSF behandelt werden (Leong *et al.*, 1999; Mastrangelo *et al.*, 1999; Scheibenbogen *et al.*, 2000; Moret-Tatay *et al.*, 2003).

### 1.3.3.1 Die Rolle von GM-CSF in der chemisch induzierten Hautkarzinogenese

Um die zentralen Mechanismen der Hautkarzinogenese in Säugetieren untersuchen zu können, wurden Protokolle erstellt, welche zur Ausbildung von gutartigen, nicht invasiven (Papillomen) und bösartigen, invasiven Tumoren (Karzinomen) in der Haut von Mäusen führen (Innaccone *et al.*, 1978). Hierbei werden chemische Stoffe zur Einführung von Mutationen (Initiation) und zur Reizung (Promotion) verwendet (DiGiovanni, 1992). Im Rahmen der malignen Konversion entstehen aus den Papillomen oder den Dysplasien im Laufe des Experimentes Karzinome. Als Tumorinitiatoren können dabei unter anderem polyzyklische Aromate (z.B. DMBA=7,12-Dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthrazen, B[a]P=Benzo[ $a$ ]pyrene), Carbamide (z. B. Urethane, Vinylcarbamid), Nitrosamine (z.B. MNNG=*N*-Methyl-*N'*Nitro-*N*-Nitro-Guanidin) und Harnstoff (z.B. NMU=Methyl-Nitrosoharnstoff) verwendet werden. Als Tumorpromotoren können unter anderem TPA (12-*O*-Tetradecaoylphorbol-13-Azetat), Mezerein, Benzoylperoxid, Tabakrauch-Kondensat (moderater Promotor) und Zitrusöl (schwacher Promotor) in der Haut der Mäuse wirken (DiGiovanni, 1992; DiGiovanni *et al.*, 1993).

Da GM-CSF nach Applikation von DMBA nicht (Robertson *et al.*, 1994), hingegen nach Behandlung mit TPA sehr früh induziert wird, scheint es eine zentrale Bedeutung bei der Tumorpromotion zu haben (Fürstenberger *et al.*, 1993).

In der durch DMBA und TPA induzierten Hautkarzinogenese fördert sowohl eine Hochregulation als auch eine Herunterregulation von GM-CSF die Tumorzinzidenz und das Tumorstadium, und zwar über zwei verschiedene Mechanismen: (1) im Falle einer gesteigerten GM-CSF-Aktivität über eine endogene Tumorpromotion und (2) bei einer verringerten GM-CSF-Aktivität über eine verringerte Tumorzellabstoßung (Mann *et al.*, 2001b).

Charakteristisch für DMBA als Tumor-Initiator in der Haut ist es, Mutationen in das 61. Kodon des *Ha-ras* Genes einzufügen (Cheng *et al.*, 1988). In der durch UV-B-Strahlung verursachten Hautkarzinogenese sind jedoch eher Mutationen im *p53*-Gen von Bedeutung (Brash *et al.*, 1991; 1996; Stadler und Hartig, 2003). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, die Funktion von GM-CSF *in vivo* mit UV-B als Mutagen zu untersuchen.

## 1.4 Ziel der Arbeit

GM-CSF ist ein pleiotropes Zytokin, das die Proliferation, Differenzierung und das Überleben von hämatopoetischen Zellen gewährleistet und in normaler Haut nur in geringsten Mengen synthetisiert wird. Erst nach einer Reizung, wie zum Beispiel durch UV-B-Strahlung, kommt es zu einer schnellen Aufregulation dieses Faktors, u. a. auch durch Keratinozyten. GM-CSF wurde als direktes Mitogen für Keratinozyten beschrieben, die die Hauptzellpopulation in der Epidermis darstellen. Darüber hinaus beeinflusst GM-CSF auch indirekt durch Modulation die Freisetzung zusätzlicher Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und M-CSF durch eine Reihe weiterer Zelltypen, einschließlich Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen. Die genaue Funktion von GM-CSF in der UV-B-induzierten Hautkarzinogenese ist jedoch bisher nicht geklärt. Zum einen sezernieren viele solide Tumore (zum Beispiel epidermale Plattenepithelkarzinome) und nicht solide Tumore (zum Beispiel lymphoblastische Leukämien) GM-CSF, das autokrin die Ausbreitung von Neoplasien unterstützt. Zum anderen können transfizierte, GM-CSF sezernierende Melanomzellen eine potente Antitumor-Immunität gegen parentale Krebszellen vermitteln. In der chemisch induzierten Karzinogenese konnte gezeigt werden, dass jede Dysregulation von GM-CSF in der Haut zu einem erhöhten Risiko führt, Neoplasien zu bilden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von GM-CSF auf die UV-B-vermittelte Karzinogenese anhand von zwei bereits etablierten Mausmodellen untersucht:

- (1) Transgene Tiere, die einen GM-CSF-Antagonisten unter der Kontrolle des Keratin-10-Promotors in den suprabasalen Schichten der interfollikulären Epidermis überexprimieren (K10/GM-CSF Ant). Diese Tiere zeigen keine phänotypischen Auffälligkeiten (Mann *et al.*, 2001b).
- (2) Transgene Tiere, die GM-CSF unter der Kontrolle des Keratin-5-Promotors in der Basalschicht der interfollikulären Epidermis und in den Haarfollikeln überexprimieren (K5/GM-CSF Ag). Diese Tiere weisen eine Erhöhung auf: (a) in der Anzahl der LCs, Mastzellen und Fibroblasten in ihrer Epidermis und Dermis, (b) der mitotischen Indizes in der Basalschicht der Epidermis, (c) in der IFN- $\gamma$ -, TGF- $\beta$ 1- und IL-6-Konzentration ihrer Haut und (d) des antiapoptotischen Faktors A1. Außerdem ist ihr Körpergewicht in den ersten zwei bis drei Lebensmonaten um etwa zehn Prozent geringer (Breuhahn *et al.*, 2000).

Alle Mäuse (Kontrollgruppe, K10/GM-CSF Ant, K5/GM-CSF Ag) wurden sowohl chronisch (mehrmalige UV-B-Bestrahlung über maximal 30 Wochen) als auch akut (einmalige UV-B-Bestrahlung mit  $30 \text{ kJ/m}^2$ ) behandelt. Die aus diesen Experimenten abgeleiteten Ergebnisse sollten hinsichtlich möglicher zugrunde liegender Mechanismen analysiert werden. Entstehende Hautschäden sollten histologisch untersucht werden. Per *Microarray*-Analyse sollte Zielgene von GM-CSF identifiziert werden, die möglicherweise bei der durch UV-B-Strahlung induzierten Karzinogenese von Bedeutung sind. Die Verifizierung dieser Gene soll sowohl über *Real-Time*-PCR als auch über ELISA erfolgen. Dabei sollte die Bedeutung von GM-CSF für das Zytokinprofil der Haut nach UV-B-Bestrahlung herausgearbeitet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Die für die Experimente verwendeten Mausstämme entstammten aus der Zucht des Tierstalls der ZVTE (Zentrale Versuchstiereinrichtung) des Hochhauses am Augustusplatz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Im Rahmen der UV-B-Karzinogenese wurden die unter dem Keratin-5-Promotor GM-CSF überexprimierenden Tiere (K5/GM-CSF Ag, Linie Tg-2) und die unter dem Keratin-10-Promotor den GM-CSF-Antagonisten überexprimierenden Tiere (K10/GM-CSF Ant, Linie Tg Ant-2) verwendet. Diese Tiere sind auf FVB/NHSD-Hintergrund gezüchtet und wurden von Dr. Amrit Mann und Dr. Kai Breuhahn aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Manfred Blessing generiert und charakterisiert (Breuhahn *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2001b).

#### 2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Enzyme der Firma New England Biolabs (Bad Schwalbach) verwendet. Chemikalien wurden von den Firmen Riedel-de Haen (Selze), Sigma (Deisenhofen), Difco (Detroit, USA), DAKO (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) und Biomol (Hamburg) bezogen. Sämtliche verwendeten Chemikalien lagen in p.a.-Qualität vor.

#### 2.1.3 Wasser

Das Wasser wurde durch eine Reinstwasseranlage (MilliQ plus, Millipore) deionisiert. Bei Arbeiten mit RNA wurde das Wasser mit 0,1% DEPC einige Stunden gerührt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

#### 2.1.4 Histochemische Reagenzien

Mayers Hämalaun-Lösung

Merck, Darmstadt

May-Grünwalds Eosin-Methylen-Blau-Lösung	Merck, Darmstadt
Giemsa Azur-Eosin-Methylen-Blau-Lösung	Merck, Darmstadt
Mayers Hämatoxylin-Lösung	Sigma, Deisenhofen

### 2.1.5 Material für die histochemischen Methoden

Entellan	Merck, Darmstadt
Einfriermedium	Jung, Nussloch
Eindeckmedium (Aqua Polymount)	Polyscience, USA
Objektträger, 25 x 75 x 1 mm; Poly-L-Lysin	Menzel, Braunschweig
Deckgläschen 24 x 32 mm, 24 x 50 mm	Menzel, Braunschweig
Marker, PAP-PEN	MBT Labotech, Wiesbaden

### 2.1.6 Material für die immunchemischen Methoden

ELISA-Kits:	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA™ Set Mouse TNF (mono/poly)	
BD OptEIA™ Set Mouse IL-4	
BD OptEIA™ Set Mouse IFN- $\gamma$	
BD OptEIA™ Set Mouse IL-6	
BD OptEIA™ Set Mouse GM-CSF	
BD OptEIA™ Set Mouse IL-10	
BD OptEIA™ Set Mouse IL-12	
TGF- $\beta$ 1-ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden
ELISA-Platten	Nunc, Heidelberg

### 2.1.7 Geräte

Bakterienschüttler, Certomat	B. Braun, Melsungen
UV-Bestrahlungsgerät, Dermalight® 450	A.L.T. GmbH, Zörbig
Brutschrank <i>Cellstar</i>	Nunc, Wiesbaden
Brutschrank, Trockenofen WTC	WTB Binder Labortechnik, Tuttlingen

---

DigiScan	Asys Hitech, Österreich
Digitales Kamerasystem <i>Cybertech</i> CSI	Hitachi, Japan
Durchlichtmikroskop CK2	Olympus, Hamburg
Feinwaage BP 61	Sartorius, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop AX70	Olympus, Hamburg
Gelkammer 12 x 14 cm, Easy Cast B2	AGS, Heidelberg
Gelkammer 20 x 25 cm, Easy Cast A2	AGS, Heidelberg
Haarschneider 9551	Hauptner und Herberholz, Solingen
Hybridisierungs-ofen RPN2510	Amersham Pharmacia Biotech, UK
Kryostat CM 1900	Leica, Bensheim
Kühlthermomixer	HLC, Bovenden
Kunststoffware	Eppendorf, Hamburg
	Nunc, Wiesbaden
	Greiner, Frickenhausen
	Becton Dickinson Labware, USA
Laborwaage BP 1200	Sartorius, Göttingen
<i>Lightcycler3Run</i>	Roche, Mannheim
<i>Lightcycler</i> Kapillaren	Roche, Mannheim
Mikrowelle Micromat 135	AEG, Nürnberg
Netzgerät Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Photoprinter XLS 8600PS	Kodak, Rochester, USA
Radiometer/Photometer IL 1400A	International Light, USA
Thermo-Cycler Gene E	Techne, Wertheim
Thermodrucker P 67E	Mitsubishi, Japan
UV-Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator 312 nm	Renner, Bamberg
Verdampfer Univapo 100H	MWG Biotech, Ebersberg
VM920E-Monitor	Hitachi, Japan
<i>XYZ-Arrayer</i> Omnigrid	Genomic Solutions, USA
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg
	Heraeus, Hanau
	Sorvall Du Pont, Bad Homburg



### 2.1.8 Kits

cDNA-Synthese-Kit	Stratagene, USA
<i>CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit</i>	Amersham, Braunschweig
DNA-Ligation-Kit	TaKaRa Biomedicals, Japan
<i>Fail Safe Kit</i>	Biozym, Hamburg
<i>In Situ Cell Proliferation Kit, FLUOS</i>	Roche Diagnostics, Penzberg
<i>1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR</i>	Roche Diagnostics, Penzberg
<i>LightCycler Fast Start DNA Master</i>	
<i>SYBR Green I Kit</i>	Roche Diagnostics, Penzberg
Nucleospin-Extract-Kit	Macherey & Nagel, Düren
pGEM-T-Ligationskit	Promega, Mannheim
Plasmid Midi- und Maxipräparationskit	Qiagen, Hilden
Plasmid Minipräparationskit	Macherey & Nagel, Düren
<i>Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

### 2.1.9 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für PCR-Analysen wurden von der Firma Metabion (Planegg-Martinsried) synthetisiert.

#### *Analyse der transgenen Nachkommen der Linie K5/GM-CSF Ag*

Keratin-5-Primer: 5'-ATG AAG ACA GCG TTT GCA CCC-3'; Position 1122 bis 1142; GenBank Accession Nr.: Z32746 (Casatorres *et al.*, 1994).

Murine-GM-CSF-cDNA-Primer: 5'-CTG GCT GTC ATG TTC AAG GCG-3'; Position 218 bis 198; GenBank Accession Nr.: X05906 (Gough *et al.*, 1984).

#### *Analyse der transgenen Nachkommen der Linie K10/GM-CSF Ant*

Keratin-10-Primer: 5'-TAA CAC ATG TGG GAT ACA CCC-3'; Position 1021 bis 1042; GenBank Accession Nr.: X02870 (Rieger *et al.*, 1985).

Murine-GM-CSF-cDNA-Primer: 5'-CTG GCT GTC ATG TTC AAG GCG-3'; Position 218 bis 198; GenBank Accession Nr.: X05906 (Gough *et al.*, 1984).

*Generierung ausgewählter Sonden für den Microarray*

β-Actin-for: 5'-CTG GGC CGC TCT AGG CAC CA-3'; Position 25 bis 44;  
GenBank Accession Nr.: X03765 (Alonso *et al.*, 1996).

β-Actin-rev: 5'-TAG CCC TCG TAG ATG GGC ACA G-3'; Position 428 bis 407;  
GenBank Accession Nr.: X03765 (Alonso *et al.*, 1996).

B7.1-for: 5'-CAA GTT TCC ATG TCC AAG GC-3'; Position 99 bis 118;  
GenBank Accession Nr.: AF065893 (Ma und Teuscher, 1999).

B7.1-rev: 5'-TTC AGATTC AGG ATC CTG GG-3'; Position 654 bis 635;  
GenBank Accession Nr.: AF065893 (Ma und Teuscher, 1999).

B7.2-for: 5'-GAT CTC AGA TGC TGT TTC CG-3'; Position 89 bis 109;  
GenBank Accession Nr.: AF065897 (Ma und Teuscher, 1999).

B7.2-rev: 5'-TCC CGC TCT AAC TTA GAG GC-3'; Position 884 bis 863;  
GenBank Accession Nr.: AF065897 (Ma und Teuscher, 1999).

Bad-for: 5'-CAG GGA GGT GTC ATT AAC CC-3'; Position 378 bis 398;  
GenBank Accession Nr.: L37296 (Yang *et al.*, 1995).

Bad-rev: 5'-CCA GGA CTG GAT AAT GCG CG-3'; Position 1041 bis 1021;  
GenBank Accession Nr.: L37296 (Yang *et al.*, 1995).

Bak-for: 5'-ATT CAG GTG ACA AGT GAC GG-3'; Position 212 bis 232;  
GenBank Accession Nr.: Y13231 (Ulrich *et al.*, 1997).

Bak-rev: 5'-GAG AGA GGT TTA GTC CAG CC-3'; Position 940 bis 920;  
GenBank Accession Nr.: Y13231 (Ulrich *et al.*, 1997).

Bax-for: 5'-ATG GAC GGG TCC GGG GAG CA-3'; Position 1 bis 21;  
GenBank Accession Nr.: L22472 (Oltvai *et al.*, 1993).

Bax-rev: 5'-CTT CTT CCA GAT GGT GAG CG-3'; Position 570 bis 551;  
GenBank Accession Nr.: L22472 (Oltvai *et al.*, 1993).

Bcl2-for: 5'-AGA ACA GGG TAT GAT AAC CG-3'; Position 1836 bis 1856;  
GenBank Accession Nr.: M16506 (Negrini *et al.*, 1987).

Bcl2-rev: 5'-TAT CCT CGA TCC AGG TGT GC-3'; Position 2386 bis 2366;  
GenBank Accession Nr.: M16506 (Negrini *et al.*, 1987).

Bcl3-for: 5'-GAT GCC CAT TTA CTC TAC CC-3'; Position 245 bis 264;  
GenBank Accession Nr.: M90397 (Bhatia *et al.*, 1992).

Bcl3-rev: 5'-TCT TGA GGC TAC TGT CAG CC-3'; Position 990 bis 971;  
GenBank Accession Nr.: M90397 (Bhatia *et al.*, 1992).

Bcl10-for: 5'-ACT GAA GTG AAG AAG GAC GC-3'; Position 118 bis 137;  
GenBank Accession Nr.: AJ006289 (Willis *et al.*, 1998).

Bcl10-rev: 5'-GAC GCC ATA GAG CAG AAG AAG GG-3'; Position 587 bis 568;  
GenBank Accession Nr.: AJ006289 (Willis *et al.*, 1998).

Belx-for: 5'-GCT AAA CAC AGA GCA CC-3'; Position 166 bis 186;  
GenBank Accession Nr.: L35049 (Gonzalez-Garcia *et al.*, 1994).

Belx-rev: 5'-GAG CAC AAA AGT GTC CC-3'; Position 825 bis 805;  
GenBank Accession Nr.: L35049 (Gonzalez-Garcia *et al.*, 1994).

BimEL-for: 5'-GAA GGT GGA CAA TTG CAG CC-3'; Position 43 bis 62;  
GenBank Accession Nr.: AF032459 (O'Connor *et al.*, 1998).

BimEL-rev: 5'-ACC AGA CGG AAG ATA AAG CG-3'; Position 575 bis 555;  
GenBank Accession Nr.: AF032459 (O'Connor *et al.*, 1998).

cdk6-for: 5'-TAT GGG AAG GTG TTC AAG GC-3'; Position 125 bis 144;  
GenBank Accession Nr.: AF132483 (Thomas *et al.*, 1999).

cdk6-rev: 5'-TTG GAA TGA AAA GCC TGC CG-3'; Position 825 bis 806;  
GenBank Accession Nr.: AF132483 (Thomas *et al.*, 1999).

c-rel-for: 5'-GAC AAC AAC CGG ACA TAC CC-3'; Position 524 bis 543;  
GenBank Accession Nr.: X15842 (Grumont und Gerondakis, 1989).

c-rel-rev: 5'-AAACAATGG CTA CTT GGC GG-3'; Position 1133 bis 1114;  
GenBank Accession Nr.: X15842 (Grumont und Gerondakis, 1989).

Cyclin A2-for: 5'-CAG TCA GTA AAC AGC CTG CC-3'; Position 372 bis 391;  
GenBank Accession Nr.: X75483.1 (Sweeny *et al.*, 1996).

Cyclin A2-rev: 5'-CAA CCT TAC AGT TTG CAG GC-3'; Position 1079 bis  
1060; GenBank Accession Nr.: X75483.1 (Sweeny *et al.*, 1996).

Cyclin B-for: 5'-AAC AGT GCC TCT GAA AAG GG-3'; Position 262 bis 281;  
GenBank Accession Nr.: X58708 (Paterno und Downs, 1992).

Cyclin B-rev: 5'-AGC TCC ATG AGG TAT TTG GC-3'; Position 1065 bis 1046;  
GenBank Accession Nr.: X58708 (Paterno und Downs, 1992).

Fas-for: 5'-AGT GGA AAC AAA CTG CAC CCT G-3'; Position 379 bis 400;  
GenBank Accession Nr.: M83649 (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992).

Fas-rev: 5'-CTG GAG GTT CTA GAT TCA GGG-3'; Position 672 bis 652;  
GenBank Accession Nr.: M83649 (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992).

FasL-for: 5'-TTT TTC ATG GTT CTG GTG GC-3'; Position 377 bis 396;  
GenBank Accession Nr.: U06948 (Takahashi *et al.*, 1994).

FasL-rev: 5'-TAG ACC TTG TGG TTT AGG GG-3'; Position 753 bis 733;  
GenBank Accession Nr.: U06948 (Takahashi *et al.*, 1994).

I $\kappa$ B- $\beta$ -for: 5'-GGG AAA ACT GCG GAT GCC GA-3'; Position 95 bis 114;  
GenBank Accession Nr.: U19799 (Ghosh *et al.*, 1995).

I $\kappa$ B- $\beta$ -rev: 5'-TGA CAG CTA CAT GGA GTG GG-3'; Position 719 bis 700;  
GenBank Accession Nr.: U19799 (Ghosh *et al.*, 1995).

p15-for: 5'-AGA TCC CAA CGC CCT GAA C-3'; Position 239 bis 257;  
GenBank Accession Nr.: BC002010 (Strausberg, 2001).

p15-rev: 5'-GCT TCA AGG TGA GGC TCA AG-3'; Position 745 bis 726;  
GenBank Accession Nr.: BC002010 (Strausberg, 2001).

p18-for: 5'-ATG GAT TTG GGA GAA CTG CG-3'; Position 182 bis 201;  
GenBank Accession Nr.: U19596 (Hirai *et al.*, 1995).

p18-rev: 5'-TTC TTC CAT AGA ACC TGG CC-3'; Position 527 bis 507;  
GenBank Accession Nr.: U19596 (Hirai *et al.*, 1995).

p19-for: 5'-TCT GGA AGA AGT CTG CGT CG-3'; Position 33 bis 52;  
GenBank Accession Nr.: U20497 (Hirai *et al.*, 1995).

p19-rev: 5'-TGT CCA ACA CAC CAA AAG GG-3'; Position 723 bis 704;  
GenBank Accession Nr.: U20497 (Hirai *et al.*, 1995).

p21-for: 5'-GTG ATG TCC GAC CTG TTC CG-3'; Position 106 bis 125;  
GenBank Accession Nr.: U24173 (El-Deiry *et al.*, 1995).

p21-rev: 5'-TTG CAG AAG ACC AAT CTG CG-3'; Position 559 bis 540;  
GenBank Accession Nr.: U24173 (El-Deiry *et al.*, 1995).

p27-for: 5'-AAC GTG AGA GTG TCT AAC GG-3'; Position 6 bis 26;  
GenBank Accession Nr.: U09968 (Polyak *et al.*, 1994).

p27-rev: 5'-TTA CGT CTG GCG TCG AAG GC-3'; Position 594 bis 574;  
GenBank Accession Nr.: U09968 (Polyak *et al.*, 1994).

p50-for: 5'-AGA GCA ACC AAA ACA GAG GG-3'; Position 426 bis 445;  
GenBank Accession Nr.: M57999 (Ghosh *et al.*, 1990).

p50-rev: 5'-GCT TTG CTA TCA TAG ATG GC-3'; Position 1016 bis 997;  
GenBank Accession Nr.: M57999 (Ghosh *et al.*, 1990).

PECAM-for: 5'-GGA CCA GCT GCA CAT TAG GT-3'; Position 812 bis 831;  
GenBank Accession Nr.: NM008816 (Xie und Muller, 1993).

PECAM-rev: 5'-AAT GGC AAT TAT CCG CTC TG-3'; Position 1512 bis 1493;  
GenBank Accession Nr.: NM008816 (Xie und Muller, 1993).

relA-for: 5'-AGG AAC AGT TCG AAT CTC CC-3'; Position 267 bis 286;  
GenBank Accession Nr.: M61909 (Nolan *et al.*, 1991).

relA-rev: 5'-AAG TAC TGG AAC TCC ATG GG-3'; Position 926 bis 907;  
GenBank Accession Nr.: M61909 (Nolan *et al.*, 1991).

relB-for: 5'-TTA AGG AGA ACG GCT TTG GC-3'; Position 161 bis 180;  
GenBank Accession Nr.: M83380 (Ryseck *et al.*, 1992).

relB-rev: 5'-ACT TCT TGT CGT AGA CAG GC-3'; Position 856 bis 737;  
GenBank Accession Nr.: M83380 (Ryseck *et al.*, 1992).

#### *Vektorspezifische Primer*

T7: 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3'

SP6: 5'-GAT TTA GGT GAC ACT ATA G-3'

#### *Verifizierung der Microarray-Daten mittels Real-Time-PCR*

Keratin6-for: 5'-ACC TGC AAG CTG CTA TTG CT-3';

GenBank Accession Nr.: NM008476 (Takahashi *et al.*, 1998).

Keratin6-rev: 5'-TCA ACC TGC ACT CCT CTC TCC T-3';

GenBank Accession Nr.: NM008476 (Takahashi *et al.*, 1998).

BMP9-for: 5'-TGA GTC CCA TCT CCA TCC TC-3'; Position 1799 bis 1818;  
GenBank Accession Nr.: AF188286 (Celeste, 1999).

BMP9-rev: 5'-ATG CAG GAC CGT ACC AGA AC-3'; Position 1958 bis 1939;  
GenBank Accession Nr.: AF188286 (Celeste, 1999).

HPRT-for: 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT CTT-3'; Position 601 bis  
621; GenBank Accession Nr.: NM013556 (Konecki *et al.*, 1982).

HPRT-rev: 5'-GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG-3'; Position 763 bis  
740; GenBank Accession Nr.: NM013556 (Konecki *et al.*, 1982).

TGF- $\beta$ 1-for: 5'-TTG CTT CAG CTC CAC AGA GA-3'; Position 1719 bis 1738;  
GenBank Accession Nr.: NM011577 (Derynck *et al.*, 1986).

TGF- $\beta$ 1-rev: 5'-TGG TTG TAG AGG GCA AGG AC-3'; Position 1901 bis 1882;  
GenBank Accession Nr.: NM011577 (Derynck *et al.*, 1986).

### 2.1.10 Benutzte Puffer und Medien

50 x TAE-Puffer (Elektrophorese-Puffer):	2 M Tris/HCl 50 mM EDTA 57,1 ml/l Essigsäure 96% pH 8,0
20 x SSC:	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat pH 7,0
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA
2 x RNA-Probenpuffer:	56% Formamid (v/v), deionisiert 12% 10 x MOPS-Puffer (v/v) 16% Formaldehyd (v/v) 8% dH <sub>2</sub> O (v/v) 8% Glycerin (v/v) 0,01% Bromphenolblau (w/v) 1% Ethidiumbromid (v/v)
10 x MOPS-Puffer:	200 mM MOPS 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 7,0

---

10 x Phosphate Buffered Saline (PBS):	1,5 M NaCl 1 M Natriumphosphat (pH 7,2) pH 7,2
LB-Medium:	10 g/l NaCl 10 g/l Casein 5 g/l Hefeextrakt pH 7,5
LB-Amp-Medium:	1l LB-Medium 50 mg Ampicillin
LB-Agar:	LB-Medium plus 15 g/l Agar
DNA-Ladepuffer (10x):	30% Ficoll 7,5% SDS 200 mM EDTA 100 mM Tris-HCl pH 7,5 0,125 % Bromphenolblau



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 DNA-Präparation

Proteinase-K-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8,4
	200 mM NaCl
	10 mM EDTA
	0,2% SDS

Für die Isolierung genomischer DNA wurden Schwanz- oder Ohrbiopsien von Mäusen mit Proteinase K über Nacht bei 55°C verdaut. Die Proteinase-K-Stocklösung (20 mg/ml in Proteinase-K-Puffer) wurde dazu im Verhältnis 1:40 mit Proteinase-K-Puffer verdünnt. 10 µl dieser Lösung wurden für eine Ohrbiopsie, 30 µl für eine Schwanzbiopsie eingesetzt. Für eine PCR wurden etwa 0,3% der verdauten Ohr- bzw. Schwanzbiopsie verwendet.

#### 2.2.1.2 Plasmidisolierung/alkalische Lyse (Birboim und Doly, 1979)

Zur schnellen Klonanalyse wurde die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse aus den Bakterienzellen isoliert (Birboim und Doly, 1979). Dazu wurde das NucleoSpin-Extrakt-Kit (Machery-Nagel, Düren) verwendet. Zur Gewinnung größerer Mengen von Plasmid-DNA wurde das Plasmid Midipräparationskit (QIAGEN, Hilden) benutzt. Bei der Plasmidisolierung wurde gemäß der Angaben der Hersteller vorgegangen.

#### 2.2.1.3 DNA-Restriktion und DNA-Gelelektrophorese

Die enzymatische Restriktion von DNA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufzutrennen, wurden horizontale Agarosegele gegossen, deren Konzentration zwischen 0,8% und 1,5% variierte (Sambrook *et al.*, 1989) und die 0,1 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit 1/10 Volumen des zehnfachen DNA-Auftragspuffers vermischt. Als Molekulargewichtsstandard diente ΦX174-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Roth). Die Elektrophorese erfolgte bei 4 Volt/cm Elektrodenabstand. Das Gel wurde anschließend auf einem UV-Transilluminator (Renner, Bamberg) betrachtet und mit einem digitalen

Kamerasystem dokumentiert (Cybertech CSI, VM920E-Monitor, Hitachi, Japan; P67E-Printer, Mitsubishi, Japan).

#### 2.2.1.4 Klonierung der DNA-Fragmente

Nach der Trennung der Banden durch Elektrophorese wurden die spezifischen Banden präzise unter dem UV-Transilluminator mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Das ausgeschnittene DNA-Gelstück wurde in ein Einwegreaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem Kit *NucleoSpin®Extract 2in1* (Machery-Nagel, Düren). Bei der DNA-Isolierung wurde gemäß den Angaben des Herstellers vorgegangen.

Die Ligation der *Insert*-DNA mit dem pGEM-T-Vektor erfolgte nach Anleitung des *pGEM®-T Vector System I* (Promega, Mannheim). Es wurden 3 µl des PCR-Produkts eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 16°C im Wasserbad (Sambrook *et al.*, 1989).

Alternativ wurde eine schnellere Ligationsreaktion mit dem *DNA Ligation Kit Ver.1* (TaKaRa Biomedicals, Japan) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Transformation der kompetenten Bakterien wurden 10 µl von jedem Ligationsansatz genommen. Die Präparation und Transformation von *E. coli* JM 105 (Yanish-Perron *et al.*, 1985) erfolgte nach einer von Hanahan entwickelten Methode (Hanahan, 1983; Sambrook *et al.*, 1989).

#### 2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1985)

##### *Bestimmung der Transgenität*

Die PCR zur Bestimmung der Transgenität wurde mit dem *Fail Safe Kit* (Biozym, Hamburg) durchgeführt. Dabei wurden jeweils 25 µl des Puffergemischs D, 1 pM von jedem Primer und 0,4 µl des Enzyms eingesetzt. Für die PCR mit genomischer DNA wurden 0,3% DNA des Proteinase-K-Verdau benützt (vgl. Kapitel 2.2.1.1, S. 28).

Entsprechend der Linie wurden die Primerpaare Keratin 5/GM-CSF und Keratin 10/GM-CSF verwendet. Die Proteinase K wurde durch eine dreiminütige Denaturierung (95°C) inaktiviert. Die Bedingungen waren bei 35 Zyklen für beide Linien identisch:

Denaturierung:	30 s bei 95°C
Annealing:	45 s bei 59°C
Elongation:	55 s bei 72°C

#### *Generierung der Sonden für den Microarray*

Für die PCR zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA wurden 1 ng DNA, je 1 pM der vektorspezifischen Primer Sp6 und T7, 0,25 mM dNTPs, 1 U *Taq*-Polymerase und der dazugehörige spezifische Puffer für die *Taq*-Polymerase verwendet. Zunächst erfolgte eine einminütige Denaturierung (95°C), dann in 35 Zyklen folgendes Protokoll:

Denaturierung:	30 s bei 95°C
Annealing:	45 s bei 58°C
Elongation:	55 s bei 72°C

1 µl des PCR-Produktes wurde in 35 Zyklen weiter amplifiziert:

Denaturierung:	30 s bei 95°C
Annealing:	45 s bei 59°C
Elongation:	55 s bei 72°C

#### 2.2.1.6 Ethanol-Fällung

Die DNA-Probe wurde mit 0,3 M Na-Acetat und dem zwei- bis dreifachen Volumen an absolutem Ethanol versetzt. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurde die DNA bei 13.000 U/min und 4°C für 40 Minuten pelletiert. Das DNA-Pellet wurde zur Entfernung überschüssiger Salze mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Das trockene Pellet wurde in 25 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 2.2.1.7 Isolierung von RNA aus Geweben

Um Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden, wurden alle Lösungen, die bei Arbeiten mit RNA verwendet wurden, vor Gebrauch mit 0,1% DEPC versetzt und anschließend autoklaviert. Geräte wurden, soweit möglich, bei 180°C für vier Stunden gebacken.

Die Präparation von Gesamt-RNA aus der Haut von Wildtyp- und transgenen Mäusen erfolgte nach einem Protokoll, das auf der von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987) beschriebenen Methode basiert.

Hierzu wurde unter flüssigen Stickstoff pulverisiertes Gewebe in 1 ml TRI-Reagent (Sigma, Deisenhof) durch Vortexen suspendiert und nach fünfminütiger Inkubation bei Zimmer-temperatur mit 200 µl Chloroform versetzt. Nach Durchmischung der Probe und einer weiteren Inkubation bei RT für 15 Minuten wurde diese bei 12.000 g (4°C) für 10 Minuten zentrifugiert und die Gesamt-RNA des wässrigen Überstandes mittels Isopropanol (1 ml Isopropanol pro 1 ml TRI-Reagent) gefällt. Die Nukleinsäure wurde durch Zentrifugation für mindestens zehn Minuten bei 12.000 g (4°C) pelletiert. Die RNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und kurz bei 65°C in DEPC-Wasser gelöst.

Die quantitative Bestimmung der RNA erfolgte mittels photometrischer Messungen, die Feststellung der RNA-Qualität mittels einer Formaldehyd-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989).

#### 2.2.1.8 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit dem *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit* (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) entsprechend der Angaben im Protokoll. Es wurden jeweils 3 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

#### 2.2.1.9 Fluoreszenzmarkierung von cDNA

Die direkte Fluoreszenzmarkierung der cDNA erfolgte nach dem Protokoll des *CyScribe First-Strand cDNA Labelling Kit* (Amersham, Braunschweig).

Zur Aufreinigung der cDNA wurde die mRNA zunächst durch eine alkalische Behandlung mit 2 µl 2,5 M NaOH degradiert. Durch Zugabe von 10 µl 2 M HEPES wurde die Probe neutralisiert. Die Proben wurden mit dem PCR-Aufreinigungs-kit *NucleoSpin<sup>®</sup> Extrakt 2 in 1* (Machery und Nagel, Düren) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 30 µl Elutionspuffer. Die eluierte cDNA wurde danach im Verdampfer *Univapo 100H* (MWG Biotech, Ebersberg) auf ein Volumen von 10 µl eingeeengt.

#### 2.2.1.10 Fluoreszenzgelelektrophorese von cDNA

Zur Überprüfung der Fluoreszenzmarkierung (vgl. Kapitel 2.2.1.9, S. 31) wurde ein 1%iges Agarosegel auf einen Objektträger gegossen. Als Puffer für Gele und Kammern dienten dabei TAE-Puffer.

Nachdem von jeder Probe 0,5 µl in ein eingestanztes Loch aufgetragen worden war, erfolgte die Elektrophorese bei 4 V/cm Elektrodenabstand unter Abschirmung gegen Tageslicht. Das Gel wurde mit dem Scanner GeneTac<sup>TM</sup> (Genomic Solutions, USA) auf vorhandene Fluoreszenzsignale untersucht.

#### 2.2.1.11 cDNA-Microarray

Zur Herstellung der *Microarrays* wurden mit Gamma-Aminopropyl-Silan beschichtete Objektträger (GAPS II; Corning Incorporated, USA) verwendet. Die zu spottenden Proben hatten eine Konzentration von 500 bis 600 ng/µl und wurden mit dem *Spotting*-Puffer in 96-Loch-Platten auf eine Endkonzentration von 250 bis 300 ng/µl eingestellt. Pro *Spotting*-Durchgang wurden 15 µl jeder verdünnten Probe benötigt.

*Spotting-Puffer:*

3 x SSC

1,5 M Betain (*N,N,N*-Trimethylglycerin)

Die Platte mit den Proben wurde zentrifugiert (2.000 x g; fünf Minuten), um zu gewährleisten, dass sich die Proben am Boden der einzelnen Wells befanden. Gespottet wurde mit einem *XYZ-Arrayer* (OmniGrid<sup>TM</sup>, Genomic Solutions, USA). Die cDNA-Sonden wurden doppelt nebeneinander in vier *Subarrays* gedruckt. Die Spots lagen dabei in einem Abstand von 150 µm (gemessen vom Zentrum eines Spots). Die Objektträger wurden über Nacht bei Raumtemperatur unter staubfreien Bedingungen gespottet.

Die Grenzen des *Arrays* wurden mit einem Diamantschreiber markiert. Dann wurden die Objektträger mit der Oberseite nach unten für einige Sekunden über Wasserdampf rehydriert und etwa drei Sekunden auf einer 80°C heißen Platte getrocknet. Direkt im Anschluss daran erfolgte die Befestigung der cDNA an der beschichteten Glasoberfläche durch UV-Bestrahlung (650 x 100 uJ).

Anschließend wurden die Objektträger 15 Minuten mit einer frisch angesetzten *Blocking-Lösung* behandelt.

*Blocking-Lösung:*

6 g	Bernsteinsäure-Anhydrid
325 ml	1-Methyl-2-Pyrrolidinon
15 ml	Natrium-Borat (1 M; pH 8)

Zur Denaturierung wurden die *Arrays* zwei Minuten mit 95°C heißem Wasser gewaschen. Nach kurzem Eintauchen in 95%iges Ethanol (zur Dehydrierung) wurden die Objektträger zum Trocknen nochmals zentrifugiert (500 rpm; fünf Minuten). Die Aufbewahrung bis zur Hybridisierung erfolgte unter staubfreien Bedingungen bei Zimmertemperatur.

2.2.1.12 Hybridisierung auf den *Microarray*

Die beiden mit Cy5 bzw. Cy3 markierten Wildtyp- bzw. transgenen cDNAs wurden gemischt und mit je 1 µl Poly-(A)-Nukleotiden (Metabion, Planegg-Martinsried), 1 µl Cot1 und 20 µl vorgewärmtem (37°C) Hybridisierungspuffer (*ULTRAhyb*, Ambion, USA) zehn Minuten bei 80°C inkubiert. Danach wurde diese Mischung luftblasenfrei auf den vorbereiteten, gespotteten und gewaschenen Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in einer dunklen und feuchten Kammer bei 42°C im Hybridisierungsöfen *RPN2510* (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Das Waschen der über Nacht hybridisierten Objektträger erfolgte nach den Angaben des Chipherstellers (Corning Incorporated, USA).

2.2.1.13 Fluoreszenz-Detektion

Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Scanner GeneTac™ LS4 (Genomic Solutions, USA) und die Analyse mit der dazugehörigen Software GeneTac™ Biochip Analyzer.

#### 2.2.1.14 Lightcycler *Real-Time*-PCR

Aus der Haut der Versuchsmäuse wurde, wie in Kapitel 2.2.1.7 (S.30) beschrieben, RNA isoliert. Die Synthese von cDNA erfolgte mit dem *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR* (Roche Diagnostics, Penzberg). Dabei wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, als Primer dienten Oligo-p(dt)<sub>15</sub>. Anschließend wurde die cDNA im Verhältnis 1:5 verdünnt und als *Template* für den Reaktionsansatz im Lightcycler verwendet. Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl eingesetzt. Gearbeitet wurde mit dem *LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I Kit* (Roche Diagnostics, Penzberg).

##### *Lightcycler PCR-Ansatz*

10,4 µl	dH <sub>2</sub> O
1,6 µl	MgCl <sub>2</sub>
2 µl	Primer for
2 µl	Primer rev
2 µl	<i>LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I</i>
2 µl	cDNA

Der PCR-Ansatz wurde in *Lightcycler*-Kapillaren (Roche Diagnostics, Mannheim) pipettiert, bei 2.000 x g abzentrifugiert und im *Lightcycler* (*LightCycler3Run*, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) nach folgendem Protokoll weiterverarbeitet:

##### *Lightcycler-Protokoll*

Nach zehnminütiger Denaturierung bei 95°C wurde folgendes Protokoll in 45 Zyklen wiederholt:

Denaturierung:	10 s bei 95°C
Annealing:	5 s bei 62°C
Elongation:	12 s bei 72°C

Abschließend wurde noch die Schmelzkurve (65°C für 20 Sekunden) erstellt. Die RT-PCR wurde durch die erfolgte Schmelzkurvenanalyse auf dem Bildschirm kontrolliert. Für die Überprüfung der gewünschten Produktgröße wurde ein 1%iges Agarosegel gegossen. Um sicher zu sein, ob die Ergebnisse stimmen, wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der dazugehörigen *Lightcycler Software* Version 3.39 (*LightCycler3Run*, Roche, Mannheim).

## 2.2.2 Histologische Methoden

### 2.2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Eosinlösung: 0,1% Eosin in 70%igem Ethanol

Nach Fixierung in 4% Paraformaldehyd in PBS für 20 Minuten wurden die Präparate dreimal in PBS gewaschen. Die Färbung durch Hämatoxylin erfolgte für fünf bis 20 Minuten (je nach Qualität der Färbelösung). Nach fünfminütigem Waschen und der Differenzierung unter fließendem Leitungswasser wurden die Präparate eine Minute lang mit Eosin gefärbt. Die so behandelten Präparate wurden in einer Alkoholreihe (70%igem, 90%igem und absolutem Ethanol) je eine Minute dehydriert, anschließend in Xylol überführt und mit Entellan und Deckgläsern eingedeckt.

### 2.2.2.2 May-Grünwald-Giemsa-Färbung (MGG)

Giemsa-Arbeitslösung: Giemsa-Stocklösung wurde 1:20 in Wasser verdünnt.

Luftgetrocknete Präparate wurden auf einer Färbebank für fünf Minuten mit May-Grünwald-Lösung beschichtet. Nach Zugabe der gleichen Menge Wasser (pH 7,2) wurden die Schnitte erneut für fünf Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal in Wasser gewaschen und für 15 Minuten mit Giemsa-Lösung behandelt. Nach erneutem Waschen erfolgte die Dehydrierung in einer Alkoholreihe. Die Präparate wurden mit Entellan und Deckgläsern eingedeckt.

### 2.2.2.3 Naphtol AS-D-Chlorazetatesterase-Färbung

4%-Pararosanilin-HCl (Sigma P 3750)	Stocklösung: 0,5 g auf 10 ml dH <sub>2</sub> O und 2,5 ml HCl <sub>conc</sub> unter Erwärmung lösen,
Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> ) (Roth 8604.1)	30% in dH <sub>2</sub> O frisch angesetzt
N-ASD-C (Naphtol-ASD-Chlorazetat)	Stocklösung: 1g N-ASD-C (Sigma N 0758) in 2 ml DiMethylFormamid

100 µl von 4%-Pararosanilin-HCl wurden mit ca. 100 µl von 30%igem Natriumnitrit (NaNO<sub>2</sub>) gemischt, bis sich die Lösung gelb färbte. Die fertige Lösung blieb etwa eine



Minute stehen. Dann wurde sie in eine ASD-Küvette geschüttet, mit 50 ml PBS aufgefüllt und gut gemischt. Anschließend wurde der pH auf etwa 6,3 mit einem halben Tropfen  $\text{HCl}_{\text{conc}}$  eingestellt und 50  $\mu\text{l}$  des N-ASD-C-Stocks in die Küvette gegeben, gut gemischt und filtriert. In dieser Lösung wurden die Schnitte sowie die Positiv-Kontrolle 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kerne wurden mit Hämalaun gegengefärbt. Nach dem Waschen und der Differenzierung in Wasser wurden die Schnitte mit aqua polymount (Polysciences, USA) eingedeckelt.

## 2.2.3 Immunhistochemische Methoden

### 2.2.3.1 *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*

Proteinlysispuffer:

Tris-HCl pH 7,4	100 mM
NaCl	100 mM
EDTA	5 mM
Triton X	1%
$\text{Na}_3\text{VO}_4$	1 mM

Vor Gebrauch eine Tablette *Complete Proteinase Inhibitor Cocktail* (Roche, Penzberg) in 50 ml des Puffers lösen.

Zur Quantifizierung von Zytokinen in der Haut wurden ELISA-Kits verwendet. Für die Gewebeextrakte wurde den Mäusen ein ca. 2  $\text{cm}^2$  großes, rasiertes Hautstück entnommen, das anschließend unter flüssigem Stickstoff zermörsert wurde. Das so entstandene Gewebepulver wurde in 4 ml Proteinlysispuffer aufgenommen. Die Proben wurden gut gemischt und bei 4°C für 30 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für den ELISA verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford (Bio-Rad, München) bestimmt. Der Nachweis von IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, GM-CSF und IFN- $\gamma$  mittels ELISA-Kits wurde entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 2.2.3.2 BrdU-Markierung proliferierender Zellen

Für die Markierung von S-Phase-Zellkernen während der Mitose wurde den Mäusen 30 µg BrdU (in PBS gelöst) pro Gramm Körpergewicht injiziert. Nach einer Stunde wurden die Tiere durch Genickbruch getötet. Aus den entnommenen - ca. 2 cm<sup>2</sup> großen - Hautstücken wurden 8 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden bei Raumtemperatur für 20 Minuten in 4% PFA (in PBS) fixiert und zweimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte fünf Minuten lang bei 37°C mit 1x Trypsin/EDTA behandelt. Es folgte wiederum eine fünfminütige Behandlung mit 4 M HCl bei Raumtemperatur und drei weitere Waschschrte in PBS.

Entsprechend des „*In Situ Cell Proliferation Kit, FLUOS*“ (Roche, Penzberg) wurde der Anti-BrdU-Antikörper verwendet. Die Inkubation der Schnitte mit dem Antikörper erfolgte für zwei Stunden bei 37°C bzw. über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Schnitte dreimal gewaschen. Danach wurden sie für eine weitere Stunde bei 37°C mit dem Zweitantikörper Rabbit-anti-FITC-AP (Dako Cytomation, Dänemark) inkubiert und nochmals gewaschen. Die Signaldetektion wurde mit *Fast Red* (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Anschließend wurden die Kerne mit Hämalaun gegengefärbt und die Schnitte mit Aqua Polymount eingedeckelt. Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der proliferierenden und der nicht proliferierenden Zellen in der Basalschicht der interfollikulären Epidermis ermittelt.

## **2.2.4 UV-B-Karzinogenese-Experimente**

### 2.2.4.1 Akute UV-B-Karzinogenese

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Bestrahlung etwa zehn Wochen alt. Sie wurden einmalig mit einer UV-B-Dosis von 30 kJ/m<sup>2</sup> behandelt. Dazu wurden sie mit Avertin anästhesiert, auf dem Rücken rasiert und für die Dauer der Bestrahlung auf den Bauch gelegt. Augen und Ohren wurden mit Papiertüchern abgedeckt.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurden die Tiere ebenfalls mit Avertin stark betäubt, um Blut durch Herzpunktion gewinnen zu können, das zur Serum- bzw. Plasmagewinnung benötigt wurde. Danach wurden die Tiere per Genickbruch getötet. Nachgewachsenes Fell wurde nochmals rasiert. Der Rücken wurde dann mit 70%igem

Ethanol gereinigt. Es wurden ungefähr 1 cm x 1 cm große Hautproben entnommen, auf einem Stück Alufolie gestreckt, mit Einbettungsmedium eingedeckt (Jung, Nussloch) und für Kryoschnitte sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Pro Zeitpunkt wurden jeweils sowohl drei bis vier männliche als auch drei bis vier weibliche Tiere analysiert.

Die restliche bestrahlte Haut wurde ebenfalls entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für weitere molekulare Analysen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Als Kontrolle diente die Haut nicht bestrahlter transgener bzw. Wildtyp-Mäuse.

#### 2.2.4.2 Chronische UV-B-Karzinogenese

Die Tiere waren zum Beginn des Bestrahlungsexperimentes etwa zehn Wochen alt. In regelmäßigen Abständen wurden ihre Rücken rasiert. Zunächst wurden sie vier Wochen lang dreimal pro Woche mit einer UV-B-Dosis von  $2,5 \text{ kJ/m}^2$ , dann weitere vier Wochen lang dreimal pro Woche mit einer UV-B-Dosis von  $5 \text{ kJ/m}^2$  und maximal bis zur 30. Woche ebenfalls dreimal pro Woche mit einer UV-B-Dosis von  $10 \text{ kJ/m}^2$  behandelt. Dabei wurde für jedes Tier die Anzahl der Papillome und Karzinome einmal pro Woche dokumentiert.

Die Tiere wurden durch eine Überdosis Avertin getötet, wenn sie Tumore auf den Ohren, Augen oder dem Rücken entwickelt hatten, spätestens jedoch nach der 30. Woche.

Die Tumore wurden in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde in Formalin fixiert und für Paraffinschnitte weiterbehandelt, die andere Hälfte wurde mit Eindeckmittel (Jung, Nussloch) bedeckt und in flüssigem Stickstoff für die Erstellung von Kryoschnitten schockgefroren.

Die restliche bestrahlte Haut wurde ebenfalls entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für weitere molekulare Analysen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Als Kontrolle diente die Haut nicht bestrahlter transgener bzw. Wildtyp-Mäuse.

Die Analyse der Papillome und Karzinome erfolgte durch Prof. Dr. Peter Schirmacher (Pathologisches Institut, Heidelberg).

## 2.2.5 Bioinformatische Methoden

### 2.2.5.1 Auswertung der *Microarray*-Daten

Die im Analyseprogramm erstellten Daten wurden anschließend in Microsoft-Excel-Tabellen (Excel 2000-9.0.2812, Microsoft) weiter verarbeitet. Die Normalisierung und Auswertung der Daten erfolgte mittels *Z Score Transformation* (Cheadle, 2003).

### 2.2.5.2 Auswertung der *Lightcycler*-Daten

Die mittels des Analyseprogramms erhaltenen *Fit points* entsprechen bei jeder Probe einer Zykluszahl, bei der ein willkürlich vorausgesetztes Fluoreszenzniveau (= Menge an doppelsträngiger DNA) erreicht wurde. Diese *Fit-point*-Werte wurden mit Excel 2000-9.0.2812 (Microsoft) weiter verarbeitet. Zur Normalisierung der Werte wurde HPRT als Haushaltsgen (HG) verwendet. Die relative Expression wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Relative Expression} = 2^{(\text{Wert HG-Wert bestimmtes Gen})} \times 1.000$$

### 2.2.5.3 Statistik

Statistische Signifikanzen wurden mit dem Student's t-Test berechnet. Werte von  $p < 0,1$  wurden als signifikant betrachtet.

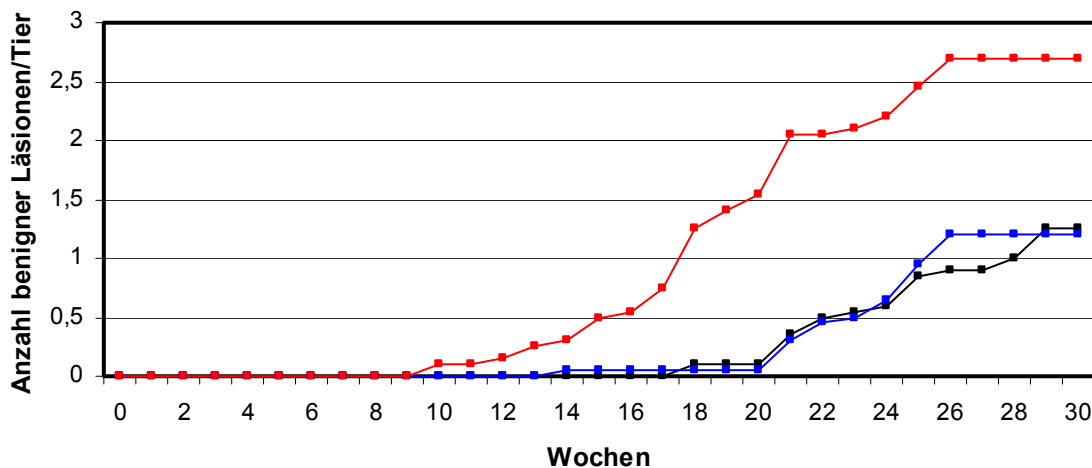
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Chronische UV-B-Karzinogenese

In der chemisch induzierten Hautkarzinogenese konnte gezeigt werden, dass sowohl Tiere mit einer erhöhten (K5/GM-CSF Ag) als auch Tiere mit einer verringerten (K10/GM-CSF Ant) GM-CSF-Aktivität in der Haut eine höhere Anzahl an Papillomen (benigne Tumore) nach einmaliger Initiation (Applikation des Karzinogens) und dauerhafter Promotion entwickelten. Wurde die Rückenhaut nur einmalig initiiert (ohne fortwährende Promotion), zeigten lediglich die Tiere mit erhöhter GM-CSF-Aktivität eine deutliche Zunahme der Karzinominzidenz (maligne Tumore) (Mann *et al.*, 2001b). In dem im Folgenden beschriebenen Experiment sollte die Wirkung einer erhöhten bzw. verringerten GM-CSF-Aktivität in der Haut während der durch UV-B induzierten Hautkarzinogenese genauer untersucht werden. Dazu wurden je zehn Weibchen und zehn Männchen der transgenen Mauslinien K10/GM-CSF Ant (Mann *et al.*, 2001b) und K5/GM-CSF Ag (Breuhahn *et al.*, 2000) sowie der Kontrollgruppe (Wildtypiere) chronisch bestrahlt: vier Wochen lang dreimal pro Woche mit einer UV-B-Dosis von  $2,5 \text{ kJ/m}^2$ , dann weitere vier Wochen dreimal pro Woche mit einer UV-B-Dosis von  $5 \text{ kJ/m}^2$  und anschließend bis maximal zur 30. Woche ebenfalls dreimal pro Woche mit einer UV-B-Dosis von  $10 \text{ kJ/m}^2$ . Entwickelten die Tiere Rücken-, Ohr- oder Augenkarcinome – spätestens jedoch nach 30 Wochen wurden sie getötet. Die Rückenhaut und/oder das betroffene Ohr wurden dann entnommen. Die Analyse der benignen Läsionen (Dysplasien und Papillome) und malignen Tumore (Karcinome) erfolgte durch Prof. Dr. Peter Schirmacher (Pathologisches Institut, Heidelberg). Für die Auswertung wurden nur die benignen Läsionen bzw. Karcinome des Rückens und/oder der Ohren berücksichtigt. Auf die Augenläsionen wurde nicht näher eingegangen. Im Rahmen der kumulativen Auswertung der Tumorexperimente wurde die zuletzt gezählte Menge der benignen Läsionen und der malignen Tumore (Karcinome) pro Tier fortgeführt und wie in den Abbildungen 3.1 und 3.2 zu jedem Zeitpunkt berücksichtigt.

### 3.1.1 Inzidenz der benignen Läsionen

Abbildung 3.1 zeigt die zeitliche Entwicklung der benignen Läsionen (Dysplasien und Papillome) auf der dorsalen Rückenhaut und den Ohren der Versuchstiere. Die Tiere mit erhöhter GM-CSF-Aktivität entwickelten vier Wochen vor den Tieren mit verminderter GM-CSF-Aktivität und acht Wochen vor der Kontrollgruppe Dysplasien und Papillome (Abb. 3.1: Kontrollgruppe: 18. Woche ■; K10/GM-CSF Ant: 14. Woche ■; K5/GM-CSF Ag: 10. Woche ■). Die Inzidenz der benignen Läsionen nahm sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei beiden transgenen Linien stetig zu. Die GM-CSF überexprimierenden Tiere entwickelten benigne Läsionen jedoch im Durchschnitt vier bis fünf Wochen früher als die Kontroll- und die Antagonistengruppe. Die Gesamtanzahl der benignen Läsionen war bei der Agonistengruppe bis zur 30. Woche mit 2,7 benignen Läsionen pro Tier im Vergleich zur Kontroll- (1,3 benignen Läsionen pro Tier) und Antagonistengruppe (1,2 benignen Läsionen pro Tier) mehr als doppelt so hoch. Obwohl die Antagonistengruppe vier Wochen vor der Kontrollgruppe erste benigne Läsionen aufwies, gab es zwischen diesen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied in der Gesamtanzahl der benignen Läsionen (Abb. 3.1).



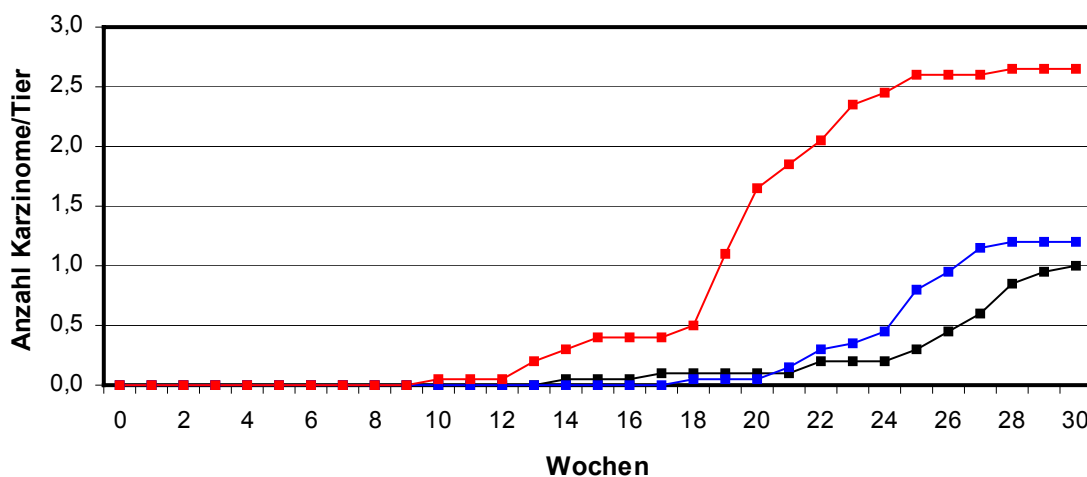
**Abb. 3.1: Chronische UV-B-Karzinogenese. Anzahl der benignen Läsionen pro Tier der Linien Keratin 10/GM-CSF Antagonist und Keratin 5/GM-CSF Agonist über 30 Wochen.** Sowohl die Antagonisten- (■) als auch Agonistengruppe (■) wurde jeweils mit der Kontrollgruppe (■) verglichen. Die Auswertung der Inzidenzen der benignen Läsionen erfolgte kumulativ, d.h., Werte von aus dem Versuch genommenen Tieren wurden rechnerisch weitergeführt. Die Kontrollgruppe entwickelte erste benigne Läsionen in der 18. Versuchswoche, die Antagonistengruppe in der 14. und die Agonistengruppe schon in der 10. Versuchswoche. Die Agonistengruppe (■) wies in der 30. Versuchswoche mehr als doppelt so viele benigne Läsionen auf wie die Antagonisten- (■) und Kontrollgruppe (■).

### 3.1.2 Karzinominzidenz

Im Gegensatz zur zeitlichen Entwicklung der benignen Läsionen entwickelte die Antagonistengruppe erst nach der Kontrollgruppe, die Agonistengruppe vor der Kontrollgruppe erste maligne Läsionen (Abb. 3.2: Kontrollgruppe: 14. Woche ■; K10/GM-CSF Ant: 18. Woche ■; K5/GM-CSF Ag: 10. Woche ■).

Bei der Kontrollgruppe (■) stieg die Karzinominzidenz bis zur 25. Bestrahlungswoche langsam auf 0,3 Karzinome pro Tier an. Ab der 25. Woche bis Versuchsende nahm die Karzinomzahl stark zu: um nochmals 0,7 Karzinome pro Tier.

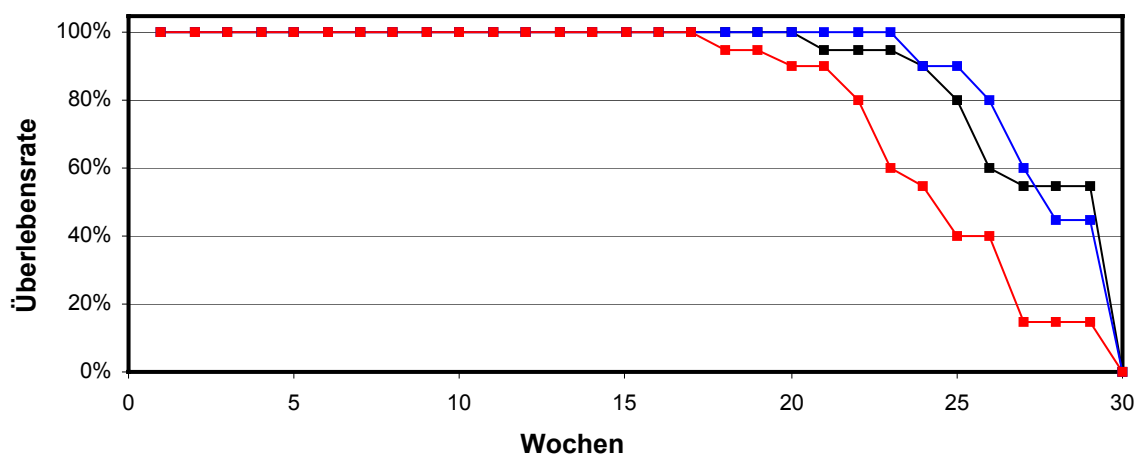
Die Antagonistengruppe (■) zeigte bis zur 24. Woche einen flachen Anstieg in der Karzinominzidenz (0,45 Karzinome pro Tier). Bis zum Versuchsende nahm die Karzinomanzahl um 0,85 Karzinome pro Tier zu und war damit im Vergleich zur Karzinomanzahl der Kontrollgruppe (1 Karzinom pro Tier) mit 1,2 Karzinomen pro Tier leicht erhöht.



**Abb. 3.2: Chronische UV-B-Karzinogenese. Anzahl der Karzinome pro Tier der Linien Keratin 10/GM-CSF Antagonist und Keratin 5/GM-CSF Agonist über 30 Wochen.** Sowohl die Antagonisten- (■) als auch die Agonistengruppe (■) wurden jeweils mit der Kontrollgruppe (■) verglichen. Die Auswertung der Karzinominzidenzen erfolgte kumulativ, d.h., Werte von aus dem Versuch genommenen Tieren wurden rechnerisch weitergeführt. Bei den Kontrolltieren traten die ersten Karzinome in der 14. Woche auf (■), bei der Antagonistengruppe in der 18. Woche (■) und bei der Agonistengruppe in der 10. Woche (■). Die Gesamtanzahl der Karzinome war - im Vergleich zur Kontroll- bzw. Antagonistengruppe - bei der Agonistengruppe um das 2- bis 3-fache erhöht.

Bis zur 18. Woche entwickelten sich bei der Agonistengruppe (■) 0,5 Karzinome pro Tier. Ein steiler Anstieg auf 2,6 Karzinome pro Tier konnte bis zur 25. Woche verzeichnet werden, bis zur 30. Woche flachte die Kurve ab. Gegen Ende des Experimentes hatten die

GM-CSF überexprimierenden Tiere 2-bis 3-mal so viele Karzinome (2,7 Karzinome pro Tier) wie die Kontrollgruppe (1 Karzinom pro Tier) und die Antagonistengruppe (1,2 Karzinome pro Tier). Das leichte Abflachen der Kurve (■) lässt sich mit der Höhe der Karzinominzidenz und dem schwächeren konstitutionellen Zustand der GM-CSF überexprimierenden Tiere erklären. Dies führte dazu, dass sie früher aus dem Versuch genommen werden mussten (Abb. 3.3 ■). Man kann demnach davon ausgehen, dass die gemessene Anzahl der benignen und malignen Läsionen bei der Agonistengruppe unter der tatsächlichen liegt. Im Gegensatz dazu führte eine Überexpression des Antagonisten und damit eine verringerte GM-CSF-Aktivität nicht nur zu einer verzögerten Karzinomentwicklung (Abb. 3.2 ■), sondern auch zu einem länger andauernden Erhalt des guten konstitutionellen Zustandes dieser Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3.3 ■).

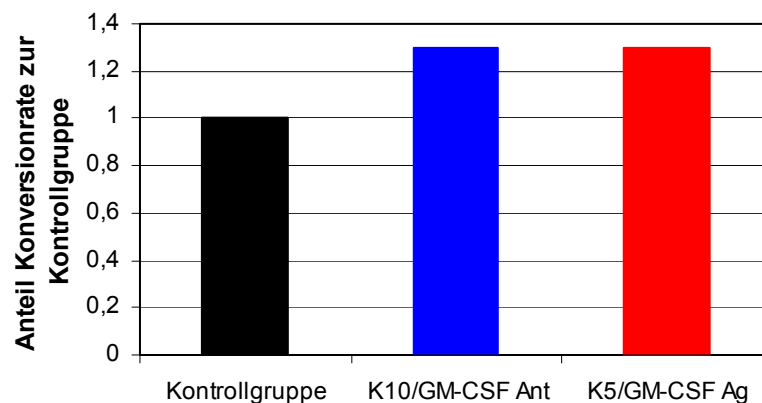


**Abb. 3.3: Chronische UV-B-Karzinogenese. Anzahl der transgenen und Kontrolltiere im Verlauf des Experimentes.** Es wurde die Überlebensrate der Tiere der Antagonisten- (■), Agonisten- (■) und der Kontrollgruppe (■) im Verlauf des Experimentes über 30 Wochen verglichen. Dabei wurde deutlich, dass die Tiere der Agonistengruppe früher der Schwere ihrer benignen und malignen Läsionen erlagen. Im Gegensatz dazu scheint eine Überexpression des Antagonisten und damit eine verringerte GM-CSF-Aktivität den konstitutionellen Zustand der Versuchstiere zu verbessern.



### 3.1.3 Konversionsraten der beiden transgenen Linien

Von beiden transgenen Linien wurde beispielhaft für die 30. Woche die Konversionsrate ermittelt, d.h. der Prozentsatz der Papillome auf dem Rücken und den Ohren, die sich zu Karzinomen entwickelt hatten. In Abbildung 3.4 ist die relative Konversionsrate dargestellt: Die Konversionsraten beider transgener Linien wurden im Vergleich zu der Kontrollgruppe dargestellt, deren Wert auf 1 gesetzt wurde.



**Abb. 3.4: Chronische UV-B-Karzinogenese. Relative Konversionsraten der Kontrollgruppe und transgenen Linien nach 30 Versuchswochen.** Die Konversionsraten der transgenen Linien Keratin 10/GM-CSF Antagonist (■) und Keratin 5/GM-CSF Agonist (■) wurden im Vergleich zu der Kontrollgruppe (■) dargestellt. Der für die Kontrollgruppe errechnete Wert wurde hierbei auf 1 gesetzt. Die Konversionsraten beider transgener Linien waren um das 1,3-fache erhöht.

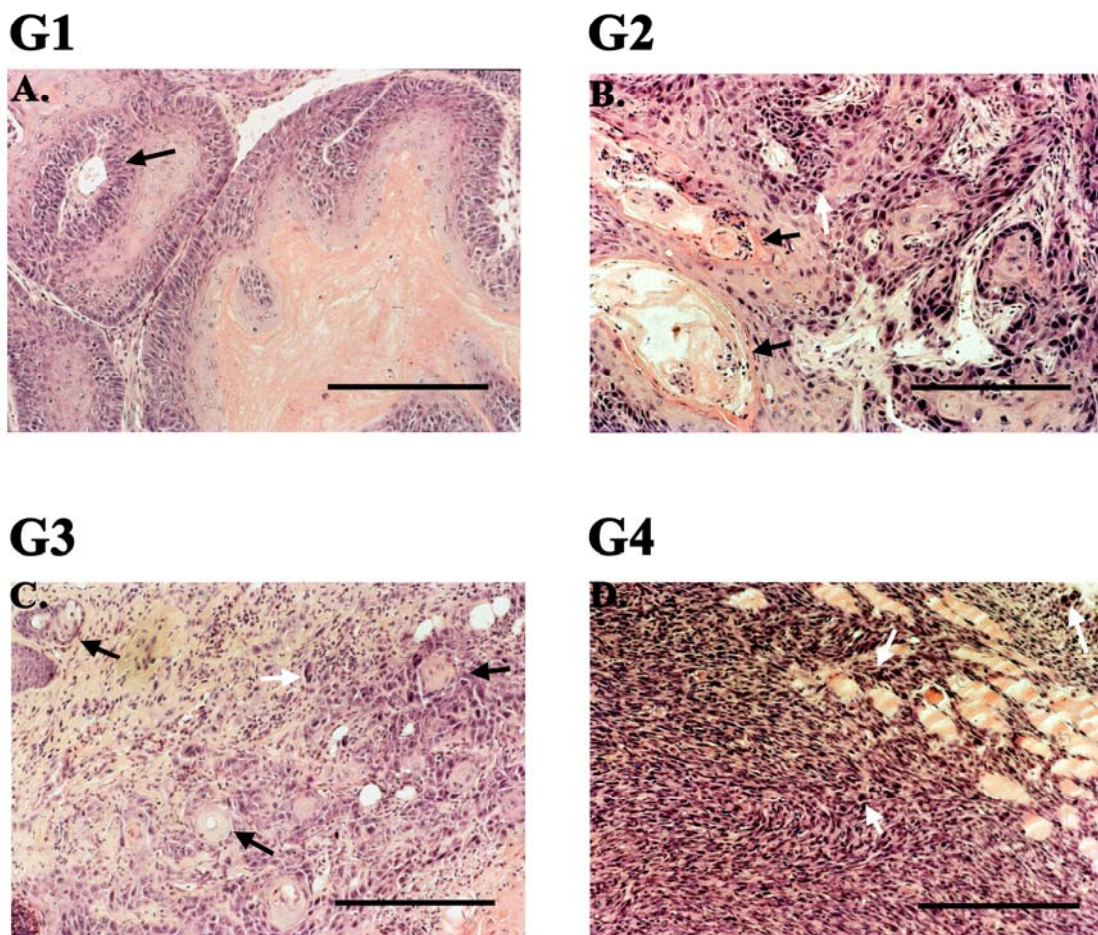
Die Abbildung 3.4 zeigt eine schwache Zunahme der relativen Konversionsrate um das 1,3-fache bei beiden transgenen Linien im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sowohl eine vermehrte als auch eine verringerte Aktivität von GM-CSF führt zu einer Erhöhung der Anzahl an benignen Läsionen, welche zu Karzinomen konvertieren. Bei beiden Gruppen konvertierten alle benignen Läsionen zu Karzinomen, bei der Kontrollgruppe taten dies nur etwa 77% der benignen Läsionen.

### 3.1.4 Klassifizierung der Plattenepithelkarzinome

UV-B-Strahlung kann sowohl Basaliome als auch Plattenepithelkarzinome verursachen. Während der chronischen UV-B-Karzinogenese konnten nur Plattenepithelkarzinome (SCC = *squamous cell carcinoma*) nachgewiesen werden. Diese wurden entsprechend ihrer Klassifizierung nach *Broders* eingeordnet. *Broder* unterscheidet Plattenepithelkarzinome folgendermaßen (Abb. 3.5):

*Grad 1 (G1)*: Gut differenzierte, vollständig keratinisierte Zellen; invasiv; *Keratin Pearls* (= Hornperlen) existieren. Geringe mitotische Aktivität (Anteil entdifferenzierter Tumorzellen < 25%).

*Grad 2 (G2)*: Invasive, mäßig differenzierte Tumorzellen (Anteil entdifferenzierter Tumorzellen < 50%).



**Abb. 3.5: Chronische UV-B-Karzinogenese. Graduierung der Plattenepithelkarzinome nach *Broders*.** Der *Broders*-Grad richtet sich nach dem prozentualen Anteil der entdifferenzierten Keratinozyten. Als Ausdifferenzierungszeichen gelten vor allem Einzelzelldyskeratosen (weiße Pfeile) und *Keratin Pearls* (schwarze Pfeile). Das G4-Stadium (D.) zeichnet sich durch einen großen Anteil nekrotischer Zellen aus. Balken = 100  $\mu$ m

*Grad 3 (G3):* Schlecht differenziert (Anteil entdifferenzierter Tumorzellen < 75%).

*Grad 4 (G4):* Wenig differenziert mit geringer Keratinisierung; oft lymphatische Invasion. Starke mitotische Aktivität und viele nekrotische Zellen. Oftmals entwickeln sich diese Plattenepithelkarzinome zu entdifferenzierten Spindelzellkarzinomen (Anteil entdifferenzierter Tumorzellen > 75%).

Die Graduierung wurde von Prof. Dr. Peter Schirmacher (Pathologisches Institut, Heidelberg) vorgenommen. Hierzu wurden Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbungen von allen entnommenen Karzinomen angefertigt und analysiert.

Tab. 3.1 zeigt die prozentuale Verteilung an malignen Tumoren in den verschiedenen Phasen der Entdifferenzierung. Die transgenen Linien wurden dabei mit den Wildtypen (= Kontrollgruppe) verglichen.

	<b>G 1</b>	<b>G 2</b>	<b>G 3</b>	<b>G 4</b>
<b>Kontrollgruppe</b> (n = 15)	0,0%	40%	13,4%	46,6%
<b>K10/GM-CSF Antagonist</b> (n = 19)	0,0%	15,8%	15,8%	68,4%
<b>K5/GM-CSF Agonist</b> (n = 25)	0,0%	41,6%	37,5%	20,9%

**Tab. 3.1: Chronische UV-B-Karzinogenese. Graduierung und Verteilung von Karzinomen aller untersuchten Versuchsgruppen.** Von jeder Gruppe wurden die Karzinome untersucht, die während der chronischen UV-B-Karzinogenese entstanden. Von der Kontrollgruppe wurden 15 Karzinome analysiert, von der Antagonistengruppe 19 und von der Agonistengruppe 25 Karzinome.

In der Kontrollgruppe war eine Verteilung der Karzinome auf die Differenzierungsstadien Grad 2 bis Grad 4 zu beobachten, schwerpunktmäßig (40% bzw. 46,6%) mit Karzinomen im G2- bzw. G4-Stadium: Karzinome, die vor allem aus mäßig differenzierten Tumorzellen bestanden (Grad 2), und solche, die einen geringen Differenzierungsgrad mit starker mitotischer Aktivität und vielen nekrotischen Zellen aufwiesen (Grad 4). Dagegen waren fast 70% aller untersuchten Karzinome der Antagonistengruppe G4-Plattenepithel-

karzinome mit mehr als 75% entdifferenzierten Tumorzellen. Bei der Agonistengruppe war eher eine Tendenz zu Karzinomen mittleren Differenzierungsgrades (41,6% G2- und 37,5% G3-Plattenepithelkarzinome) zu beobachten.

Alle analysierten Karzinome wurden den Tieren entnommen, die unter der Last dieser zu sterben drohten. Die Entwicklung der Neoplasien führte nicht zwangsläufig durch alle Stadien der Entdifferenzierung, bis das Versuchstier aus dem Experiment genommen werden musste. So konnten während der wöchentlichen Zählungen der Neoplasien Karzinome beobachtet werden, welche sofort das charakteristische Erscheinungsbild eines G4-Plattenepithelkarzinoms einnahmen (keine Verkrustung, stark invasiv). Andere Karzinome begannen mit geringem Entdifferenzierungsgrad (dicke, verhornende Kruste), um dann entweder invasiven Charakter anzunehmen oder aber als Karzinom mit geringem Entdifferenzierungsgrad zu verbleiben. Auffallend war, dass die den Antagonisten überexprimierenden Tiere vor allem G4-Karzinome entwickelten und diese für sie erst zu einem späteren Zeitpunkt letal waren. Dagegen waren für die GM-CSF überexprimierenden Tiere schon Karzinome mit einer geringeren Anzahl an entdifferenzierten Tumorzellen (G2) letal.

### **3.2 Akute UV-B-Karzinogenese**

In der chronischen UV-B-Karzinogenese (Kapitel 3.1) konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von GM-CSF zu einem früheren Auftreten und einer erhöhten Inzidenz an benignen Läsionen (Dysplasien und Papillome) und malignen Tumoren (Karzinome) führt. Außerdem werden die Tiere mit einer erhöhten GM-CSF-Aktivität in der Haut stärker durch die chronische UV-B-Strahlung geschwächt und erliegen so früher ihren malignen Läsionen. Dagegen verbessert eine verminderte GM-CSF-Aktivität in der Haut den konstitutionellen Zustand der Tiere nach UV-B-Bestrahlung. Dies hat jedoch keine signifikante Auswirkung auf die Gesamtanzahl der benignen Läsionen und führt lediglich zu einer leichten Erhöhung der malignen Tumore im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings reagiert die Haut dieser transgenen Tiere auf UV-B-Bestrahlung mit einer verzögerten Karzinomentwicklung. In dem im Folgenden beschriebenen akuten UV-B-Karzinogenese-Experiment sollten anhand verschiedener Untersuchungen auf der Gen-,

Protein- und Zellebene mögliche Ursachen für die promovierende Wirkung von GM-CSF auf die Entwicklung von benignen und malignen Läsionen nach UV-B-Bestrahlung gefunden werden.

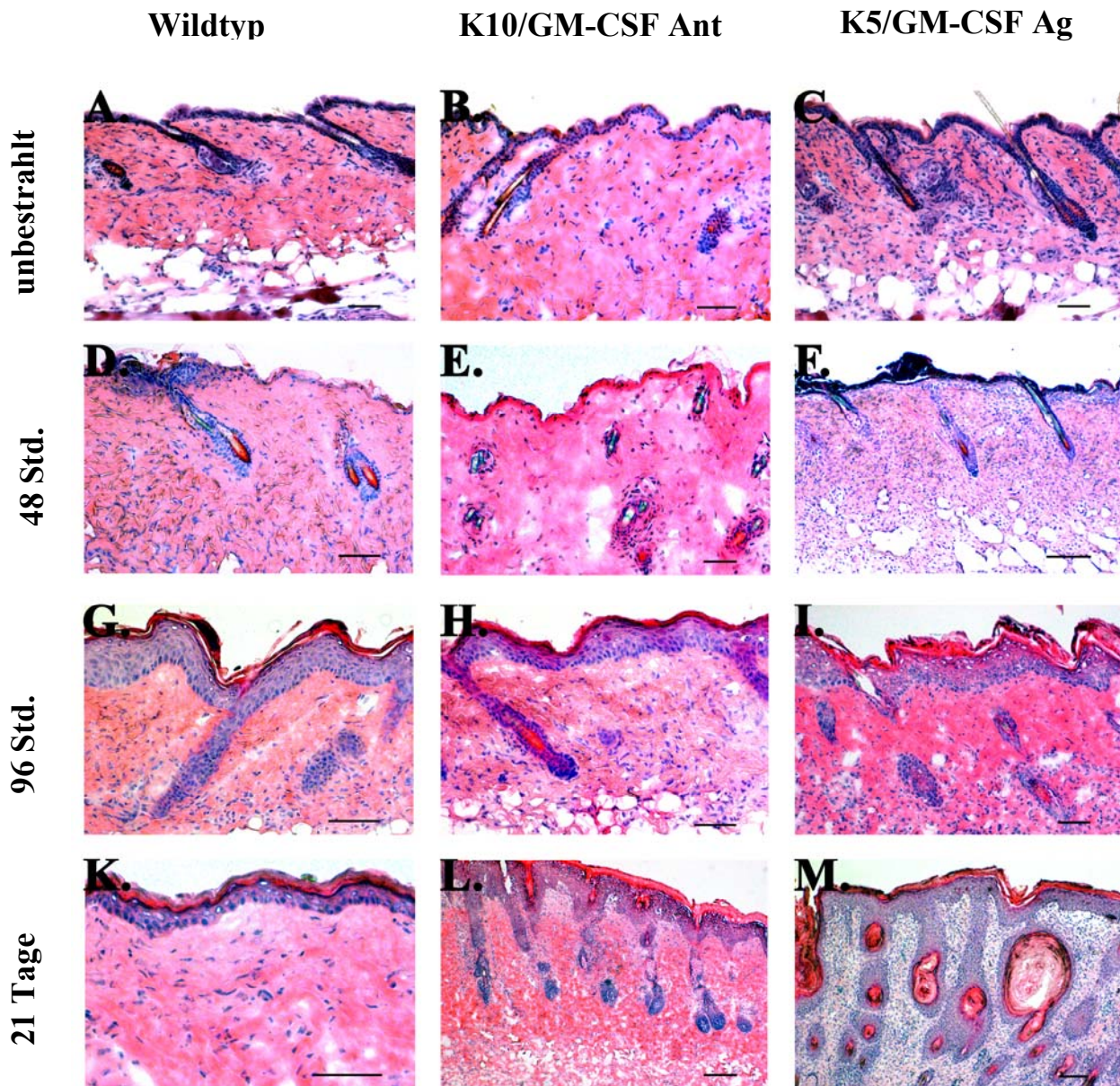
Pro transgener Mauslinie und Kontrollgruppe wurden je sechs Tiere einmalig mit UV-B bestrahlt ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ). Nach unterschiedlichen Zeiträumen wurden die Tiere getötet und es wurde dorsale Rückenhaut entnommen. Mittels histologischer Färbungen wurden Veränderungen in der Hautstruktur bzw. ihrer Zellularität als mögliche Reaktion auf Inflammation und Infiltration detektiert. Des Weiteren wurden die mitotischen Indizes in der Basalschicht der Epidermis durch BrdU-Markierung bestimmt. Anhand einer *Microarray*-Analyse wurden Zielgene von GM-CSF ermittelt, die möglicherweise bei der durch UV-B induzierten Hautkarzinogenese von Bedeutung sind. Die Verifizierung dieser Ergebnisse erfolgte zum einen durch *Real-Time*-PCR und zum anderen durch die Erstellung eines Zytokinprofils der Haut mittels ELISA vor und nach akuter Bestrahlung.

### **3.2.1. Histopathologie der Haut**

#### 3.2.1.1 Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Übereinstimmend mit schon veröffentlichten Daten (Breuhahn *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2001b) zeigte die unbestrahlte Haut von adulten, transgenen Tieren beider transgener Linien keine auffallenden Veränderungen in der Dicke der Epidermis im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 3.6 A.-C.). Ebenso waren keine Unterschiede in der Anzahl und der Morphologie der Haarfollikel zu erkennen. Allerdings wiesen die GM-CSF überexprimierenden Tiere eine erhöhte Zelldichte in der Epidermis und Dermis auf, resultierend aus einer größeren Anzahl an Langerhans-Zellen (LC), Mastzellen und Fibroblasten (Breuhahn *et al.*, 2000; Abb. 3.6 C.).

Innerhalb von 24 Stunden nach der UV-B-Bestrahlung konnte sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei beiden transgenen Linien eine Reduktion der Zellkerndichte in der Dermis und Epidermis, eine erhöhte Vaskularität und die Bildung von Ödemen festgestellt werden. Die Epidermisstruktur war bei allen drei Versuchsgruppen (Kontroll-, Antagonisten- und Agonistengruppe) weitestgehend zerstört (ohne Abb.).



**Abb. 3.6: Akute UV-B-Bestrahlung. Histologische Untersuchung von Präparaten unbestrahlter und bestrahlter Haut.** Mittels einer Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbung wurde die Architektur der Haut von unbestrahltem und bestrahltem Wildtyp (wt) und GM-CSF-transgenen Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung untersucht. Dargestellt sind die Hautpräparate von wt (linke Spalte), K10/GM-CSF Ant (mittlere Spalte) und K5/GM-CSF Ag (rechte Spalte) unbestrahlt (A.-C.), 48 Std. (D.-F.), 96 Std. (G.-I.), und 21 Tage (K.-M.) nach einer akuten UV-B-Bestrahlung ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ). Die unbestrahlte Haut der K5/GM-CSF Ag (C.) zeigte eine erhöhte Zelldichte in ihrer Dermis im Vergleich zu der Kontrollgruppe (A.) und den K10/GM-CSF Ant (B.). Nach 48 Std. war die Zellkerndichte in der Epidermis und Dermis der K10/GM-CSF Ant noch reduziert (E.). Das *Stratum corneum* der K5/GM-CSF Ag wies starke Entzündungsreaktionen einhergehend mit Faserinduktion auf (F.). Bis 96 Std. nach der Bestrahlung war bei allen Linien eine kontinuierliche Zunahme der Epidermisdicke zu beobachten (G.-I.). Das *Stratum corneum* der K5/GM-CSF Ag war stark ödematös und zerstört, mit Zellinfiltraten (I.). Nach drei Wochen war bei allen drei Versuchsgruppen eine Hyperplasie des *Stratum corneum* und *Stratum granulosum* zu beobachten. Die Epidermis zeigte chronisch fibröse Entzündungen (K.-M.). Die Epidermis der K5/GM-CSF Agonistengruppe wies zusätzlich noch breitflächige, coriale Entzündungen mit Faservermehrung, fokale Erosionen und zahlreiche epidermale Entzündungszellinfiltrationen auf (M.). Balken =  $100 \mu\text{m}$

Nach 48 Stunden wurde in der Dermis der Kontrollgruppe und der GM-CSF überexprimierenden Tiere im Gegensatz zu den Tieren der K10/GM-CSF Antagonistengruppe eine Zunahme der Zellkerndichte in der Dermis und Epidermis beobachtet. Auffallend waren die starken Entzündungsreaktionen einhergehend mit einer Faserinduktion und Hyperkeratose im *Stratum corneum* der K5/GM-CSF Agonistengruppe (Abb. 3.6 D.-F.).

Bis 96 Stunden nach der UV-B-Bestrahlung zeigten sowohl die Kontrollgruppe als auch beide transgenen Linien starke hyperplastische Veränderungen der Epidermis verbunden mit Hyperkeratose. Dabei war bei der Kontrollgruppe und den Tieren, die den Antagonisten überexprimieren, das *Stratum corneum* mäßig verdickt und intakt. Dagegen war das *Stratum corneum* der K5/GM-CSF Agonistengruppe im Vergleich zur restlichen Epidermis stark angeschwollen und wies in den meisten Fällen eine ödematöse, zerstörte Struktur mit Zellinfiltraten auf (Abb. 3.6 G.-I.).

Nach drei Wochen konnte bei allen drei Linien eine Epidermishyperplasie, hervorgerufen vor allem durch ein hyperplastisches *Stratum corneum* und *Stratum granulosum*, beobachtet werden. Vereinzelt zeigte die Epidermis der Kontrolltiere und der transgenen Antagonistenlinie fokale betonte, chronische fibröse Entzündungen. Die Epidermis der K5/GM-CSF Agonisten wies zusätzlich noch breitflächige, coriale Entzündungen mit Faservermehrung, fokale Erosionen und zahlreiche epidermale Entzündungszellinfiltrationen auf (Abb. 3.6 K.-M.).

#### 3.2.1.2 Proliferierende Zellen in der Epidermis

Weil davon auszugehen war, dass die hyperplastischen und hyperkeratotischen Veränderungen nach UV-B-Bestrahlung mit einer erhöhten Keratinozytenproliferation in der Epidermis einhergehen, wurde die Proliferationsrate in der Basalschicht der Epidermis vor und nach der UV-B-Bestrahlung bestimmt.

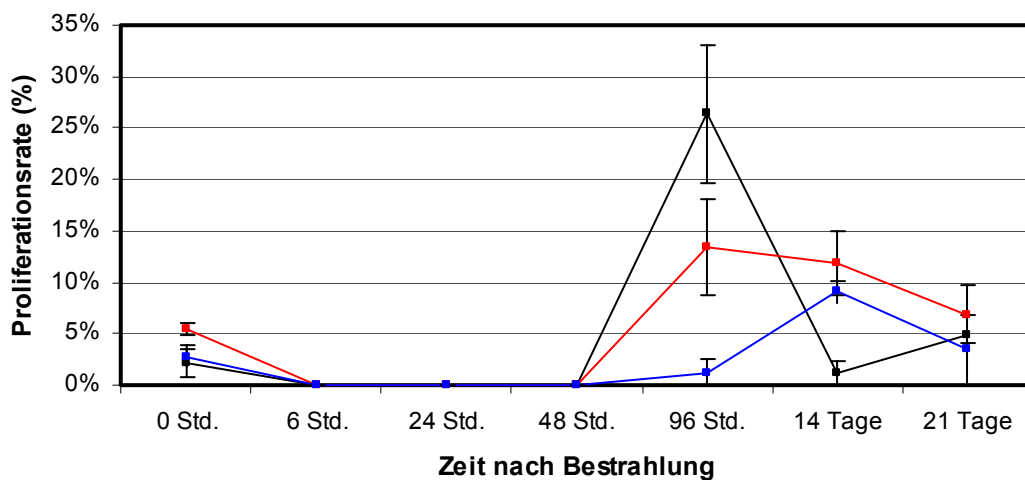
In früheren Studien konnte schon gezeigt werden, dass GM-CSF die Keratinozytenproliferation *in vitro* stimuliert (Hancock *et al.*, 1988; Kupper *et al.*, 1988) und dass GM-CSF zum Beispiel nach einer Verwundung hoch reguliert wird und so auch die Keratinozytenproliferation *in vivo* vorantreibt (Mann *et al.*, 2001a). Um den Effekt von GM-CSF auf die Keratinozytenproliferation nach akuter UV-B-Bestrahlung nachvollziehen zu können, wurde die Anzahl der S-Phase-Nuklei in der Basalschicht der

Epidermis durch BrdU-Markierung ermittelt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines anti-BrdU-Antikörpers.

Unbestrahlt wies die Proliferationsrate in der Epidermis der K10/GM-CSF Antagonistengruppe keinen signifikanten Unterschied zu der der Kontrollgruppe auf (Proliferationsrate der Kontrollgruppe:  $2,15\% \pm 0,32\%$ ). Dagegen konnte in der Epidermis der K5/GM-CSF Agonistengruppe eine bis zu dreifach erhöhte Proliferationsrate nachgewiesen werden (Mann *et al.*, 2001a; Breuhahn *et al.*, 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferationsrate in der Epidermis sechs Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 96 Stunden, 14 Tage und 21 Tage nach der UV-B-Bestrahlung bestimmt (Abb. 3.7). Konsistent mit den Ergebnissen aus den Hämatoxylin-Eosin-Färbungen war weder bei der Kontrollgruppe noch bei beiden transgenen Linien bis 48 Stunden nach der UV-B-Bestrahlung Proliferationsrate in der Basalschicht der Epidermis zu beobachten (Abb. 3.7). In der Epidermis der Kontrolltiere und der transgenen Agonistenlinie stieg bis 96 Stunden nach der UV-B-Bestrahlung die Anzahl der S-Phase-Nuklei auf einen Maximalwert, der sich nicht signifikant voneinander unterschied (Kontrollgruppe:  $24,61\% \pm 6,68\%$  ■; K5/GM-CSF Ag:  $13,38\% \pm 4,66\%$  ■; Abb. 3.7). Im Gegensatz zur Kontrollgruppe, die 96 Stunden nach Bestrahlung in der Basalschicht ihrer Epidermis lediglich einen Proliferations-*Peak* aufwies, war das Proliferationsmaximum in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere prolongiert (bis 14 Tage nach der Bestrahlung). Bei den Tieren mit verminderter GM-CSF-Aktivität fand eine maximale Proliferation zeitlich verzögert – und zwar 14 Tage nach Bestrahlung – statt und war im Vergleich zum Proliferations-*Peak* in der Epidermis der Kontrollgruppe niedriger (Kontrollgruppe: 96 Std.:  $24,61\% \pm 6,68\%$  ■; K10/GM-CSF Ant: 96 Std.:  $1,25\% \pm 1\%$ ; 14 Tage:  $9,04\% \pm 1,08\%$  ■). 14 Tage nach der Bestrahlung wurde in der Basalschicht der Epidermis von beiden transgenen Linien eine um das ungefähr zehnfache höhere Proliferationsrate im Vergleich zur Epidermis der Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt gemessen (Abb. 3.7). Die mitotischen Indizes der Kontrollgruppe und beider transgener Linien unterschieden sich nach drei Wochen nicht mehr von ihren jeweiligen Ausgangswerten.



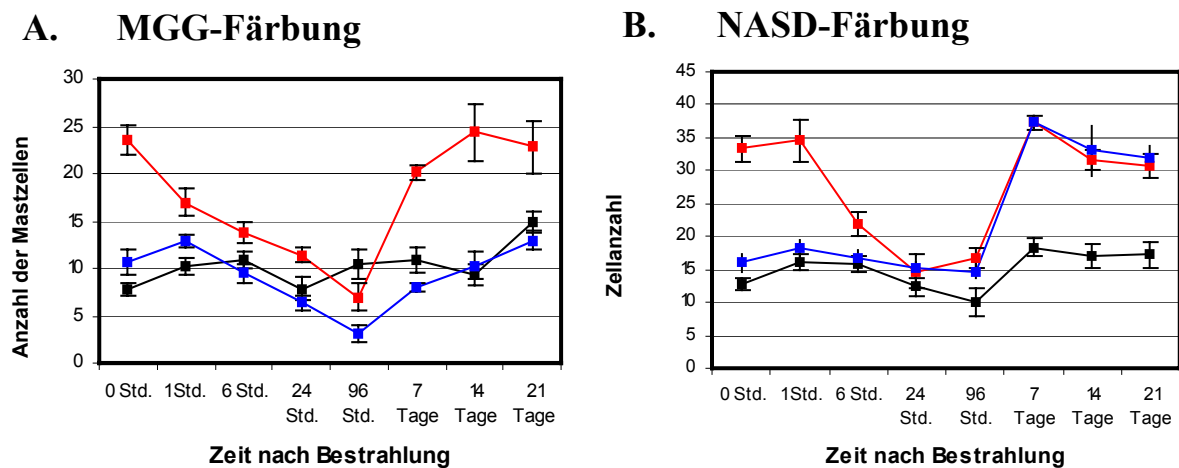


**Abb. 3.7 Mitotische Indizes in der Epidermis nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbehandelte Haut, sechs Std., 24 Std., 48 Std., 96 Std., 14 Tage und 21 Tage) nach akuter UV-B-Bestrahlung ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ) wurde Tieren der Kontroll-, der K10/GM-CSF Antagonisten- und der K5/GM-CSF Agonistengruppe Hautproben entnommen. Die Anzahl der S-Phase-Nuklei in der Basalschicht der Epidermis aller Gruppen wurde mithilfe eines anti-BrdU-Antikörpers detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Proliferationsrate mit der jeweiligen SEM in der Basalschicht der Epidermis der Kontrollgruppe (■), sowie der K10/GM-CSF Ant- (■) und K5/GM-CSF Ag- (■) transgenen Tiere. Zur Ermittlung der Mittelwerte wurden die Ergebnisse von je sechs Tieren verwendet. Die Anzahl der S-Phase-Nuklei in der Epidermis der K5/GM-CSF Ag war in der unbestrahlten Haut erhöht. Erst 96 Stunden nach Bestrahlung waren S-Phase-Nuklei in der Haut aller Tiere detektierbar. In der Epidermis der Kontrollgruppe (■) zeigte sich nach 96 Stunden eine Proliferationsspitze, in der Epidermis der K5/GM-CSF Ag-Linie (■) war die Proliferation prolongiert. Sie sank erst nach drei Wochen wieder auf den Basiswert. Die Proliferationsspitze in der Epidermis der K10/GM-CSF Antagonistengruppe zeigte sich verzögert nach 14 Tagen.

### 3.2.1.3 Infiltration von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten in die Dermis

Nach UV-B-Bestrahlung kommt es zu einer Immigration von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten in die Dermis. Diese sind bei der UV-B-induzierten Immunmodulation von Bedeutung (Hart *et al.*, 1977; 1998; Hawk *et al.*, 1988; Teunissen *et al.*, 2002). Aus diesem Grund wurde die Anzahl der Mastzellen mittels einer May-Grünwald-Giemsa (= MGG)-Färbung von Hautschnitten in der Dermis zu verschiedenen Zeitpunkten nach der akuten UV-B-Bestrahlung überprüft (Abb. 3.8 A.). Um Aussagen über das Immigrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten nach UV-B-Bestrahlung treffen zu können, wurde zu denselben Zeitpunkten eine Chlorazetat-Esterase (= NASD)-Färbung von Hautschnitten

angefertigt. Diese detektiert sowohl Mastzellen als auch neutrophile Granulozyten. Durch einen Vergleich mit der Mastzellfärbung kann eine mögliche Infiltration von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.8 B.).



**Abb. 3.8: Infiltration von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten in die Dermis nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbehandelte Haut, eine Std., sechs Std., 24 Std., 96 Std., sieben Tage, 14 Tage und 21 Tage) nach akuter UV-B-Bestrahlung ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ) wurde Tieren der Kontroll-, der K10/GM-CSF Antagonisten- und der K5/GM-CSF Agonistengruppe Proben der dorsalen Rückenhaut entnommen. Die Mastzellen in der Dermis wurden mit der MGG-Färbung (A.), neutrophile Granulozyten und Mastzellen mit der NASD-Färbung (B.) detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der (A.) Mastzellanzahl in der Dermis mit der jeweiligen SEM und (B.) der Granulozyten und Mastzellen in der Dermis mit der jeweiligen SEM von der Kontroll-(■), der K10/GM-CSF Ant-(■) und der K5/GM-CSF Ag-(■) Gruppe. Zur Ermittlung der Mittelwerte wurden die Ergebnisse von je sechs Tieren herangezogen. Die Infiltration von Mastzellen (A.) nach akuter Bestrahlung verlief in allen drei Gruppen biphasisch, also mit jeweils zwei *Peaks*, die bei den einzelnen Gruppen jedoch voneinander differierten. Die Kontrollgruppe zeigte Spitzen bei sechs Stunden und 21 Tagen nach Bestrahlung (■), die Antagonistengruppe bei einer Stunde und 21 Tagen (■) und die Agonistengruppe unbestrahlt und 14 Tage nach Bestrahlung (■). Die Infiltration von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten (B.) verlief bei der Kontrollgruppe und der Agonistengruppe ebenfalls biphasisch (Kontrollgruppe ■: prolongierte Maxima bei einer bis sechs Stunden und sieben bis 21 Tagen nach Bestrahlung; Agonistengruppe ■: prolongierte Maxima bis eine Stunde und sieben bis 21 Tage nach Bestrahlung, die Antagonistengruppe (■) zeigte ein andauerndes Maximum sieben bis 21 Tage nach Bestrahlung.

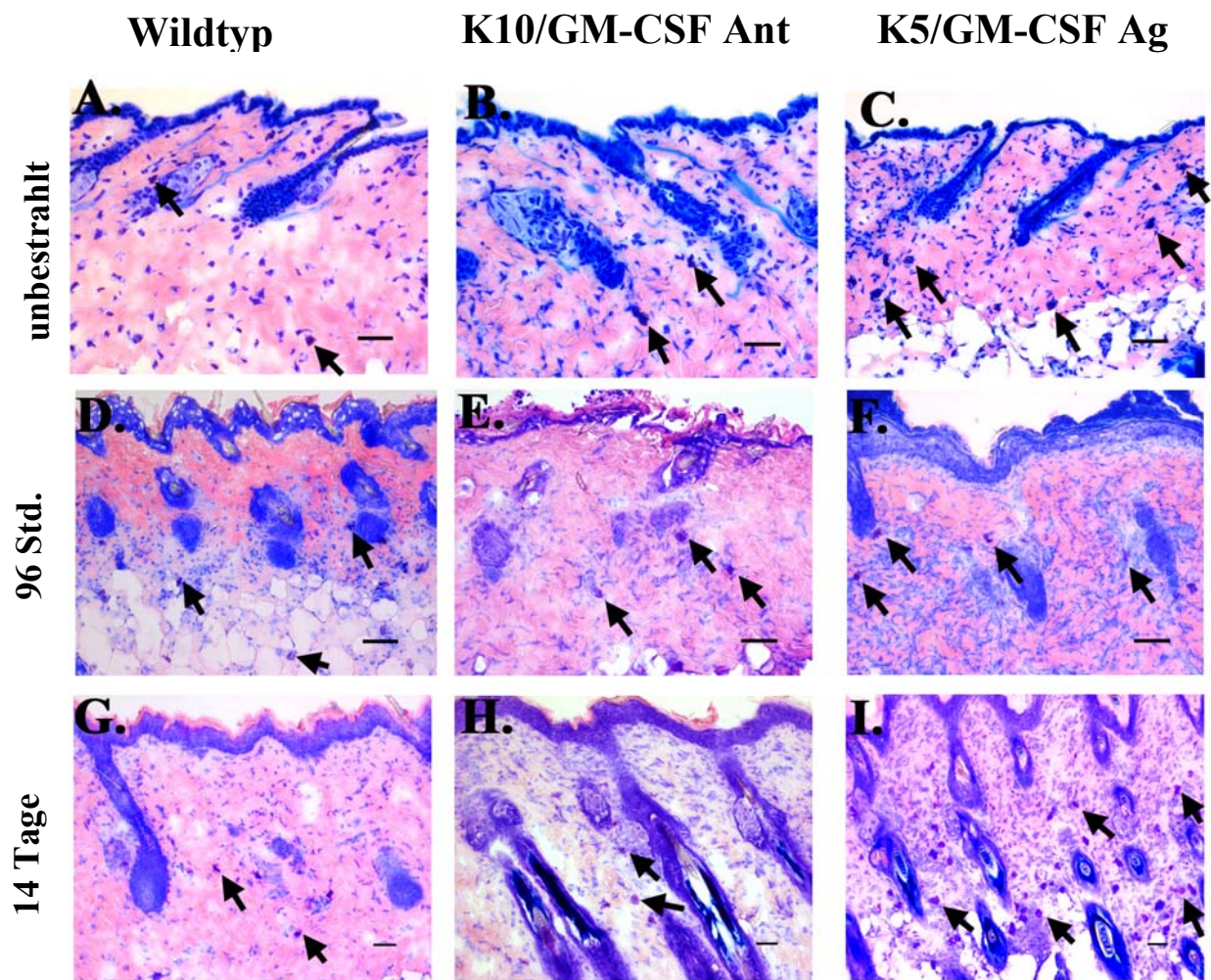
Die Infiltration von Mastzellen nach akuter Bestrahlung (Abb. 3.8 A.) verlief in allen drei Gruppen biphasisch, d.h. mit jeweils zwei Infiltrationsspitzen. Diese differierten jedoch sowohl in der Höhe als auch im Zeitpunkt bei den einzelnen Gruppen voneinander. Die Kontrollgruppe zeigte eine maximale Infiltration sechs Stunden und 21 Tage nach akuter UV-B-Bestrahlung (Abb. 3.8 A. ■), die Antagonistengruppe nach einer Stunde und nach

21 Tagen (Abb. 3.8 A. ■) und die Agonistengruppe im unbestrahlten Zustand und 14 Tage nach Bestrahlung (Abb. 3.8 A. ■). Übereinstimmend mit schon bestehenden Studien konnten in der unbestrahlten Dermis der GM-CSF überexprimierenden Mäuse ungefähr 2- bis 3-mal so viele Mastzellen wie in der Dermis der Kontrollgruppe und der den Antagonisten überexprimierenden Tieren gezeigt werden (Breuhahn *et al.*, 2000; Abb. 3.8 A.). Nach akuter UV-B-Bestrahlung war die Mastzellanzahl in der Dermis der GM-CSF überexprimierenden Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe zu jedem Zeitpunkt (Ausnahme 96 Stunden nach Bestrahlung) um das 1,5-bis 2-fache, im Vergleich zur Antagonistengruppe ungefähr um das 1,3-bis 2-fache erhöht.

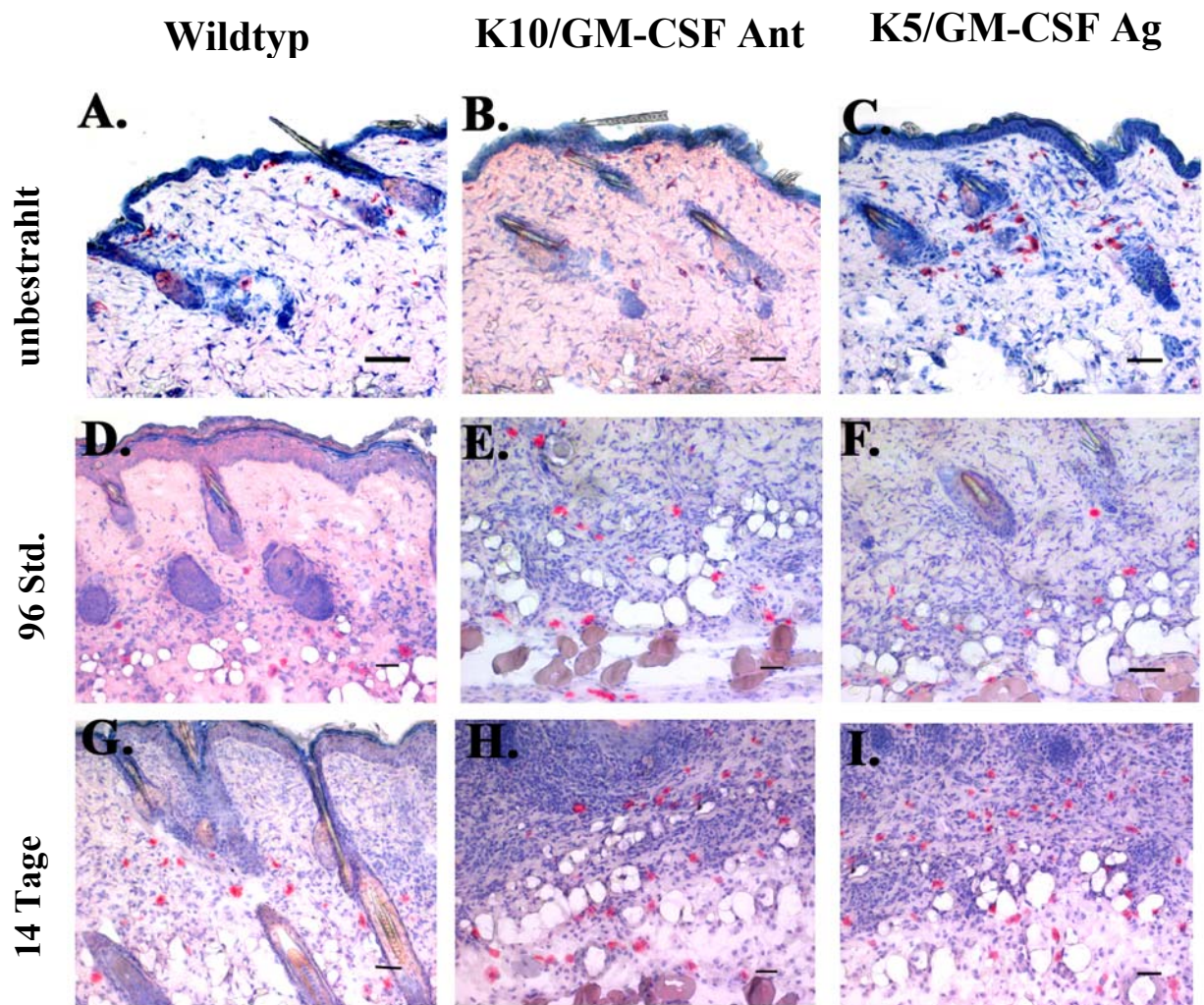
Die Mastzellanzahl in der Dermis der transgenen K10/GM-CSF Antagonist-Tiere betrug 96 Stunden nach der UV-B-Behandlung lediglich ein Drittel von der der Kontrolltiere ( $p < 0,001$ ). Zu allen übrigen Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen beobachtet werden (Abb. 3.8 A.; Abb. 3.9).

Die Infiltration von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten (Abb. 3.8 B.) verlief in der Dermis der Kontrollgruppe und der Agonistengruppe ebenfalls biphasisch: Die Kontrollgruppe (Abb. 3.8 B. ■) wies prolongierte Maxima bei ein bis sechs Stunden und sieben bis 21 Tagen nach Bestrahlung auf, die Agonistengruppe (Abb. 3.8 B. ■) zeigte prolongierte Maxima bis eine Stunde und sieben bis 21 Tage nach Bestrahlung. Die Infiltration der Mastzellen und neutrophilen Granulozyten war in der Dermis der Antagonistengruppe (Abb. 3.8 B. ■) sieben bis 21 Tage nach der Bestrahlung maximal.

Ein Vergleich des Immigrationsverhaltens von Mastzellen (Abb. 3.8 A.) sowie Mastzellen und neutrophilen Granulozyten (Abb. 3.8 B.) zusammen mit der Analyse von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Hautschnitten (durchgeführt von Prof. Dr. Peter Schirmacher; Institut für Pathologie, Heidelberg) zeigte in der Haut der Kontrollgruppe einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten sieben Tage nach der UV-B-Bestrahlung. Dagegen war die Anzahl der Neutrophilen in der Dermis der Agonistengruppe sowohl nach einer Stunde als auch nach sieben Tagen erhöht, in der Dermis der Antagonistengruppe stieg sie nach 96 Stunden nochmals um über das Doppelte. In beiden transgenen Linien konnte 24 bis 96 Stunden nach der akuten UV-B-Bestrahlung eine mäßige granulocytäre Entzündungs-infiltration mit beginnenden epithelialen granulocytären Infiltrationen festgestellt werden.



**Abb. 3.9: Histologische Untersuchung von Präparaten unbestrahlter und bestrahlter Haut zur Ermittlung der Mastzellanzahl.** Mittels einer May-Grünwald-Giemsa (MGG)-Färbung wurde die Mastzellanzahl in der Dermis im unbestrahlten Zustand (A.-C.), 96 Stunden (D.-F.) und 14 Tage (G.-I.) nach Bestrahlung detektiert. Die Mastzellen (schwarze Pfeile weisen exemplarisch auf einige Mastzellen hin) waren in der unbestrahlten Haut der K5/GM-CSF Agonist-Tiere (B.) um das 2-bis 3-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe (A.) und den K10/GM-CSF Antagonist Tieren erhöht. 96 Stunden nach Bestrahlung waren in der Dermis der K10/GM-CSF Antagonisten (E.) signifikant weniger Mastzellen vorhanden, im Vergleich zur Kontrollgruppe und den K5/GM-CSF Agonisten (D.-F.). Bis 14 Tage nach Bestrahlung kam es bei den K5/GM-CSF Agonisten wieder zu einer 2-bis 3-mal so hohen Mastzellinfiltration (I.) wie bei der Kontrollgruppe und den K10/GM-CSF Antagonisten (G.+H.). Balken = 100  $\mu$ m



**Abb. 3.10: Histologische Untersuchung von Präparaten unbestrahlter und bestrahlter Haut zur Ermittlung der Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen.** Mittels einer Chlorazetat-Esterase (NASD)-Färbung wurde die Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen (rot gefärbte Zellen) in der Dermis im unbestrahlten Zustand (A.-C.), 96 Stunden (D.-F.) und 14 Tage (G.-I.) nach Bestrahlung detektiert. Die gefärbten Zellen waren in der unbestrahlten Haut der K5/GM-CSF Agonist-Tiere (B.) um das 2-bis 3-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe (A.) und den K10/GM-CSF Antagonist-Tieren erhöht. 96 Stunden nach Bestrahlung waren in der Dermis der K10/GM-CSF Antagonisten und der K5/GM-CSF Agonisten (E.+F.) signifikant mehr rot gefärbte Zellen vorhanden, im Vergleich zur Kontrollgruppe (D.). Bis 14 Tage nach Bestrahlung kam es bei beiden transgenen Linien zu einer 2-bis 3-mal so hohen Infiltration roter Zellen (H.+I.) wie bei der Kontrollgruppe (G.). Balken = 100  $\mu$ m

### 3.2.2 Charakterisierung der beiden GM-CSF-transgenen Mausmodelle mittels *low-density-cDNA-Microarray*

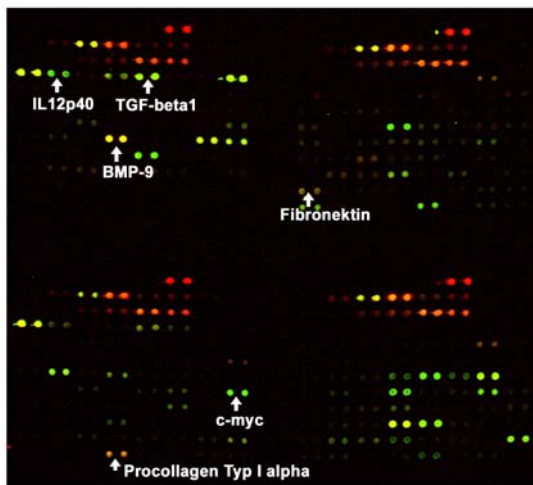
Um Zielgene von GM-CSF identifizieren zu können, wurde ein Expressionsprofil der Haut der transgenen Mausmodelle Keratin 10/GM-CSF Antagonist (Mann *et al.*, 2001b) und Keratin 5/GM-CSF Agonist (Breuhahn *et al.*, 2000) erstellt. Dies erfolgte mit Hilfe eines *low-density-cDNA-Microarrays*, der ausgewählte cDNA-Sonden folgender Gruppen von Zielgenen enthielt (eine Auflistung aller Gene befindet sich im Anhang, S.122):

1. Zelladhäsion und -mobilität
2. Zellzyklus, Apoptose und Differenzierung
3. DNA-Bindeproteine und Transkriptionsfaktoren
4. DNA *damage response*, Reparatur und Rekombination
5. Wachstumsfaktoren und Zytokine sowie Komponenten der Signaltransduktionskaskaden
6. Onkogene und Tumorsuppressorgene
7. *Stress-response-Gene*
8. Haushaltsgene

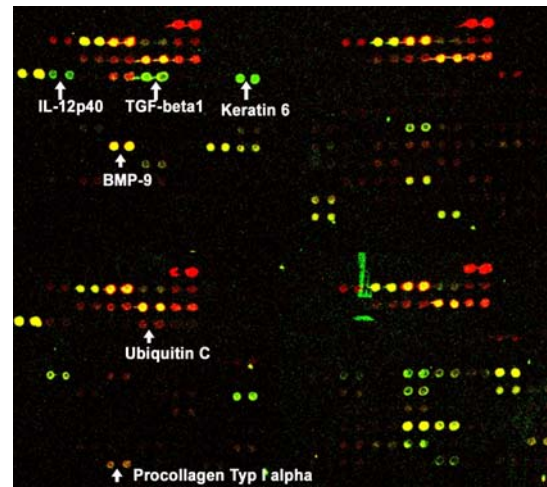
Die cDNA-Sonden waren entweder schon in der Arbeitsgruppe als PCR-Fragmente verfügbar oder es wurden von der Firma GENterprise (Mainz) Sonden geeigneter cDNA-Bereiche generiert.

Jeder Chip war mit einer unterschiedlichen Haut-cDNA sowohl von der transgenen Mauslinie als auch dem Wildtyp hybridisiert (Abb. 3.11). Die Haut war nicht behandelt. Die Auswertung erfolgte per *z Score*-Transformation (Cheadle, 2003). Die erhaltenen *Z-Ratios* geben an, ob die Gene eine Hochregulation (Werte  $\geq 1,5$ ) oder Herunterregulation (Werte  $\leq -1,5$ ) in ihrer Expression im Vergleich zum Wildtyp zeigen (Tab. 3.2). Die *Microarray*-Analyse der transgenen Mauslinie Keratin 10/GM-CSF Antagonist zeigte eine Erhöhung der Expression der Gene *c-myc*, *IL-12p40* und *TGF- $\beta$ 1*. Dagegen war die Expression von *BMP-9*, *Prokollagen I  $\alpha$  1*, *Fibronektin* und *Ubiquitin C* im Verhältnis zum Wildtyp verringert (Abb. 3.11 A.). Die *Microarray*-Analyse der transgenen Mauslinie Keratin 5/GM-CSF Agonist zeigte eine erhöhte Expression von *IL-12p40*, *Keratin 6* und *TGF- $\beta$ 1* und eine niedrige Expression von *BMP-9*, *Prokollagen I  $\alpha$  1* und *Ubiquitin C* im Verhältnis zum Wildtyp (Abb. 3.11 B.).

## A. K10/GM-CSF Ant



## B. K5/GM-CSF Ag



**Abb. 3.11: cDNA *Microarray*-Analyse.** Die cDNA aus der unbehandelten Haut der Kontrollgruppe (Wildtyp) war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 (rot), die der GM-CSF-transgenen Tiere mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (grün) markiert. Die mit dem Pfeil markierten *Spots* zeigen die cDNA von regulierten Genen bei (A.) der Antagonisten- und (B.) der Agonistengruppe.

Genname	Z-Ratio	
	K10/GM-CSF Antagonist	K5/GM-CSF Agonist
<i>BMP-9</i>	$-3,07 \pm 1,08$	$-3,34 \pm 1,35$
<i>Prokollagen I <math>\alpha</math> 1</i>	$-2,76 \pm 0,65$	$-2,57 \pm 1,19$
<i>Fibronectin</i>	$-1,91 \pm 0,14$	0
<i>c-myc</i>	$+1,63 \pm 0,07$	0
<i>Keratin 6</i>	0	$+2,45 \pm 0,96$
<i>Ubiquitin C</i>	$-2,14 \pm 0,87$	$-2,03 \pm 0,72$
<i>IL-12p40</i>	$+2,51 \pm 0,4$	$+1,93 \pm 0,31$
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	$+2,45 \pm 0,83$	$+2,21 \pm 1,66$

**Tab. 3.2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den cDNA-*Microarray*-Analysen.** Gene, die bei den cDNA-*Microarray*-Analysen für die transgene K10/GM-CSF Antagonistenlinie und die K5/GM-CSF Agonistenlinie eine Hochregulierung (+), eine Herunterregulierung (-) oder gar keine Veränderung (0) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ergaben.

### 3.2.3 Verifizierung mit der *Real-Time-PCR* (RT-PCR)

Im *Lightcycler* wurden mittels *Real-Time-PCR* (RT-PCR) die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse überprüft. Es wurde die RNA aus der Haut von je drei Tieren pro Linie untersucht. Zur Kontrolle der RT-PCR dienten die im *Lightcycler*-Programm erstellten Schmelzkurven. Zusätzlich wurde mittels eines 1%igen Agarosegels überprüft, ob ausschließlich das gewünschte Produkt synthetisiert wurde. Die nach der Normalisierung mit dem Haushaltsgen (HG) HPRT errechneten Werte für die relative Expression bzw. deren Mittelwerte wurden zur Berechnung der Expressionsänderung genutzt (Tab. 3.3). Es ergab sich eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den *Microarray*-Daten bei den drei Genen *BMP-9*, *TGF- $\beta$ 1* und *Keratin 6*. Demnach wird *BMP-9* in beiden transgenen Linien herunterreguliert - bei der K5/GM-CSF Agonistenlinie fast doppelt so stark wie bei der K10/GM-CSF Antagonistenlinie. *TGF- $\beta$ 1* zeigte bei beiden Linien eine Hochregulation um das Doppelte. Für *Keratin 6* wurde eine Hochregulation um das ungefähr 3-fache bei der Agonistengruppe festgestellt. Für die Gene *Prokollagen I  $\alpha$  1*, *Fibronektin*, *c-myc*, *Ubiquitin C* und *IL-12p40* konnten die Ergebnisse aus der *Microarray*-Analyse jedoch nicht durch die *Lightcycler*-Analyse bestätigt werden.

<b>Genname</b>	<b>K10/GM-CSF Antagonist</b>	<b>K5/GM-CSF Agonist</b>
<i>BMP-9</i>	-2,45 $\pm$ 0,1	-4,14 $\pm$ 0,03
<i>Keratin 6</i>	0	+3,02 $\pm$ 0,95
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	+2,07 $\pm$ 0,32	+1,99 $\pm$ 0,34

**Tab. 3.3: Darstellung der Ergebnisse aus der *Lightcycler*-Analyse.** Es wurden die Expressionsänderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren aus den relativen Expressionswerten errechnet. Pluswerte (+) zeigen eine Hochregulation, Minuswerte (-) eine Herunterregulation, Nullwerte (0) keine Veränderung an.



### 3.2.4 Zytokine in der Haut

Mit der Untersuchung des Zytokinprofils der Haut vor und nach der UV-B-Bestrahlung wurden zu einem Ergebnis aus der *Microarray*-Analyse verifiziert, zum anderen sollte geklärt werden, inwiefern GM-CSF die immunsuppressive Wirkung von UV-B moduliert. Zu diesem Zweck wurde mittels ELISA zunächst der Konzentrationsverlauf von GM-CSF in der Haut vor und nach der UV-B-Bestrahlung bestimmt. Des Weiteren wurden verschiedene Zytokine untersucht, die eine Immunsuppression fördern bzw. inhibieren. Die ELISAs wurden mit Proteinextrakten der unbestrahlten und der zu verschiedenen Zeitpunkten mit UV-B bestrahlten dorsalen Rückenhaut durchgeführt.

#### 3.2.4.1 Konzentration von GM-CSF bzw. dem GM-CSF-Antagonisten

##### in der Haut nach UV-B-Bestrahlung

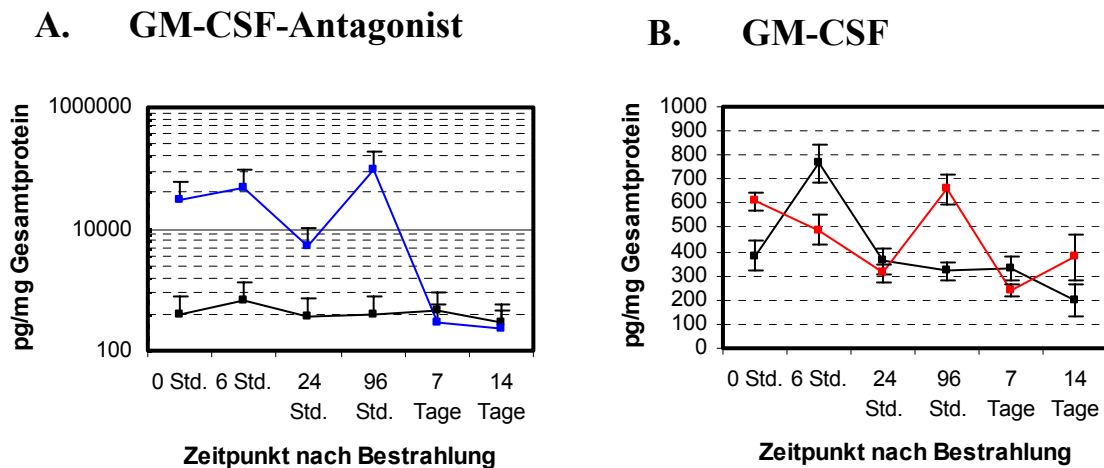
Die GM-CSF- bzw. die GM-CSF-Antagonisten-Konzentration in der unbestrahlten Haut beider transgenen Linien war im Vergleich zu der GM-CSF-Konzentration in der Haut der Kontrollgruppe erhöht (Abb. 3.12 A.+B.). Bei den Antagonisten konnte eine über 1.000-fache Konzentrationserhöhung des GM-CSF-Antagonisten festgestellt werden (29,5 ng/mg  $\pm$  4,7 ng/mg Gesamtprotein;  $p < 0,01$ ; Abb. 3.12 A. ■).

Der GM-CSF-Antagonist ist eine Doppelmutante von GM-CSF, die an den Aminosäurepositionen 14 und 21 Substitutionen aufweist. Das positiv geladene Lysin wird an Position 14 gegen die negativ geladene Glutaminsäure (K14E) und die Glutaminsäure an Position 21 gegen Lysin (E21K) eingetauscht. Die Doppelmutante (K14E; E21K) hat mehr als 90% der ursprünglichen Fähigkeit verloren, den GM-CSF-Rezeptorkomplex zu aktivieren (Altmann und Kastelein, 1995). *In vitro*- und *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass ein 1.000-facher Überschuss dieses Antagonisten die Wirkung von GM-CSF kompetitiert (Altmann und Kastelein, 1995; Mann *et al.*, 2001b).

Bei der Agonistengruppe konnte eine Erhöhung von GM-CSF um das ca. 1,5-fache in der unbestrahlten Haut festgestellt werden (609 pg/mg  $\pm$  36 pg/mg Gesamtprotein; Kontrollgruppe: 382 pg/mg  $\pm$  61 pg/mg Gesamtprotein;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.12 B. ■). Diese Ergebnisse decken sich mit bereits vorliegenden Daten (Breuhahn *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2001b).

Die GM-CSF-Konzentration in der Haut der Kontrollgruppe wies sechs Stunden nach der UV-B-Behandlung ein Maximum auf ( $795 \text{ pg/mg} \pm 93 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein;  $p < 0,05$ ), danach sank sie wieder auf ihren Ausgangswert (Abb. 3.12 A.+B. ■).

Die GM-CSF-Antagonisten-Konzentration sank bis 24 Stunden nach der UV-B-Bestrahlung (24 Std.:  $5 \text{ ng/mg} \pm 0,59 \text{ ng/mg}$  Gesamtprotein;  $p < 0,01$ ), entwickelte aber dann 96 Stunden nach der UV-B-Behandlung eine weitere Konzentrationsspitze ( $96 \text{ ng/mg} \pm 29 \text{ ng/mg}$ ;  $p < 0,05$ ). Sieben Tage nach der Behandlung unterschied sich die Antagonisten-Konzentration jedoch nicht mehr von der GM-CSF-Konzentration in der Haut der Kontrollgruppe ( $290 \text{ pg/mg} \pm 49 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.12 A. ■).



**Abb. 3.12: Konzentrationsbestimmung von GM-CSF bzw. des GM-CSF-Antagonisten in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbestrahlte Haut, nach sechs Stunden, 24 Stunden, 96 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen) wurde Tieren der Kontrollgruppe und der transgenen Linien K10/GM-CSF Ant und K5/GM-CSF Ag nach akuter UV-B-Bestrahlung ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ) Hautproben entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte der GM-CSF-Konzentration mit der jeweiligen SEM aus Proteinextrakten der Haut von (A.) K10/GM-CSF Ant-Tieren (■) und Tieren der Kontrollgruppe (■) und (B.) K5/GM-CSF Ag-Tieren (■) und Tieren der Kontrollgruppe (■). Es wurden jeweils die Proteinextrakte von sechs Tieren mittels ELISA analysiert. Die Kontrollgruppe (■) zeigte nach sechs Stunden eine maximale GM-CSF-Konzentration in der Haut (A.+B.). Die unbestrahlte Haut der Antagonistengruppe wies eine über 1.000-fache Erhöhung des Antagonisten im Vergleich zur GM-CSF-Konzentration der Kontrollgruppe auf (A.). Ein zweiter *Peak* der Antagonisten-Konzentration war nach 96 Stunden zu erkennen. Nach sieben Tagen unterschied sie sich nicht mehr von der GM-CSF-Konzentration in der Haut der Kontrollgruppe (A. ■). Die GM-CSF-Konzentration in der unbestrahlten Haut der Agonistengruppe war um das 1,5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht, sie sank nach 24 Stunden und hatte einen zweiten *Peak* 96 Stunden nach der Bestrahlung. Im Vergleich zu der GM-CSF-Konzentration in der Haut der Kontrollgruppe war sie nach 24 Stunden um 40% niedriger und nach 96 Stunden um das Doppelte erhöht (B. ■).

In der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere alternierte die GM-CSF-Konzentration nach Bestrahlung zwischen einem Minimal- (24 Std.: 312 pg/mg  $\pm$  36 pg/mg Gesamtprotein;  $p < 0,01$ ; 7 Tage: 240 pg/mg  $\pm$  28 pg/mg Gesamtprotein;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.12 B. ■) und ihrem Ausgangswert (96 Std.: 658 pg/mg  $\pm$  62 pg/mg Gesamtprotein). Somit war die GM-CSF-Konzentration in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere nach sechs Stunden etwa 40% niedriger als die der Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt (Kontrollgruppe: 766 pg/mg  $\pm$  94 pg/mg Gesamtprotein ■; K5/GM-CSF Ag: 490 pg/mg  $\pm$  79 pg/mg Gesamtprotein ■;  $p < 0,1$ ). Nach 96 Stunden war die GM-CSF-Konzentration in ihrer Haut jedoch etwa doppelt so hoch wie die der Kontrollgruppe (Kontrollgruppe: 320 pg/mg  $\pm$  59 pg/mg Gesamtprotein ■; K5/GM-CSF Ag: 658 pg/mg  $\pm$  77 pg/mg Gesamtprotein ■;  $p < 0,01$ ; Abb. 3.12 B.).

#### 3.2.4.2 Konzentration von IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-4 und IL-6

##### in der Haut nach UV-B-Bestrahlung

###### *IL-10-Konzentration*

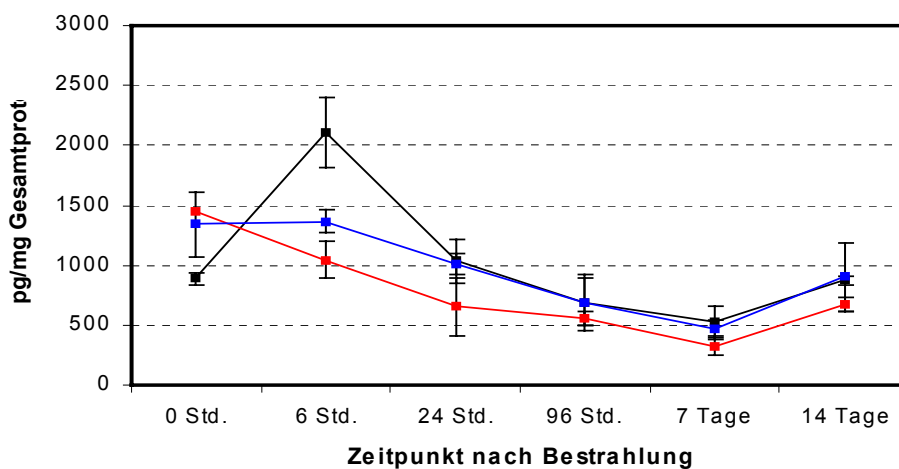
Die IL-10-Konzentration in der unbestrahlten Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere (1,4 ng/mg  $\pm$  0,18 ng/mg Gesamtprotein ■) war im Vergleich zur Kontrollgruppe (887 pg/mg  $\pm$  66,04 pg/mg Gesamtprotein ■) um das ca. 1,6-fache erhöht ( $p < 0,1$ ; Abb. 3.13). Die Tiere mit verringerter GM-CSF-Aktivität zeigten keinen signifikanten Unterschied zur IL-10-Konzentration in der unbestrahlten Haut der Kontroll- und der Agonistengruppe (Abb. 3.13).

In der Haut der Kontrollgruppe konnte sechs Stunden nach der Bestrahlung eine auf das 2,3 fache angestiegene, maximale IL-10-Konzentration detektiert werden (2,1 ng/mg  $\pm$  298 pg/mg Gesamtprotein;  $p < 0,05$ ). Danach nahm sie stetig bis sieben Tage nach der Bestrahlung ab (529 pg/mg  $\pm$  123 pg/mg;  $p < 0,01$ ) und stieg nach 14 Tagen um das zirka 1,6-fache an ( $p < 0,1$ ; Abb. 3.13 ■).

In den Hautextrakten beider transgener Linien wurde eine stetige Abnahme der IL-10-Konzentration sechs Stunden bis sieben Tage nach der UV-B-Behandlung ohne vorheriges Maximum festgestellt (K10/GM-CSF Ant: 6 Std.: 1,37 ng/mg  $\pm$  117 pg/mg Gesamtprotein; 7 Tage: 464 pg/mg  $\pm$  89 pg/mg Gesamtprotein;  $p < 0,05$  ■; K5/GM-CSF Ag: 6 Std.: 1,04

ng/mg  $\pm$  280 pg/mg Gesamtprotein; 7 Tage: 321 pg/mg  $\pm$  69 pg/mg Gesamtprotein;  $p < 0,05$  ■; Abb. 3.13).

Nach 14 Tagen erhöhte sich die IL-10-Konzentration in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere um ungefähr das Doppelte ( $p < 0,05$ ). Die IL-10-Konzentration in der Haut beider transgener Linien unterschied sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die IL-10-Konzentration in der Haut beider transgener Linien sechs Stunden nach der Bestrahlung um ungefähr die Hälfte verringert (für K10/GM-CSF Ant mit  $p < 0,1$ ; für K5/GM-CSF Ag mit  $p < 0,05$ ; Abb. 3.13).

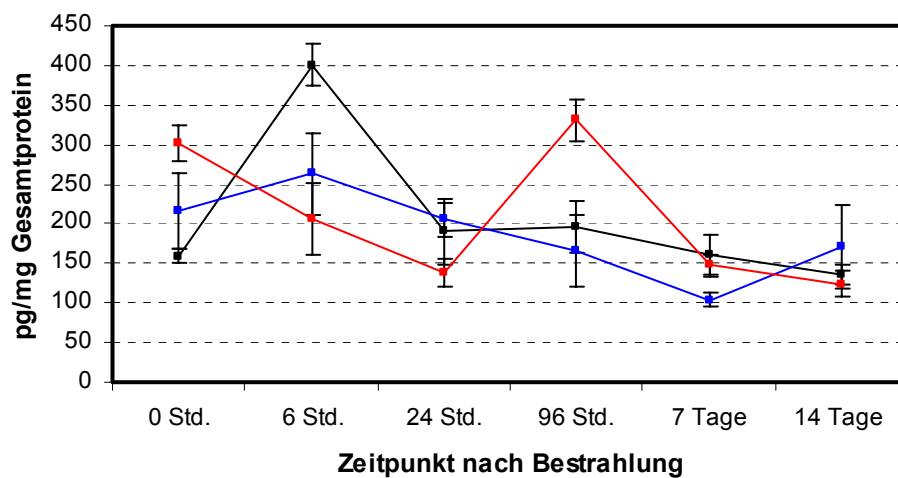


**Abb. 3.13: Konzentrationsbestimmung von IL-10 in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbestrahlte Haut, nach sechs Stunden, 24 Stunden, 96 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen) wurde Tieren der Kontrollgruppe und der transgenen Linien K10/GM-CSF Ant und K5/GM-CSF Ag nach akuter UV-B-Bestrahlung ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ) Hautproben entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte der IL-10-Konzentration mit der jeweiligen SEM aus Proteinextrakten der Haut der Kontrollgruppe (■), der K10/GM-CSF Ant- (■) und der K5/GM-CSF Ag-transgenen (■) Tiere. Es wurden jeweils die Proteinextrakte von sechs Tieren mittels ELISA analysiert. Die Kontrollgruppe (■) zeigte nach sechs Stunden eine maximale IL-10-Konzentration. In der Haut der Antagonistengruppe (■) waren keine signifikanten Änderungen in der IL-10-Konzentration feststellbar, tendenziell eine leichte Verringerung bis sieben Tage nach Bestrahlung. Die IL-10-Konzentration in der unbestrahlten Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere (■) war im Vergleich zur Kontrollgruppe (■) um das ca. 1,6-fache erhöht und sank bis sieben Tage nach der Bestrahlung kontinuierlich.

#### *TNF- $\alpha$ -Konzentration*

Die GM-CSF überexprimierenden Tiere wiesen in ihrer unbestrahlten Haut im Vergleich zur Kontrollgruppe eine etwa doppelt so hohe TNF- $\alpha$ -Konzentration auf (Kontrollgruppe:

159 pg/mg  $\pm$  11 pg/mg Gesamtprotein ■; K5/GM-CSF Ag: 301 pg/mg  $\pm$  25 pg/mg Gesamtprotein;  $p < 0,01$  ■; Abb. 3.14). Dieser *Peak* zeigte sich nochmals nach 96 Stunden (331 pg/mg  $\pm$  30 pg/mg Gesamtprotein ■;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.14) und war zum einen im Vergleich zur Kontroll- und Antagonistengruppe um das ungefähr 1,5-fache erhöht (Kontrollgruppe: 196 pg/mg  $\pm$  25 pg/mg Gesamtprotein ■; K10/GM-CSF Ant: 166 pg/mg  $\pm$  45 pg/mg Gesamtprotein ■), zum anderen trat er verzögert auf, im Vergleich zur Kontrollgruppe, die sechs Stunden nach der Bestrahlung maximale TNF- $\alpha$ -Werte in ihrer Haut aufwies (401 pg/mg  $\pm$  27 pg/mg Gesamtprotein ■;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.14). Dagegen unterschied sich die TNF- $\alpha$ -Konzentration in der unbestrahlten Haut der transgenen K10/GM-CSF-Antagonistengruppe weder von der Kontrollgruppe noch von der transgenen Agonistengruppe (217 pg/mg  $\pm$  56 pg/mg Gesamtprotein ■; Abb. 3.14). Vielmehr sank sie bis sieben Tage nach der Bestrahlung kontinuierlich (401 pg/mg  $\pm$  10 pg/mg Gesamtprotein; ■  $p < 0,01$ ; Abb. 3.14).

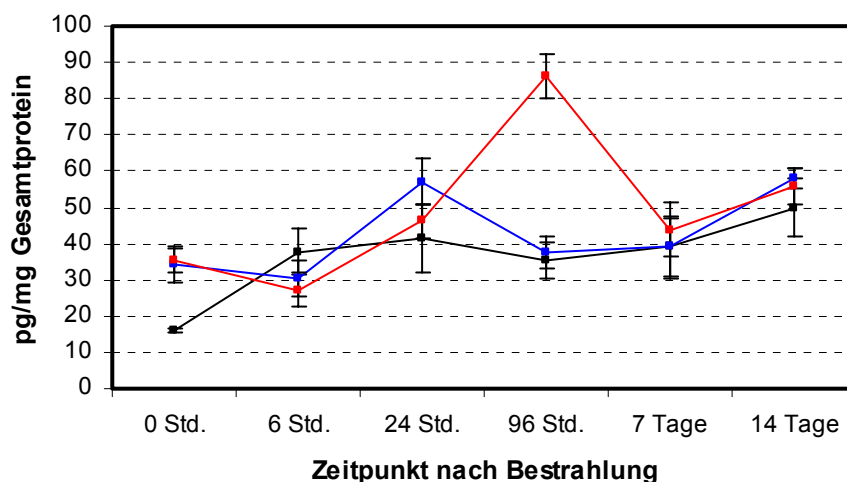


**Abb. 3.14: Konzentrationsbestimmung von TNF- $\alpha$  in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbestrahlte Haut, nach sechs Stunden, 24 Stunden, 96 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen) wurde Tieren der Kontrollgruppe und der transgenen Linien K10/GM-CSF Ant und K5/GM-CSF Ag nach akuter UV-B-Bestrahlung (30 kJ/m<sup>2</sup>) Hautproben entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte der TNF- $\alpha$ -Konzentration mit der jeweiligen SEM aus Proteinextrakten der Haut der Kontrollgruppe (■), der K10/GM-CSF Ant- (■) und K5/GM-CSF Ag-transgenen (■) Tiere. Es wurden jeweils die Proteinextrakte von sechs Tieren mittels ELISA analysiert. Die Kontrollgruppe (■) zeigte nach sechs Stunden eine Hochregulation von TNF- $\alpha$ . In der Haut der Antagonistengruppe (■) änderte sich nach der Bestrahlung die TNF- $\alpha$ -Konzentration nicht signifikant, tendenziell war jedoch eine leichte Abnahme zu erkennen. Die GM-CSF überexprimierenden Tiere (■) besaßen in ihrer unbestrahlten Haut erhöhte TNF- $\alpha$ -Werte, die bis 24 Stunden nach Bestrahlung sanken und nach 96 Stunden ein Maximum erreichten.

### TGF- $\beta$ 1-Konzentration

Im unbestrahlten Zustand war die TGF- $\beta$ 1-Konzentration in der Haut beider transgener Linien im Vergleich zu den Kontrolltieren um das Doppelte erhöht (Abb. 3.15 ■■). Dies bestätigte die Ergebnisse auf mRNA-Ebene aus der *Microarray*-Analyse (Kapitel 3.2.2, S. 57).

In der Haut der Kontrollgruppe verdoppelten sich die TGF- $\beta$ 1-Werte sechs Stunden nach UV-B-Bestrahlung von 16,3 pg/mg  $\pm$  1 pg/mg Gesamtprotein auf 38 pg/mg  $\pm$  7 pg/mg Gesamtprotein ( $p < 0,1$ ; Abb. 3.15 ■).



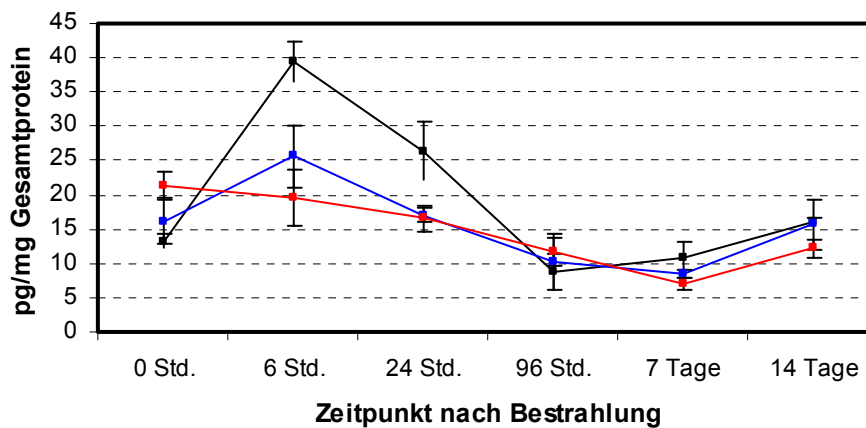
**Abb. 3.15: Konzentrationsbestimmung von TGF- $\beta$ 1 in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbestrahlte Haut, nach sechs Stunden, 24 Stunden, 96 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen) wurde Tieren der Kontrollgruppe und der transgenen Linien K10/GM-CSF Ant und K5/GM-CSF Ag nach akuter UV-B-Bestrahlung (30 kJ/m<sup>2</sup>) Hautproben entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte der TGF- $\beta$ 1-Konzentration mit der jeweiligen SEM aus Proteinextrakten der Haut der Kontrollgruppe (■), der K10/GM-CSF Ant- (■) und K5/GM-CSF Ag-transgenen (■) Tiere. Es wurden jeweils die Proteinextrakte von sechs Tieren mittels ELISA analysiert. Beide transgene Gruppen besaßen erhöhte TGF- $\beta$ 1-Werte in ihrer unbestrahlten Haut im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe (■) zeigte nach sechs Stunden eine Hochregulation von TGF- $\beta$ 1. Die Antagonistengruppe (■) wies nach 24 Stunden ein Maximum auf. Die Agonistengruppe (■) zeigte maximale TGF- $\beta$ 1-Werte 96 Stunden nach der UV-B-Bestrahlung.

Beide transgenen Linien zeigten verzögert dazu maximale TGF- $\beta$ 1-Werte. Die Tiere verminderter GM-CSF-Aktivität wiesen nach 24 Stunden eine maximale TGF- $\beta$ 1-Konzentration in ihrer Haut auf (K10/GM-CSF Ant: 57 pg/mg  $\pm$  6 pg/mg Gesamtprotein ■;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.15). Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration in der Haut der K10/GM-CSF-Antagonisten unterschied sich jedoch zu keinem Zeitpunkt nach der UV-B-Behandlung signifikant von der Kontrollgruppe.

Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere wies 96 Stunden nach UV-B-Bestrahlung ein Maximum auf ( $86 \text{ pg/mg} \pm 7 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein;  $p < 0,001$ ) und war damit im Vergleich zur Kontrollgruppe und der Antagonistengruppe um das ungefähr 2,5-fache erhöht ( $p < 0,001$ ; Abb. 3.15 ■).

#### *IL-4-Konzentration*

Die unbestrahlte Haut beider transgener Gruppen wies keinen Unterschied in ihrer IL-4-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Konzentrationsbestimmung von IL-4 in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbestrahlte Haut, nach sechs Stunden, 24 Stunden, 96 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen) wurde Tieren der Kontrollgruppe und der transgenen Linien K10/GM-CSF Ant und K5/GM-CSF Ag nach akuter UV-B-Bestrahlung ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ) Hautproben entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte der IL-4-Konzentration mit der jeweiligen SEM aus Proteinextrakten der Haut der Kontrollgruppe (■), der K10/GM-CSF Ant- (■) und K5/GM-CSF Ag-transgenen (■) Tiere. Es wurden jeweils die Proteinextrakte von sechs Tieren mittels ELISA analysiert. Die Kontrollgruppe (■) zeigte ein IL-4-Maximum nach sechs Stunden. In der Haut der Agonisten- (■) und der Antagonistengruppe (■) sank die IL-4-Konzentration kontinuierlich bis sieben Tage nach der Bestrahlung.

Allerdings wurde ein unterschiedlicher Konzentrationsverlauf nach der UV-B-Behandlung bei der Kontrollgruppe gegenüber den GM-CSF-transgenen Tieren festgestellt: Während in der Haut der Kontrolltiere sechs Stunden nach der Bestrahlung eine Konzentrationsspitze beobachtet werden konnte (unbestrahlt:  $13 \text{ pg/mg} \pm 1 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein; 6 Std.:  $40 \text{ pg/mg} \pm 3 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.16 ■), sank in der Haut beider

transgener Linien die IL-4-Konzentration ausgehend vom unbestrahlten Zustand bis sieben Tage nach UV-B-Bestrahlung kontinuierlich. So betrug sie in der unbestrahlten Haut der Antagonisten  $16 \text{ pg/mg} \pm 3,8 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein. Nach sieben Tagen hatte sie sich um die Hälfte reduziert ( $8,75 \text{ pg/mg} \pm 0,75 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.16). Bei der Agonistengruppe war nach sieben Tagen lediglich etwa ein Drittel der Ausgangskonzentration vorhanden (unbestrahlt:  $21,5 \text{ pg/mg} \pm 2 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein; 7 Tage:  $7 \text{ pg/mg} \pm 1,08 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,001$ ; Abb. 3.16).

Somit konnte sechs Stunden nach der Bestrahlung in der Cutis beider transgener Linien im Vergleich zur Kontrollgruppe eine um 40 bis 50% verringerte IL-4-Konzentration festgestellt werden (K10/GM-CSF Ant:  $25,4 \text{ pg/mg} \pm 5 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,1$ ; K5/GM-CSF Ag:  $19,7 \text{ pg/mg} \pm 4,5 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.16).

#### *IL-6-Konzentration*

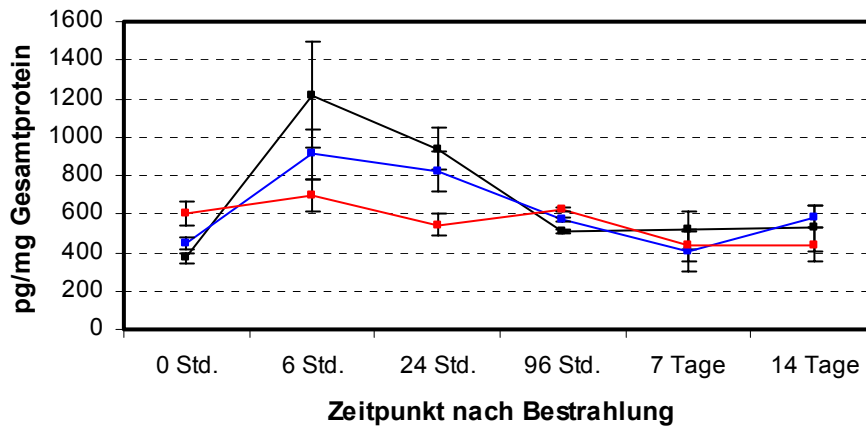
In der unbestrahlten Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere war die IL-6-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe und den Antagonisten überexprimierenden Tieren um das ca. 1,5-fache erhöht (Kontrollgruppe:  $370 \text{ pg/mg} \pm 29 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■; K10/GM-CSF Ant:  $447 \text{ pg/mg} \pm 40,45 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■; K5/GM-CSF Ag:  $601 \text{ pg/mg} \pm 71,1 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.17).

Die Kontroll- und die transgene Antagonistengruppe wiesen sechs Stunden nach der UV-B-Bestrahlung ein Maximum in ihrer IL-6-Konzentration auf (Kontrollgruppe:  $1220 \text{ pg/mg} \pm 250 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,05$ ; K10/GM-CSF Ant:  $909 \text{ pg/mg} \pm 131 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,05$ ). Bis 96 Stunden nach der UV-B-Behandlung sank die IL-6-Konzentration sowohl in der Haut der Kontroll- als auch der Antagonistengruppe auf den jeweiligen Basiswert (Kontrollgruppe:  $507 \text{ pg/mg} \pm 100 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,05$ ; K10/GM-CSF Ant:  $574 \text{ pg/mg} \pm 117 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,1$ ; Abb. 3.17).

In der bestrahlten Haut der Agonistengruppe wurde zu keinem Zeitpunkt eine Veränderung in der IL-6-Konzentration festgestellt. Sechs Stunden nach der UV-B-Behandlung war in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere die IL-6-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe um die Hälfte geringer ( $698 \text{ pg/mg} \pm 82 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,1$ ). Nach 24 Stunden war sie im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Antagonistengruppe um das zirka 1,5-fache geringer ( $543 \text{ pg/mg} \pm 57 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■; Kontrollgruppe:



939 pg/mg  $\pm$  116 pg/mg Gesamtprotein ■;  $p < 0,05$ ; K10/GM-CSF Ant: 824 pg/mg  $\pm$  114,4 pg/mg Gesamtprotein ■;  $p < 0,1$ ; Abb. 3.17).



**Abb. 3.17: Konzentrationsbestimmung von IL-6 in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbestrahlte Haut, nach sechs Stunden, 24 Stunden, 96 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen) wurde Tieren der Kontrollgruppe und der transgenen Linien K10/GM-CSF Ant und K5/GM-CSF Ag nach akuter UV-B-Bestrahlung ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ) Hautproben entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte der IL-6-Konzentration mit der jeweiligen SEM aus Proteinextrakten der Haut der Kontrollgruppe (■), der K10/GM-CSF Ant- (■) und K5/GM-CSF Ag-transgenen (■) Tiere. Es wurden jeweils die Proteinextrakte von sechs Tieren mittels ELISA analysiert. Die Kontroll- (■) und die Antagonistengruppe (■) zeigten eine IL-6-Hochregulation nach sechs Stunden. In der unbestrahlten Haut der Agonistengruppe war die IL-6-Konzentration im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen erhöht, sie änderte sich jedoch nach Bestrahlung nicht.

### 3.2.4.3 Konzentration von IL-12p40 und IFN- $\gamma$ in der Haut nach UV-B-Bestrahlung

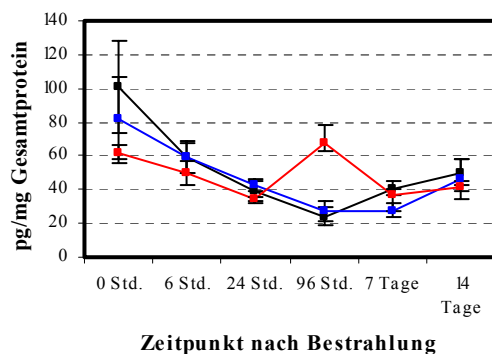
#### *IL-12p40-Konzentration*

Die IL-12p40-Konzentration in der unbestrahlten Haut der Kontrolltiere und der GM-CSF-transgenen Linien unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Kontrollgruppe:  $101 \text{ pg/mg} \pm 27 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■; K10/GM-CSF Ant:  $82 \text{ pg/mg} \pm 25 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■; K5/GM-CSF Ag:  $61 \text{ pg/mg} \pm 6 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■; Abb. 3.18 A.).

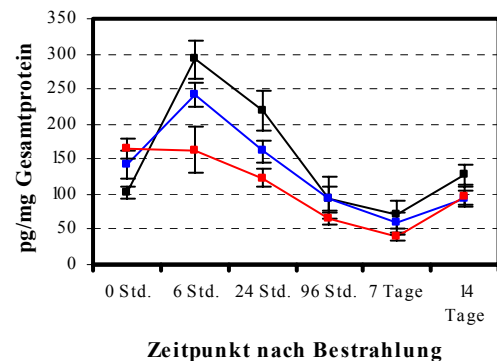
Im Gegensatz zur IL-12p40-Konzentration in der Haut der Kontroll- und Antagonistengruppe, die kontinuierlich bis 96 Stunden nach Bestrahlung sank (Kontrollgruppe:  $24 \text{ pg/mg} \pm 7 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■; K10/GM-CSF Ant:  $27 \text{ pg/mg} \pm 7 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■) und danach lediglich moderat anstieg, zeigte sich in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere ein verzögerter *Peak* nach 96 Stunden ( $68 \text{ pg/mg} \pm 11,7 \text{ pg/mg}$

Gesamtprotein ■; Abb. 3.18 A.) und war damit etwa doppelt so hoch wie die IL-12p40-Konzentration in der Cutis der Kontroll- und Antagonistengruppe ( $p < 0,05$ ) zum selben Zeitpunkt. Nach sieben Tagen sank die IL-12p40-Konzentration in der Haut der Agonistengruppe auf  $37 \text{ pg/mg} \pm 3 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein und unterschied sich damit nicht mehr signifikant von der IL-12p40-Konzentration in der Haut der Kontroll- und Antagonistengruppe zum gleichen Zeitpunkt. Die IL-12p40-Konzentration in der Haut der transgenen Antagonistengruppe unterschied sich zu keinem Zeitpunkt von der der Kontrollgruppe (Abb. 3.18 A.).

### A. IL-12p40



### B. Interferon- $\gamma$



**Abb. 3.18: Konzentrationsbestimmung von IL-12p40 und Interferon- $\gamma$  in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.** Zu den entsprechenden Zeitpunkten (unbestrahlte Haut, nach sechs Stunden, 24 Stunden, 96 Stunden, sieben Tagen und 14 Tagen) wurde Tieren der Kontrollgruppe und der transgenen Linien K10/GM-CSF Ant und K5/GM-CSF Ag nach akuter UV-B-Bestrahlung ( $30 \text{ kJ/m}^2$ ) Hautproben entnommen. Dargestellt sind die Mittelwerte der (A.) IL-12p40- und (B.) IFN- $\gamma$ -Konzentration mit der jeweiligen SEM aus Proteinextrakten der Haut von Kontroll-(■), K10/GM-CSF Ant- (■) und K5/GM-CSF Ag- (■) transgenen Tieren. Es wurden jeweils die Proteinextrakte von sechs Tieren analysiert. Die IL-12p40-Konzentration (A.) in der Haut der Kontroll- (■) und der Antagonistengruppe (■) nahm bis 96 Stunden nach Bestrahlung ab und stieg danach langsam an. Die Agonistengruppe (■) zeigte 96 Std. nach Bestrahlung einen Anstieg der IL-12p40-Konzentration. Die IFN- $\gamma$ -Konzentration (B.) in der Haut der Kontroll- (■) und der Antagonistengruppe (■) stieg bis sechs Stunden nach Bestrahlung an und nahm danach kontinuierlich bis sieben Tage nach der Bestrahlung ab. In der Haut der Agonistentiere (■) nahm sie kontinuierlich ab.

#### IFN- $\gamma$ -Konzentration

Die GM-CSF überexprimierenden Tiere wiesen in ihrer unbestrahlten Haut eine etwa 1,6-fach höhere IFN- $\gamma$ -Konzentration auf als die Kontrollgruppe (Kontrollgruppe:  $103 \text{ pg/mg} \pm 11 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■; K5/GM-CSF Ag:  $164 \text{ pg/mg} \pm 16 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p <$

0,05; Abb. 3.18 B). Sie nahm jedoch kontinuierlich bis sieben Tage nach der Behandlung ab ( $39 \text{ pg/mg} \pm 5 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■) und war zu allen Zeitpunkten nach der UV-B-Bestrahlung geringer als die IFN- $\gamma$ -Konzentration in der Haut der Kontroll- und der Antagonistengruppe. Diese wiesen sechs Stunden nach der Behandlung maximale IFN- $\gamma$ -Werte auf (Kontrollgruppe:  $292 \text{ pg/mg} \pm 30 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,01$ ; K10/GM-CSF Ant:  $242 \text{ pg/mg} \pm 17 \text{ pg/mg}$  Gesamtprotein ■;  $p < 0,05$ ; Abb. 3.18 B.).

## 4. Diskussion

### 4.1 Bedeutung von GM-CSF in der UV-B-induzierten Tumorentwicklung

GM-CSF wirkt auf das Tumorwachstum sowohl promovierend (Zinzar *et al.*, 1985; Young und Griffin, 1986; Mano *et al.*, 1987; Russell, 1992; Freedman *et al.*, 1993; Mueller *et al.*, 1999; Rochet *et al.*, 1999; Wislez *et al.*, 2001; Gutschalk *et al.*, 2006) als auch inhibierend (Dranoff *et al.*, 1993). So führt zum Beispiel die Vakzinierung mit bestrahlten Melanomzellen, die GM-CSF exprimieren, zur Ausbildung einer Antitumor-Immunität, die das Tier vor Tumorneubildung schützt. In ersten klinischen Behandlungen werden Hautkrebspatienten sogar mit GM-CSF behandelt (Leong *et al.*, 1999; Mastrangelo *et al.*, 1999; Scheibenbogen *et al.*, 2000; Moret-Tatay, 2003).

Da UV-B-Strahlung – aufgrund des Klimawandels und dem damit verbundenen Rückgang der Ozonschicht – in einem immer höheren Maße für die Bildung von vor allem Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen auf der Haut verantwortlich gemacht wird (Ziegler *et al.*, 1993), soll anhand zwei bereits etablierter GM-CSF-transgener Mausmodelle die Wirkung von GM-CSF in der durch UV-B induzierten Hautkarzinogenese untersucht werden. Bei den GM-CSF-transgenen Tieren handelt es sich zum einen um solche, die GM-CSF unter der Kontrolle des Keratin 5-Promotors in der Basalschicht der interfollikulären Epidermis und in den Haarfollikeln überexprimieren (K5/GM-CSF Ag) (Breuhahn *et al.*, 2000), zum anderen um Tiere, die einen GM-CSF-Antagonisten unter der Kontrolle des Keratin 10-Promotors in den suprabasalen Schichten der interfollikulären Epidermis überexprimieren (K10/GM-CSF Ant) (Mann *et al.*, 2001b). Eine Überexpression von GM-CSF in der Haut nach mehrmaliger UV-B-Bestrahlung führt zu einer 2- bis 3-mal so hohen Anzahl benigner Läsionen (Dysplasien und Papillome) und einer deutlich erhöhten Karzinominzidenz, verbunden mit einer starken Schwächung des konstitutionellen Zustandes der Versuchstiere. Ist die GM-CSF-Aktivität in der Haut vermindert, zeigen sich keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl der benignen Läsionen im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Karzinominzidenz ist allerdings leicht erhöht. Des Weiteren verzögert eine verminderte GM-CSF-Aktivität das erste Auftreten von Karzinomen nach UV-B-Bestrahlung, was mit Sicherheit ein Grund für den besseren konstitutionellen Zustand dieser Versuchstiere ist. Der stark tumorpromovierende Effekt

von GM-CSF in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere in der UV-B-induzierten Hautkarzinogenese steht im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der chemisch induzierten Karzinogenese, in der beide GM-CSF-transgenen Linien (sowohl Agonist als auch Antagonist) eine deutlich erhöhte Anzahl an benignen Läsionen und eine nur leicht erhöhte Karzinominzidenz im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen (Mann *et al.*, 2001b). Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind vermutlich Folge unterschiedlicher Zielgene in den beiden Hautkarzinogenese-Modellen: DMBA als Tumor-Initiator in der chemischen Hautkarzinogenese führt hauptsächlich zu Mutationen im 61. Kodon des Ha-*ras*-Genes (Cheng *et al.*, 1988), während in der UV-B-induzierten Hautkarzinogenese eher Mutationen im *p53*-Gen von Bedeutung sind (Brash *et al.*, 1991; 1996; Stadler und Hartig, 2003). Möglicherweise führt die Überexpression von GM-CSF zu einer Herunterregulierung der *p53*-Expression. Dies konnte in Versuchen mit hämatopoetischen Vorläuferzellen ebenfalls festgestellt werden (Vishalakumar *et al.*, 2006). Dies kann jedoch nicht der alleinige Grund für die hohe Tumorzinzidenz in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere sein. Vielmehr ist die Ursache für den tumorfördernden Effekt von GM-CSF mehrschichtig und betrifft vor allem den Einfluss von GM-CSF auf 1.) die Keratinozytenproliferation, 2.) die Immigration von LCs (Langerhans Zellen), Mastzellen und Neutrophilen in die Epidermis und Dermis und 3.) auf das Zytokinprofil nach UV-B-Bestrahlung. Diese Punkte werden im Folgenden diskutiert.

## **4.2 Effekt von GM-CSF auf die Proliferation, die Apoptose und die Differenzierung der Keratinozyten nach UV-B-Bestrahlung**

GM-CSF stimuliert sowohl *in vitro* (Hancock *et al.*, 1988; Kupper *et al.*, 1988; Kawada *et al.*, 1997) als auch *in vivo* die Proliferation von Keratinozyten (Kaplan *et al.*, 1992; Braunstein *et al.*, 1994; Breuhahn *et al.*, 2000). Übereinstimmend damit wurden in der interfollikulären Epidermis der GM-CSF überexprimierenden Tiere erhöhte mitotische Indizes festgestellt (Breuhahn *et al.*, 2000). Der Effekt von GM-CSF auf die Keratinozytenproliferation nach UV-B-Bestrahlung ist abhängig von der GM-CSF-Grundkonzentration in der Haut der jeweiligen Versuchsgruppe:

(1) In der Haut der Kontrollgruppe (keine messbare GM-CSF-Grundkonzentration) kommt es direkt nach Bestrahlung zu einer Hochregulation von GM-CSF, da die GM-CSF-

Produktion der Keratinozyten nach UV-B-Bestrahlung durch die autokrine Produktion von IL-1 $\alpha$  erhöht wird (Gallo *et al.*, 1991; Nozaki *et al.*, 1991; Tada *et al.*, 2000). Die stimulierende Wirkung auf die Proliferation der Keratinozyten kann jedoch erst 96 Stunden nach Bestrahlung in Form einer Proliferationsspitze detektiert werden.

(2) Eine Überexpression von GM-CSF in der unbestrahlten Haut führt nach UV-B-Bestrahlung zunächst zu einer Absenkung der GM-CSF-Konzentration. Erst 96 Stunden nach Bestrahlung ist eine weitere GM-CSF-Konzentrationsspitze feststellbar, die sich jedoch nicht vom GM-CSF-Basiswert in der unbestrahlten Haut dieser transgenen Tiere unterscheidet. Diese GM-CSF-Konzentrationsspitze 96 Stunden nach UV-B-Bestrahlung führt zu einer prolongierten Keratinozytenproliferation (96 Stunden bis 14 Tage nach UV-B-Bestrahlung), die zur endogenen Tumorpromotion beiträgt, indem sie zu einer klonalen Expansion von mutierten Keratinozyten führt und damit die Bildung von Neoplasien unterstützt. Dies wurde schon in der chemisch induzierten Karzinogenese gezeigt (Mann *et al.*, 2001b).

(3) In der Haut der transgenen Tiere, die den GM-CSF-Antagonisten überexprimieren, führt UV-B-Bestrahlung zunächst zu einer Abnahme der Antagonistenkonzentration und erst nach 96 Stunden zu einem zweiten *Peak*. Bis sieben Tagen nach der Bestrahlung nimmt die Antagonistenkonzentration so stark ab, dass sie sich nicht mehr von der GM-CSF-Konzentration der Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt unterscheidet. Dies kann Folge der UV-B-vermittelten Herunterregulation des Gens *Keratin 10* sein (Horio *et al.*, 1993), dessen Promotor den GM-CSF-Antagonisten kontrolliert. Dabei ist davon auszugehen, dass zu diesem Zeitpunkt der Antagonist die Wirkung des Agonisten nicht mehr komplett kompetieren kann, da hierzu *in vitro* ein 1.000-facher Überschuss des Antagonisten gegenüber dem Agonisten erforderlich ist (Altmann und Kastelein, 1995). Trotzdem lassen sich in der Haut dieser Tiere erst nach 14 Tagen erste S-Phase-Nuklei in der Basalschicht der Epidermis detektieren. Diese Proliferationsverzögerung hat für die Tiere jedoch den Vorteil, dass die Zellen sich länger in der G<sub>1</sub>-Phase befinden (Liebermann *et al.*, 1995) und so der durch UV-B verursachte DNA-Schaden effizienter repariert werden kann.

Das insgesamt erst späte Auftreten von S-Phase-Nuklei in der Basalschicht der Epidermis aller Tiere (frühestens 96 Stunden nach Bestrahlung) lässt sich durch die UV-B-induzierten, apoptotischen und nekrotischen Vorgänge in der Epidermis erklären (Cariccio

*et al.*, 2003): UV-B-Bestrahlung führt zu Apoptose der Keratinozyten über verschiedene Mechanismen, zum Beispiel über Fas/FasL-Wechselwirkung (Hill *et al.*, 1999) oder über die Induktion von *p53* (Ziegler *et al.*, 1994; Brash *et al.*, 1996; Henseleit *et al.*, 1997), was zu einer Hochregulation des proapoptotischen Proteins *bax* und zu einer Herunterregulierung des antiapoptotischen Proteins *bcl-2* führt (Ouhtit und Ananthaswamy, 2001). Gleichzeitig induziert *p53* über die Regulation der Expression von *p21* auch den Zellzyklusstop in der G<sub>1</sub>-Phase (El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1994; Liebermann *et al.*, 1995). So kann der durch UV-B verursachte Zellschaden repariert werden.

Während in der chemischen Karzinogenese kein Unterschied im Entdifferenzierungsgrad der Plattenepithelkarzinome der einzelnen Linien festgestellt werden konnte (Mann *et al.*, 2001b), bilden in der UV-B-induzierten Karzinogenese die Tiere verminderter GM-CSF-Aktivität eine auffallend hohe Anzahl an Karzinomen geringer Differenzierung (Grad 4). Diese Beobachtung beruht auf der Tatsache, dass der Antagonist eine hemmende Wirkung auf die Fähigkeit von GM-CSF besitzt, die Keratinozytendifferenzierung nach UV-B-Bestrahlung zu stimulieren (Szabowski *et al.*, 2000).

### **4.3 Einfluss von GM-CSF auf die Hautstruktur und die Infiltration von Zellen nach UV-B-Bestrahlung**

Die zerstörende Wirkung von akuter UV-B-Strahlung auf die Epidermisstruktur konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass GM-CSF ähnlich wie in Wundheilungs- und chemischen Karzinogenese-Experimenten (Kaplan *et al.*, 1992; El Saghier *et al.*, 1997; Jaschke *et al.*, 1999; Stagno *et al.*, 1999; Mann *et al.*, 2001a) zur schnelleren Heilung der Epidermis führt. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden, denn der positive Effekt von GM-CSF auf die Keratinozytenproliferation (Hancock *et al.* 1988; Braunstein *et al.*, 1994; Breuhahn *et al.*, 2000) fördert nach UV-B-Bestrahlung vor allem, wie in Kapitel 4.2 (S. 72) beschrieben, die klonale Expansion der mutierten Keratinozyten. Weitere Beobachtungen belegen die promovierende Wirkung von GM-CSF auf die Bildung von Neoplasien nach UV-B-Bestrahlung:

(1) Eine erhöhte GM-CSF-Aktivität führt zu starken Entzündungen und hyperkeratotischen Veränderungen in der Dermis und Epidermis. Des Weiteren weisen GM-CSF

überexprimierende Tiere in einem größeren Umfang ödematöse Strukturen mit Zellinfiltraten auf. Dies stimmt mit Studien überein, in denen festgestellt wurde, dass die transiente Expression von GM-CSF – verursacht durch einen replikationsdefizienten adenoviralen Vektor – zur epidermalen Hyperplasie, zu Entzündungen und massiver Infiltration führt (Rajagopalan *et al.*, 1995; Xing *et al.*, 1997). Der Antagonist hemmt bzw. verzögert dagegen die schnelle Infiltration von Entzündungszellen, die ebenfalls zur Tumorbildung beitragen können. In GM-CSF-*knock out*-Mäusen konnte dies für CD4<sup>+</sup>T-Zellen gezeigt werden (Wada *et al.*, 1997).

(2) Nach UV-B-Bestrahlung kommt es zunächst zu einer Reduktion der Zellkerndichte in der Dermis und Epidermis, da UV-B vor allem auf die LCs (= Langerhans Zellen = Untergruppe der dendritischen Zellen) und DETCs (= dendritische epidermale T-Zellen) phototoxisch wirkt bzw. deren Morphologie verändert (Toews *et al.*, 1980; Aberer *et al.*, 1981; Aberer *et al.*, 1986; Cooper *et al.*, 1993; Wachter *et al.*, 2003; Sugihara *et al.*, 2005). Das heißt, dass eine erhöhte GM-CSF-Aktivität in der Haut während der UV-B-induzierten Karzinogenese nicht zu einer verbesserten Antitumor-Immunität über die DCs vermittelte T-Zell-Stimulierung (Liu *et al.*, 2006) führen kann. Eine epidermale Überexpression von GM-CSF führt nämlich zu einer erhöhten Anzahl an antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen (LCs) in der Epidermis (Breuhahn *et al.*, 2000), indem es *in vitro* deren Absterben verhindert (Heufler *et al.*, 1988) und ihre Reifung und Funktionsfähigkeit fördert (Caux *et al.*, 1992; 1996; Herbst *et al.*, 1998). So rufen bestrahlte B16-Melanomzellen, die GM-CSF exprimieren, in Mäusen eine potente Antitumor-Immunität hervor, die durch CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vermittelt wird (Hung *et al.*, 1988; Huang *et al.*, 1994; Shi *et al.*, 1999). Wurde den Tieren vor der Transplantation ein Antikörper gegen GM-CSF injiziert, konnte allerdings keine Immunität aufgebaut werden (Dranoff *et al.*, 1993; Kayaga *et al.*, 1999; Soo Hoo *et al.*, 1999). Die Immunität gegen die B16-Melanomzellen beruht auf der Fähigkeit von GM-CSF, APCs (antigenpräsentierende Zellen) zu aktivieren. Diese präsentieren Tumorantigene den CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, welche als T-Helferzellen (CD4<sup>+</sup>) oder Effektorzellen (CD8<sup>+</sup>) die Tumorabwehr vermitteln (Hung *et al.*, 1988; Inaba *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1994; van Elsas *et al.*, 1999). Antigene können somit effektiver aufgenommen, prozessiert und der Immunantwort zugänglich gemacht werden (Inaba *et al.*, 1992; Huang *et al.*, 1994; Banchereau und Steinmann, 1998; van Elsas *et al.*, 1999).



Die APCs in der Haut der Tiere verminderter GM-CSF-Aktivität sind in ihrer Funktion aufgrund der Hemmung des endogenen GM-CSF durch den Antagonisten gestört (Mann *et al.*, 2001b). Aus diesem Grund besitzen diese Tiere eine verschlechterte Antitumor-Immunität in der chemisch induzierten Karzinogenese. Diese Funktionsstörung hat in der UV-B-induzierten Karzinogenese aus den bereits genannten Gründen keine negativen Auswirkungen, da die toxische Wirkung der UV-B-Strahlen auf die LCs bei allen Tieren identisch ist. Die nur leicht erhöhte Karzinominzidenz im Vergleich zur Kontrollgruppe ist möglicherweise Folge der hemmenden Wirkung des Antagonisten auf andere Gruppen von APCs (z.B. Makrophagen). *In vitro*- und *in vivo*-Daten deuten darauf hin, dass GM-CSF nicht nur für die Reifung von Makrophagen verantwortlich ist, sondern diese auch aktivieren kann (Sisson und Dinarello, 1988; Brisette *et al.*, 1995; Basu *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2006).

(3) In Übereinstimmung mit schon bestehenden Studien kommt es in der Haut der Kontroll- und Antagonistengruppe direkt nach UV-B-Bestrahlung zu einer Immigration von Mastzellen, die bei der UV-B-induzierten Immunmodulation von Bedeutung sind (Hart *et al.*, 1998; 2000), da sie nach UV-B-Bestrahlung vor allem über die Freisetzung von Histamin, Prostaglandin und TNF- $\alpha$  immunsuppressiv wirken und über die Freisetzung von GM-CSF und IL-6 die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen unterstützen (Walsh 1995; Hart *et al.*, 2000; 2001; 2002; Zhao *et al.*, 2006). In der unbestrahlten bzw. bestrahlten Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere ist die Mastzellanzahl in der Dermis jedoch schon um den Faktor 2- bis 3 (Breuhahn *et al.*, 2000) bzw. 1,5- bis 2-fache erhöht. Dies steigert *per se* die Suszeptibilität für Hautkarzinogenese (Hart *et al.*, 2001), obwohl die Mastzellanzahl in der Haut dieser Tiere nach UV-B-Bestrahlung zunächst absinkt. In allen drei Versuchsgruppen konnte ein biphasisches Immigrationsverhalten der Mastzellen – resultierend aus einem Wechsel von Degranulation und Einwanderung der Mastzellen in die Dermis – gezeigt werden. Dabei ist für die erhöhte Tumoranfälligkeit der GM-CSF überexprimierenden Tiere der frühe Zeitpunkt der zweiten Einwanderungswelle – verursacht durch einen GM-CSF-Konzentrationsanstieg – mitverantwortlich.

Sieben Tage nach UV-B-Bestrahlung kommt es zu einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten in die Dermis der Kontroll- und der Antagonistengruppe. Bestehende Studien – allerdings an humaner Haut – wiesen infiltrierende Neutrophile zu einem früheren Zeitpunkt nach der Bestrahlung nach (Hawk *et al.*, 1988; Teunissen *et al.*, 2002;

Rijken *et al.*, 2006). Eine Überexpression von GM-CSF führt jedoch sowohl schon eine Stunde nach Bestrahlung als auch nach sieben Tagen zu einer erhöhten Infiltration von neutrophilen Granulozyten, die über die Bildung von ROS (*reactive oxygen species*) zur Tumorpromotion beitragen, indem sie Entzündungen verstärken und damit apoptotische und nekrotische Vorgänge verändern (Trenam *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1994; Fialkow *et al.*, 2007). Eine solch modulierende Wirkung von GM-CSF auf neutrophile Granulozyten konnte auch schon für verschiedene Autoimmunerkrankungen gezeigt werden (Cook *et al.*, 2004; Keller *et al.*, 2005; Duan *et al.*, 2007). In der unbestrahlten Haut hat GM-CSF dagegen keinen Einfluss auf die Infiltration von neutrophilen Granulozyten (Hazar *et al.*, 1999; Breuhahn *et al.*, 2000), obwohl es bei einer systemischen oder intraperitonealen GM-CSF-Gabe in Mäusen zu einer erhöhten Anzahl an zirkulierenden Neutrophilen und peritonealen Makrophagen kommt (Metcalf *et al.*, 1987) und GM-CSF die konstitutive Apoptose von neutrophilen Granulozyten verzögert (Klein *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2005).

#### **4.4 Modulation des Zytokinprofils durch GM-CSF nach UV-B-Bestrahlung**

UV-B-induzierte Hautkarzinogenese ist ein komplexer Prozess, bei dem vor allem die Suppression des Immunsystems von Bedeutung ist. Diese erfolgt zum Beispiel durch die Ausschüttung von immunsuppressiven Zytokinen (Schwarz, 2005), wie etwa IL-10, TNF- $\alpha$  und IL-4, die hauptsächlich für die lokale und systemische Immunsuppression nach UV-B-Strahlung verantwortlich sind (Yoshikawa und Streilein, 1990; Kurimoto und Streilein, 1992; Vincek *et al.*, 1993; Moodycliffe *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 1998; Shreedhar *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2006) und vor allem von Keratinozyten aufgrund UV-B-induzierter DNA-Schädigung freigesetzt werden (Schwarz *et al.*, 1986; Kock *et al.*, 1990; Nishigori *et al.*, 1996; Kibitel *et al.*, 1998). In Einklang damit zeigt die Kontrollgruppe sechs Stunden nach Bestrahlung erhöhte Konzentrationen an IL-10, TNF- $\alpha$  und IL-4.

IFN- $\gamma$  ist ein zentrales proinflammatorisches Zytokin, dessen Konzentration sechs Stunden nach Bestrahlung in der Haut der Kontrollgruppe und der Antagonisten-Tiere maximal ist. *In vitro*-Versuche, die eine Abnahme von IFN- $\gamma$  nach UV-B-Bestrahlung nachweisen, stehen diesen Ergebnissen entgegen (Teunissen *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1994; Kremer *et*

*al.*, 1996; Denfeld *et al.*, 2001). Das hier vorgestellte Modell hingegen berücksichtigt die *in vivo*-Verhältnisse in einem Organismus. Möglicherweise kommt es aufgrund der Stärke der Strahlung zu einer Akutphasereaktion. Dafür spricht auch die Induktion von IL-6 und TNF- $\alpha$  in der Haut der Kontrollgruppe bzw. nur von IL-6 in der Haut der Antagonisten-*gruppe*. Eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt zu einer vermehrten FasL-Expression auf Keratinozyten und damit zu einer verstärkten Apoptose (Leverkus *et al.*, 1997; Gutierrez-Steil *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 1999). Durch UV-B beschädigte Keratinozyten werden also möglicherweise eliminiert.

Die fehlende Induktion von IL-12p40 ist Folge der zerstörenden Wirkung der UV-B-Strahlen auf die LCs (Aberer *et al.*, 1981; Koch *et al.*, 1996) und einer verzögerten Migration von Makrophagen in die Dermis. Diese beiden Zelltypen sind in der Haut die Hauptquelle von IL-12p40 (D'Andrea *et al.*, 1992; Macatonia *et al.*, 1995; Tada *et al.*, 2000).

Eine Überexpression von GM-CSF führt durch eine erhöhte Konzentration an IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$ 1 und IFN- $\gamma$  in der unbestrahlten Haut zu einem immunsuppressiven und proinflammatorischen Milieu. Dadurch ist die Anfälligkeit dieser Tiere für eine Tumorbildung *per se* erhöht. Ma *et al.*, (2006) zeigten, dass UV-B zwar zu einer Induktion von IL-10 führt und damit zu einer Suppression von einer CHS (*contact hypersensitivity*) - Antwort. Aber bei IL-10-transgenen Tieren, bei denen diese Suppression im unbestrahlten Zustand ausgelöst werden konnte, fand nach Bestrahlung keine Suppression der CHS-Reaktion statt. Da GM-CSF zu einer erhöhten Freisetzung von IL-10 im unbestrahlten Zustand führt, wird die These aufgestellt, dass die durch IL-10 induzierte Immunsuppression bei den GM-CSF überexprimierenden Tieren nach UV-B-Bestrahlung nicht stattfindet. Man kann also davon ausgehen, dass die hohe Karzinominzidenz verbunden mit einer erhöhten Mortalität bei diesen Tieren nicht durch eine durch GM-CSF verstärkte Immunsuppression hervorgerufen wird, sondern durch das antagonistische Wirken von verschiedenen Zytokinen nach UV-B-Bestrahlung. Ähnliches konnte bereits für das Krankheitsbild von PKDL (*Post kala-azar dermal leishmaniasis*) gezeigt werden (Ismael *et al.*, 2006). Des Weiteren ist für die Reifung in den sekundären Lymphorganen von aus der Haut stammenden DCs das Zytokinmilieu – suppressive versus stimulatorische Zytokine – während der Migrationsinitiation entscheidend (de Gruijl *et al.*, 2006). Eine Überexpression von GM-CSF könnte somit zu einer erhöhten Anzahl stimulierter T-

Zellen nach UV-B-Bestrahlung führen, die in der Lage sind, eine  $T_{h1}$ -Antwort zu rekonstituieren. Konsistent damit werden 96 Stunden nach der akuten UV-B-Bestrahlung TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 hochreguliert, die die IL-12p40-Produktion von wieder einwandernden LCs verstärken (Tada *et al.*, 2001; Berthier-Vergnes, 2005). Allerdings wirkt die gleichzeitige GM-CSF-Induktion hemmend auf die IL-12p40-Produktion (Tada *et al.*, 2000), und TGF- $\beta$ 1 antagonisiert den durch TNF- $\alpha$  induzierten Reifungsprozess der LCs (Bechetoille *et al.*, 2006). Außerdem führt TNF- $\alpha$  zu einer verminderten Apoptose der LCs (Berthier-Vergnes, 2005), sodass Tumorzellen unkontrolliert proliferieren können. Des Weiteren verhindert eine Überexpression von GM-CSF eine Akutphasereaktion nach UV-B-Bestrahlung. Somit können mehr Tumorzellen unkontrolliert proliferieren. In der Haut der Tiere mit verminderter GM-CSF-Aktivität konnte keine durch UV-B induzierte Expression der immunsuppressiven Zytokine (IL-10, IL-4, TNF- $\alpha$ ) festgestellt werden. Dies ist mit Sicherheit ein weiterer Grund für den besseren konstitutionellen Zustand sowie das verzögerte Auftreten von Karzinomen in der Haut dieser Tiere. Interessanterweise kann man auch bei diesen Tieren keine Induktion von IL-12p40 feststellen, obwohl bekannt ist, dass GM-CSF die IL-12p40-Produktion der LCs hemmt (Tada *et al.*, 2000) und dass IL-12p40 die UV-B-induzierte Immunsuppression antagonisiert. Zum einen reguliert es die  $T_{h1}$ - $T_{h2}$ -Balance in Richtung  $T_{h1}$  (Schmitt *et al.*, 1995; D'Andrea *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 1995; Schwarz *et al.*, 1996; Schwarz, 2005), zum anderen induziert es DNA-Reparatur-Mechanismen (Meeran *et al.*, 2006a; Maeda *et al.*, 2006).

#### **4.4.1 Die Rolle von TGF- $\beta$ 1 in der UV-B-induzierten Hautkarzinogenese**

TGF- $\beta$ 1 reguliert die zelluläre Proliferation, Differenzierung, Angiogenese, Chemotaxis, Zellmigration, Matrixbildung und Immun- Entzündungsantworten (Sellheyer *et al.*, 1993; O'Kane und Ferguson, 1997; Derynck und Zhang, 2003; Siegel und Massague, 2003). So wirkt es zum Beispiel auf Epithelzellen stark antiproliferativ. Mesenchymale Zellen regt es zur Fibrogenese an (Branton und Kopp, 1999; Reiss, 1999). Es moduliert Entzündungsreaktionen (Shull *et al.*, 1992; Kulkarni *et al.*, 1993) und die Suszeptibilität von Zellen gegenüber einer Apoptoseinduktion (Branton und Kopp, 1999; Reiss, 1999; Wahl, 1999; Wahl *et al.*, 2000). In Abhängigkeit vom Grad der epidermalen Zelldifferenzierung, der

Höhe der TGF- $\beta$ 1-Expression oder der Dauer des Zytokinsignals kommt es jedoch zu gegensätzlichen Effekten von TGF- $\beta$ 1 auf Proliferation und Apoptose (Cui *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997; 1999; Liu *et al.*, 2001). So führt zum Beispiel die Expression von TGF- $\beta$ 1 in den suprabasalen Schichten der Epidermis zur Erhöhung der mitotischen Indizes (Cui *et al.*, 1995, Fowlis *et al.*, 1996). Eine Hochregulation von TGF- $\beta$ 1 in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere auf mRNA-Ebene wurde schon nachgewiesen (Breuhahn *et al.*, 2000), konnte mittels *Microarray-Analyse* und *Real-Time-PCR* bestätigt und zusätzlich auf Proteinebene gezeigt werden. TGF- $\beta$ 1 trägt bei diesen Tieren zur Aufrechterhaltung der Homöostase in der Haut bei, indem es inhibitorisch auf die von GM-CSF stimulierte Zellproliferation wirkt. Nach UV-B-Bestrahlung scheint dieser Regelkreislauf jedoch nicht zu funktionieren: TGF- $\beta$ 1 wird zwar zeitgleich mit GM-CSF induziert (96 Stunden nach der akuten UV-B-Bestrahlung), ist jedoch nicht in der Lage, die durch GM-CSF verursachte Prolongation der Keratinozytenproliferation zu inhibieren. Möglicherweise führt UV-B-Bestrahlung in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere zu einer Art Resistenz der Keratinozyten auf TGF- $\beta$ 1-Signale. So weisen transgene Tiere, deren TGF- $\beta$ -Signalweg gestört ist, zum einen eine reduzierte Keratinozytenapoptose und während der Tumorpromotion zum anderen eine erhöhte Proliferation auf (Amendt *et al.*, 1998; 2002). Aufgrund der Komplexität der TGF- $\beta$ 1-Funktion in der epidermalen Homöostase ist es vorstellbar, dass seine Induktion in der unbestrahlten Haut der transgenen Antagonistenlinie eine GM-CSF kompensierende Funktion ausübt.

#### 4.4.2 Identifizierung von Zielgenen von GM-CSF in der unbestrahlten Haut

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mittels eines *low-density-cDNA-Microarrays* mit zirka 300 Genen und der Verifizierung durch die *Real-Time-PCR* für TGF- $\beta$ 1 und BMP-9 eine Regulation in der Haut beider transgener Mauslinien festgestellt werden. Keratin 6 zeigte bei den GM-CSF überexprimierenden Tieren eine leichte Erhöhung der Expression. Die geringe Anzahl von GM-CSF-Zielgenen, die sich aus der *Microarray-Analyse* ergab, ist Folge der Komplexität bezüglich der Probengenerierung, Herstellung des Arrays, Markierung der Sonden, Hybridisierung dieser auf den Array und der Auswertung und Verifizierung der Ergebnisse. So stammten die ausgewählten cDNA-Bereiche sowohl aus dem translatierten (Sonden aus den Arbeiten von Dr. Amrit Mann und

Dr. Christiane Amendt) als auch aus dem 3'-untranslatierten Bereich (von der Firma GENterprise, Mainz generierte Sonden) der jeweiligen Gensequenzen. In der Regel generiert man die cDNA-Sonden für einen *Microarray* aus dem 3'-untranslatierten Bereich, da dieser die größte Diversität aufweist und auf diese Weise sogar sich wenig unterscheidende Mitglieder einzelner Genfamilien voneinander abgegrenzt werden können (Dorris *et al.*, 2002). Dies beinhaltet auch die Vermeidung von Domänenstrukturen und repetitiven Sequenzen. Die Sonden aus den Arbeiten von Dr. Christiane Amendt und Dr. Amrit Mann waren jedoch in früheren Versuchen (Amendt *et al.*, 1998; Breuhahn *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2001) bereits etabliert und im *Northern Blot* überprüft und sollten so auch für *Microarray*-Experimente geeignet sein. Über BLAST (Altschul *et al.*, 1990) wurden Sequenzhomologien zu anderen Genen, repetitiven Sequenzen oder Domänenstrukturen ausgeschlossen.

Ein weiterer kritischer Faktor der *Microarray*-Analyse ist die Menge an Sondenmaterial, die auf das Substrat (hier: Glas) gespottet wird. Dies kann limitierend für die auf dem Glas detektierbare Signalstärke sein und so die Sensitivität der Messungen beeinflussen. Die Konzentration, Menge und Größe der Sonden in der vorliegenden Arbeit basierte auf Versuchen von Frank Diehl *et al.* am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg (Diehl *et al.*, 2001). Die direkte Markierung der cDNA erfolgte mit den Cy3- und Cy5-Fluorophoren (Amersham) über eine reverse Transkriptionsreaktion. Dabei ist eine ausgewogene Inkorporation der Farbstoffe nötig, da eine zu hohe Farbstoffinkorporation (spezifische Aktivitäten  $> 1$  Farbstoffmolekül/20 Nukleotiden) zu einer signifikanten Destabilisierung der Hybridisierungsduplex (Randolph und Waggoner, 1997) und somit zu einem verminderten Hybridisierungssignal im Vergleich zu einer Probe mit einer moderaten Farbstoffinkorporation führt (Worley *et al.*, 2000). Eine zu geringe spezifische Aktivität ( $< 1$  Farbstoffmolekül/100 Nukleotiden) führt zu einem sehr schwachen Hybridisierungssignal (Worley *et al.*, 2000). Speziell für Cy5 ist zu beachten, dass es anfälliger für Degradation ist und weniger gut eingebaut wird als Cy3 (Skena und Davis, 2000). Auch in den Versuchen, die hier beschrieben wurden, wurde Cy3 wesentlich besser inkorporiert als Cy5, was an der stärkeren Grünfärbung zu sehen war. Durch die Normalisierung mittels  $z$  *Score*-Transformation konnte dies jedoch ausgeglichen werden. Keratin 6 wird zusammen mit Keratin 16 in Stresssituationen, z.B. nach Verwundungen, in der Epidermis und in Haarfollikeln exprimiert (Martin, 1997; Fuchs und Cleveland, 1998).

Die *Microarray*-Analyse ergab eine Hochregulation von Keratin 6 in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere. Da auf Proteinebene keine erhöhte Keratin 6-Expression festgestellt wurde (Breuhahn *et al.*, 2000), wird postuliert, dass GM-CSF in diesen Tieren zwar zu einer erhöhten Produktion der Keratin 6-mRNA führt, was in Übereinstimmung mit Studien steht, nach denen GM-CSF zu einer Induktion von Keratin 6 führt (Kaplan *et al.*, 1992; Braunstein *et al.*, 1994; Xing *et al.*, 1997), gleichzeitig jedoch posttranskriptionelle Kontrollmechanismen eine fundamentale regulatorische Funktion ausüben (Blessing *et al.*, 1987; Lersch *et al.*, 1989; Stellmach und Fuchs, 1989).

BMP-9 und TGF- $\beta$ 1 gehören zur großen TGF- $\beta$ -Multigenfamilie, zu der neben den drei bei Säugetieren vorkommenden Isoformen TGF- $\beta$ 1, 2 und 3, auch die Aktivine, die GDFs (*growth and differentiation factors*), der Müllerfaktor (Kingsley, 1994) und die BMPs (*bone morphogenetic proteins*) gehören. BMPs sind dimere Proteine, für die ihre Fähigkeit, ektope Knochenbildung nach subdermaler Injektion zu induzieren, charakteristisch ist (Wozney und Rosen, 1988; Reddi, 1997). BMP-Signalwege sind für einen Organismus während der Entwicklung und/oder des Wachstums wichtig. Allerdings konnte BMP-9 bislang nur in der Leber von adulten Mäusen bzw. Ratten nachgewiesen werden. Es wird dort hauptsächlich von den Sternzellen exprimiert (Miller *et al.*, 2000). Dazu konträr sind die Ergebnisse dieser Arbeit, die mittels *Microarray*-Analyse und *Real-Time*-PCR eine Expression von BMP-9 in der Haut sowohl der Kontrollgruppe als auch beider transgener Linien nachweisen. Eine mögliche Begründung für diese gegensätzlichen Ergebnisse ist der unterschiedliche genetische Hintergrund bzw. die Verwendung unterschiedlicher Tierarten (Maus versus Ratte). Es ist bekannt, dass BMP-9 im TGF- $\beta$ 1-Regelkreislauf von Bedeutung ist (Attisano und Lee-Hoeflich, 2001). Daraus abgeleitet ist es denkbar, dass die Hochregulation von TGF- $\beta$ 1 bei den transgenen Tieren in Verbindung mit der Herunterregulation von BMP-9 steht.

## 5. Zusammenfassung

UV-B-Strahlung, die durch die fortschreitende Zerstörung der Ozonschicht zunimmt, ist hauptsächlich für das Entstehen von Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen verantwortlich, an denen jedes Jahr etwa 2 bis 3 Millionen Menschen weltweit erkranken. UV-B induzierte Hautkarzinogenese ist ein komplexer Prozess, bei dem vor allem die mutagenen und immunsuppressiven Wirkungen der UV-B-Strahlung von Bedeutung sind. Die Rolle von GM-CSF in der Hautkarzinogenese ist dabei widersprüchlich. Aus diesem Grund wurde die Funktion von GM-CSF *in vivo* in der UV-B-induzierten Hautkarzinogenese mittels zwei bereits etablierter Mauslinien untersucht: 1.) transgene Mäuse, die einen GM-CSF-Antagonisten unter der Kontrolle des Keratin-10-Promotors in den suprabasalen Schichten der Epidermis exprimieren, und 2.) solche, die unter dem Keratin-5-Promotor murines GM-CSF in der Basalschicht der Epidermis überexprimieren. Eine Gruppe von Tieren wurde chronisch, die andere akut bestrahlt. Die konstitutionelle Verfassung der Tiere mit erhöhter GM-CSF-Aktivität in der Haut war nach chronischer UV-B-Bestrahlung insgesamt sehr schlecht. Sie wiesen deshalb eine stark erhöhte Mortalität auf. Dies ist sowohl auf die hohe Inzidenz als auch das frühe Auftreten der benignen und malignen Läsionen zurückzuführen. Eine verminderte GM-CSF-Aktivität verzögerte dagegen die Karzinomentwicklung und erhöhte die Überlebensrate leicht. GM-CSF wirkt auf verschiedenen Ebenen tumorpromovierend: 1.) erhöht eine gesteigerte Mastzellanzahl in der Haut der GM-CSF überexprimierenden Tiere *per se* die Suszeptibilität für Hautkarzinogenese. 2.) stimuliert GM-CSF die Keratinozytenproliferation. Dadurch kommt es nach UV-B-Bestrahlung zu einer prolongierten epidermalen Hyperproliferation, die zur endogenen Tumorpromotion beiträgt, indem sie die Bildung von Neoplasien unterstützt. Der Antagonist verzögert dagegen den Proliferationsbeginn, die Keratinozyten bleiben demzufolge länger in der G<sub>1</sub>-Phase und der durch UV-B verursachte DNA-Schaden kann effizienter repariert werden. 3.) kann GM-CSF die LCs nicht als APCs aktivieren und eine Antitumorimmunität induzieren, da UV-B-Strahlung zur Apoptose von LCs bzw. zu deren Migration in Richtung Lymphknoten führt. Zusätzlich entwickeln GM-CSF überexprimierende Tiere in ihrer Haut nach UV-B-Bestrahlung ein Milieu von antagonistisch wirkenden Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-12p40 und GM-CSF, die proinflammatorische Prozesse und somit die Karzinomentwicklung begünstigen. Der Antagonist hemmt nach UV-B-Bestrahlung die Ausschüttung sowohl von immunsuppressiven



Zytokinen, wie etwa TNF- $\alpha$ , als auch von solchen, die die T<sub>h</sub>2-Entwicklung unterstützen, wie etwa IL-10 und IL-4. Dies wirkt sich negativ auf die Karzinomentwicklung aus.

UV-B-radiation which is increasing due to the progressive depletion of the ozone layer is mainly responsible for the formation of basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of which 2-3 million human beings are affected every year.

UV-B induced skin carcinogenesis is a complex process in which mainly the mutagenous and immunosuppressive effects of UV-B-radiation are important. The role of GM-CSF in skin carcinogenesis is contradictory. For that reason the function of GM-CSF in the UV-B-induced skin carcinogenesis was examined *in vivo* by means of two already established mice strains: Firstly transgene mice, which overexpress a GM-CSF antagonist under the control of the keratin-10-promotor in the suprabasal layer of their epidermis and secondly mice, which overexpress murine GM-CSF under the control of the keratin-5-promotor in the basal layer of their epidermis. One group of mice was radiated chronically, the other one was radiated acutely. As the physical constitution was generally very bad of the mice with an increased activity of GM-CSF in the skin after chronic UV-B-radiation their mortality increased. It must be attributed to the high level and the early appearance of both benign and malign lesions whereas a decreased GM-CSF activity led to a delayed development of carcinoma and to a lightly increased survival rate. GM-CSF promotes tumour growth in different ways: First the higher level of mast cells in the skin of GM-CSF overexpressing animals increases *per se* the susceptibility for skin carcinogenesis. Second GM-CSF stimulates the proliferation of keratinocytes which leads to a prolonged epidermal hyperproliferation after UV-B-radiation. This contributes to an endogenous tumour promotion by supporting the creation of neoplasias. On the other hand the beginning of proliferation is delayed by the antagonist. According to that the keratinocytes remain more time in the G1-phase of the cycle and therefore DNA-damage caused by UV-B-radiation can be repaired more efficiently. Third GM-CSF is not able to activate Langerhans cells (LC) to an antigen presenting cell state to induce antitumourimmunity, because UV-B-radiation leads to apoptosis or migration of LCs directing the lymphatic node. In addition to that - after UV-B-radiation - mice overexpressing GM-CSF develop an environment of antagonistically working cytokines like TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-12p40 and GM-CSF in their skin. These ones facilitate proinflammatory processes and thus the development of carcinoma. After UV-B-radiation the antagonist inhibits the release of immunosuppressive cytokines like TNF- $\alpha$  and the release of those, which support the Th2-

development like IL-10 und IL-4. This has a negative effect on the development of carcinoma.

## A. Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Murphy, K. M. und Sher, A.** (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **31**, 787-793.
- Aberer, W., Schuler, G., Stingl, G., Honigsmann, H. und Wolff, K.** (1981). Ultraviolet light depletes surface markers of Langerhans cells. *J Invest Dermatol* **76**, 202-210.
- Aberer, W., Romani, N., Elbe, A. und Stingl, G.** (1986). Effects of physiochemical agents on murine epidermal Langerhans cells and Thy-1 positive dendritic epidermal T cells. *J Immunol* **136**, 1210-1216.
- Adachi, T. und Alam, R.** (1998). The mechanism of IL-5 signal transduction. *Am J Physiol* **275**, 623-633.
- Alonso, S., Minty, A., Bourlet, Y. und Buckingham, M.** (1996). Comparison of three actin-coding sequences in the mouse; evolutionary relationships between the actin genes of warm-blooded vertebrates. *J Mol Evol* **23**, 11-22.
- Altmann, S. W. und Kastelein, R. A.** (1995). Rational design of a mouse granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor antagonist. *J Biol Chem* **270**, 2233-2240.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Amendt, C., Schirmacher, P., Weber, H., und Blessing, M.** (1998). Expression of a dominant negative type II TGF- $\beta$  receptor in mouse skin results in an increase in carcinoma incidence and an acceleration of carcinoma development. *Oncogene* **17**, 25-34.
- Amendt, C., Mann, A. Schirmacher, P. und Blessing, M.** (2002). Resistance of keratinocytes to TGF $\beta$ -mediated growth restriction and apoptosis induction accelerates re-epithelialization in skin wounds. *J Cell Science* **115**, 2189-2198.
- Ananthaswamy, H. N.** (1997). Ultraviolet light as a carcinogen. In: Bowden, G. T. und Fischer, S. M. (Eds.), *Comprehensive Toxicology, Chemical Carcinogens und Anticarcinogens, vol. 12*. Pergamon, Oxford, U. K., 255-279.
- Ananthaswamy, H. N., Loughlin, S. M., Cox, P., Evans, R. L., Ullrich, S. E. und Kripke, M. L.** (1997). Sunlight and skin cancer: inhibition of p53 mutations in UV-irradiated mouse skin by sunscreens. *Nature Med* **3**, 510-514.
- Ansel, J. C., Luger, T. A., Lowry, D., Perry, P., Roop, D. R. und Mountz, J. D.** (1988). The expression und modulation of IL-1 alpha in murine keratinocytes. *J Immunol* **140**, 2274-2278.
- Aragane, Y., Kulms, D., Metz, D., et al.** (1998). Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* **140**, 171-182.
- Araneo, B. A., Dowell, T., Moon, H. B. und Daynes, R. A.** (1989). Regulation of murine lymphokine production *in vivo*. Ultraviolet radiation exposure depresses IL-2 und enhances IL-4 production by T cells through an IL-1-dependent mechanism. *J Immunol* **143**, 1737-1744.

- Arnold, R., Seifert, M., Asadullah, K. und Volk, H. D.** (1999). Crosstalk between keratinocytes and T lymphocytes via Fas/Fas Ligand Interaction: Modulation by Cytokines. *J Immunol* **162**, 7140-7147.
- Attisano, L. und Lee-Hoeflich, S.** (2001). The Smads. *Genome Biol* **2**, 3010.
- Baadsgaard, O., Salvo, B., Mannie, A., Dass, B., Fox, D. A. und Cooper, K. D.** (1990). *In vivo* ultraviolet-exposed human epidermal cells activate T suppressor cell pathways that involve CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> suppressor-inducer T cells. *J Immunol* **145**, 2854-2861.
- Bagby, G. C., Jr., Dinarello, C. A., Wallace, P., Wagner, C., Hefeneider, S. und McCall, E.** (1986). Interleukin 1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **78**, 1316-1323.
- Banchereau, J. und Steinmann, R. M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Basu, S., Dunn, A. R., Marino, M. W., Savoia, H., Hodgson, G., Lieschke, G. J. und Cebon, J.** (1997). Increased tolerance to endotoxin by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol* **159**, 1412-1417.
- Bechetoille, N., Andre, V., Valladeau, J., Perrier, E. und Dezutter-Dambuyant, C.** (2006). Mixed Langerhans cell and interstitial/dermal dendritic cell subsets emanating from monocytes in T<sub>H</sub>2-mediated inflammatory conditions respond differently to proinflammatory stimuli. *J Leukoc Biol* **80**, 45-58.
- Beissert S., Mohammad T., Torri H., Lonati A., Yan Z., Morrison H. und Granstein R. D.** (1997). Regulation of tumor antigen presentation by urocanic acid. *J Immunol* **159**, 92-96.
- Beissert, S., Rühlemann, D., Mohammad, T., Grabbe, S., El-Ghorr, A., Norval, M., Morrison, H., Granstein, R. D. und Schwarz, T.** (2001). IL-12 prevents the inhibitory effects of cis-urocanic acid on tumor antigen presentation by langerhans cells: Implications for photocarcinogenesis. *J Immunol* **167**, 6232-6238.
- Beissert, S., Schwarz, A. und Schwarz, T.** (2006). Regulatory T cells. *J Invest Dermatol* **126**, 15-24.
- Berdel, W. E., Danhauser-Riedl, S., Steinhäuser, G. und Winton, E. F.** (1989). Various human hematopoietic growth factors (interleukin-3, GM-CSF, G-CSF) stimulate clonal growth of nonhematopoietic tumor cells. *Blood* **73**, 80-83.
- Berthier-Vergnes, O., Bermond, F., Flacher, V., Massacrier, C., Schmitt, D. und Peguet-Navarro, J.** (2005). TNF- $\alpha$  enhances phenotypic and functional maturation of human epidermal Langerhans cells and induces IL-12 p40 and IP-10/CXCL-10 production. *FEBS Lett* **579**, 3660-3668
- Berton, T. R., Mitchell, D. L., Fischer, S. M. und Locniskar, M. F.** (1997). Epidermal proliferation but not quantity of DNA photodamage is correlated with UV-induced mouse skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* **109**, 340-347.
- Bhatia, K., Huppi, K., Siwarski, D., Mushinski, J. F. und Magrath, I.** (1992). Mouse bcl-3: cDNA structure, mapping and stage dependent expression in B lymphocytes. *Oncogene* **6**, 1569-1573.

- Bikfalvi, A. und Han, Z. C.** (1994). Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa. *Leukemia (Baltimore)* **8**, 523-529.
- Birnboim, H. C. und Doly, J.** (1979). Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* **7**, 1513-1523.
- Blessing, M., Zentgraf, H. und Jorcano, J. L.** (1987). Differentially expressed bovine cytokeratin genes. Analysis of gene linkage and evolutionary conservation of 5'-upstream sequences. *The EMBO J* **6**, 567-575.
- Bradley, T. R. und Metcalf, D.** (1966). The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med Sci* **44**, 287-299.
- Branton, M. H. und Kopp, J. B.** (1999). TGF-beta and fibrosis. *Microbes Infect* **1**, 1349-1365.
- Brash, D. E., Rudolph, J. A., Simon, J. A., Lin, A., McKenna, G. J., Baden, H. P., Halperin, A. J. und Ponten, J.** (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10124-10128.
- Brash, D. E., Ziegler, A., Jonason, A. S., Simon, J. A., Kunala, S. und Leffell, D. J.** (1996). Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Invest Dermatol Symp Proc* **1**, 136-142.
- Braunstein, S., Kaplan, G., Gottlieb, A. B., Schwartz, M., Walsh, G., Abalos, R. M., Fajardo, T. T., Guido, L. S. und Krueger, J. G.** (1994). GM-CSF activates regenerative epidermal growth and stimulates keratinocyte proliferation in human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* **103**, 601-604.
- Breuhahn, K., Mann, A., Muller, G., Wilhelmi, A., Schirmacher, P., Enk, A. und Blessing, M.** (2000). Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. *Cell Growth Differ* **11**, 111-121.
- Brissette, W. H., Baker, D. A., Stam, E. J., Umlund, J. P. und Griffith, R. J.** (1995). GM-CSF rapidly primes mice for enhanced cytokine production in response to LPS und TNF. *Cytokine* **7**, 291-295.
- Bronte, V., Chappell, D. B., Apolloni, E., Cabrelle, A., Wang, M., Hwu, P. und Restifo, N. P.** (1999). Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8<sup>+</sup> T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* **162**, 5728-5737.
- Bussolino, F., Wang, J. M., Defilippi, P., Turrini, F., Sanavio, F., Edgell, C. J., Aglietta, M., Arese, P. und Mantovani, A.** (1989). Granulocyte- und granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate und proliferate. *Nature* **337**, 471-473.
- Bussolino, F., Colotta, F., Bocchietto, E., Guglielmetti, A. und Mantovani, A.** (1993). Recent developments in the cell biology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor und granulocyte colony-stimulating factor: activities on endothelial cells. *Int J Clin Lab Res* **23**, 8-12.
- Cariccio, R., McPhie, L. und Cohen, P. L.** (2003). Ultraviolet B radiation-induced cell death: critical role of ultraviolet dose in inflammation und lupus autoantigen redistribution. *J Immunol* **171**, 5778-5786.

- Casatorres, J., Navarro, J. M., Blessing, M. und Torcano, J. L.** (1994). Analysis of the control of expression and tissue specificity of the keratin 5 gene, characteristic of basal keratinocytes. Fundamental role of an AP-1 element. *J Biol Chem* **269**, 20489-20496.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. und Banchereau, J.** (1992). GM-CSF und TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-261.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Dezutter-Dambuyant, C., de Saint-Vis, B., Jacquet, C., Yoneda, K., Imamura, S., Schmitt, D. und Banchereau, J.** (1996). CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* **184**, 695-706.
- Celeste, A.** (1999). Direct Submitted in PubMed.
- Cheadle, C.** (2003). Analysis of Microarray Data Using Z Score Transformation. *J Molecular Diagnostics* **5**, 73-81.
- Cheng, S. C., Prakash, A. S., Pigott, M. A., Hilton, B. D., Lee, H., Harvey, R. G. und Dipple, A.** (1988). A metabolite of the carcinogen 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene that reacts predominantly with adenine residues in DNA. *Carcinogenesis* **9**, 1721-1723.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.
- Cline, M. J. und Golde, D. W.** (1974). Production of colony-stimulating activity by human lymphocytes. *Nature* **248**, 703-704.
- Cook, A. D., Braine, E. L. und Hamilton, J. A.** (2004). Stimulus-dependent requirement for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in inflammation. *J Immunol* **173**, 4643-4651.
- Cooper, K. D., Duraiswamy, N., Hammerberg, C., Allen, E., Kimbrough-Green, C., Dillon, W. und Thomas, D.** (1993). Neutrophils, differentiated macrophages, and monocyte/makrophage antigen presenting cells infiltrate murine epidermis after UV-injury. *J Invest Dermatol* **101**, 155-163.
- Cox, N. H., Diffey, B. L. und Farr, P. M.** (1992). The relationship between chronological age and the erythral response to ultraviolet B radiation. *Br J Dermatol* **126**, 315-319.
- Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H. und Reid, B. J.** (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* **267**, 1353-1356.
- Cruz, P. D., Nixon-Fulton, J., Tigelaar, R. E. und Bergstresser, P. R.** (1989). Disparate effects of *in vitro* low-dose UVB irradiation on intravenous immunizations with purified epidermal cell subpopulations for the induction of contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* **92**, 160-165.
- Cui, W., Fowles, D. J., Cousins, F. M., Duffie, E., Bryson, S., Balmain, A. und Akhurst, R. J.** (1995). Concerted action of TGF-beta 1 and its type II receptor in control of epidermal homeostasis in transgenic mice. *Genes Dev* **9**, 945-955.
- Dai, R. und Streilein, J. W.** (1995). Sensitizing capacity of Langerhans cells obtained from ultraviolet-B-exposed murine skin. *Immunology* **86**, 661-667.

- D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N. M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S. H., Kobayashi, M., Young, D., Nickbarg, E., et al.** (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* **176**, 1387-1398.
- D'Andrea, A., Aste-Amezaga, N., Valiante, M., Ma, X., Kubin, M. und Trinchieri, G.** (1993). Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon  $\gamma$ -production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* **178**, 1041-1048.
- D'Andrea, A., Ma, X., Aste-Amezaga, M., Paganin, C. und Trinchieri, G.** (1995). Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* **181**, 537-546.
- Daniels, F., Brophy, D. und Lobitz, W. C.** (1961). Histochemical responses of human skin following ultraviolet irradiation. *J Invest Dermatol* **37**, 351-357.
- Dedhar, S., Gaboury, L., Galloway, P. und Eaves, C.** (1988). Human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a growth factor active on a variety of cell types of nonhemopoietic origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9253-9257.
- DeFabo, E. C. und Noonan, F. P.** (1983). Mechanisms of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo: I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin und its role in photoimmunology. *J Exp Med* **158**, 84-92.
- De Groot, R. P., Coffey, P. J. und Koenderman, L.** (1998). Regulation of proliferation, differentiation und survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. *Cell Signal* **9**, 619-628.
- De Grujil, F. R.** (2002). p53 mutations as a marker of skin cancer risk: comparison of UVA und UVB effects. *Exp Dermatology* **11**, 37-39.
- De Grujil, T. D., Sombroek, C. C., Lougheed, S. M., Oosterhoff, D., Buter, J., van den Eertwegh, A. J., Scheper, R. J. und Pinedo, H. M.** (2006). A postmigrational switch among skin-derived dendritic cells to a macrophage-like phenotype is predetermined by the intracutaneous cytokine balance. *J Immunol* **176**, 7232-7242.
- De Laat, A., Kroon, E. D. und de Grujil, F. R.** (1997). Cell cycle effects and concomitant p53 expression in hairless murine skin after longwave UVA (365 nm) irradiation: a comparison with UVB irradiation. *Photochem Photobiol* **65**, 730-735.
- Denfeld, R. W., Tesmann, J. P., Dittmar, H., Weiss, J. M., Schopf, E., Weltzien, H. U. und Simon, J. C.** (1998). Further characterization of UVB radiation effects on Langerhans cells: altered expression of the costimulatory molecules B7-1 und B7-2. *Photochem Photobiol* **67**, 554.
- Denfeld R. W., Hara H., Tesmann J. P., Martin S. und Simon J. C.** (2001). UVB-irradiated dendritic cells are impaired in their APC function und tolerize primed  $T_H1$  cells but not naive  $CD4^+$  T cells. *J Leukoc Biol* **69**, 548-554.
- Derynck, R., Jarrett, J. A., Chen, E. Y. und Goeddel, D. V.** (1986). The murine transforming growth factor-beta precursor. *J Biol Chem* **261**, 4377-4379.



- Derynck, R. und Zhang, Y. E.** (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta signalling. *Nature* **425**, 577-584.
- Dibbert, B., Daigle, I., Braun, D., Schranz, C., Weber, M., Blaser, K., Zangemeister-Wittke, U., Akbar, A. N. und Simon, H. U.** (1998). Role for Bcl-xL in delayed eosinophil apoptosis mediated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5. *Blood* **92**, 778-783.
- Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M. und Hoheisel, J. D.** (2001). Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res* **29**, 7.
- DiGiovanni, J.** (1992). Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther* **54**, 63-128.
- DiGiovanni, J., Walker, S. E., Aldaz, C. M., Slaga, T. J. und Conti, C. J.** (1993). Further studies on the influence of initiation dose on papilloma growth and progression during two-stage carcinogenesis in SENCAR mice. *Carcinogenesis* **14**, 1831-1836.
- Di Nuzzo, S., Sylva-Steenlund, R. M. R., de Rie, M. A., Das, P. K., Bos, J. D. und Teunissen, M. B. M.** (1998). UVB radiation preferentially induces recruitment of memory CD4<sup>+</sup> T cells in normal human skin: long term effect after a single exposure. *J Invest Dermatol* **110**, 978-981.
- Donahue, R. E., Wang, E. A., Stone, D. K., Kamen, R., Wong, G. G., Sehgal, P. K., Nathan, D. G. und Clark, S. C.** (1986). Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature* **321**, 872-875.
- Dorris, D., Ramakrishnan, R., Sendera, T., Magnuson, S. und Mazumder, A.** (2002). Oligonucleotide array Technologies for Gene Expression Profiling. In: *DNA Arrays; Technologies and Experimental Strategies* (ed. by Elen V. Grigorenko); CRC Press.
- Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., Golumbek, P., Levitsky, H., Brose, K., Jackson, V., Hamada, H., Pardoll, D. und Mulligan, R. C.** (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3539-3543.
- Duan, R., Remeijer, L., van Dun, J. M., Osterhaus, A. D. und Verjans, G. M.** (2007). Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Expression in Human Herpetic Stromal Keratitis: Implications for the Role of Neutrophils in HSK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**, 277-284.
- Duthie, M. S., Kimber, I. und Norval, M.** (1999). The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol* **140**, 995-1009.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Waldman, T., Velculescu, V., Oliner, J. D., Burrell, M., Hill, D. E., Rees, J. L., Hamilton, S. R., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** (1995). Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* **55**, 2910-2919.
- Elmets, C. A., Bergstresser, P. R., Tigelaar, R. E., Wood, P. J. und Streilein, J. W.** (1983). Analysis of the mechanism of unresponsiveness produced by haptens painted on skin exposed to low dose ultraviolet radiation. *J Exp Med* **158**, 781-794.

- El Saghir, N. S., Bizri, A. R., Shabb, N. S., Husami, T. W., Salem, Z. und Shamseddine, A. I.** (1997). Pressure ulcer accelerated healing with local injections of granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Infect* **35**, 179-182.
- Ely, J. O. und Ross, M. H.** (1949). Absorption of light by living cells. *Nature* **163**, 906.
- Enk, A. H., Saloga, J., Becker, D., Mohamadzadeh, M. und Knop, J.** (1994). Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 *in vivo*. *J Exp Med* **179**, 1397-1402.
- Fears, T. R., Scotto, J. und Schneidermann, M. A.** (1977). Mathematical models of age and ultraviolet effects on the incidence of skin cancer among whites in the United States. *Am J Epidermiol* **105**, 420-427.
- Fialkow, L., Wang, Y. und Downey, G. P.** (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radic Biol Med* **42**, 153-164.
- Fibbe, W. E., Kluck, P. M., Duinkerken, N., Voogt, P. J., Willemze, R. und Falkenburg, J. H.** (1988). Factors influencing release of granulocyte-macrophage colony-stimulating activity from human mononuclear phagocytes. *Eur J Haematol* **41**, 352-358.
- Fleischmann, J., Golde, D. W., Weisbart, R. H. und Gasson, J. C.** (1986). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances phagocytosis of bacteria by human neutrophils. *Blood* **68**, 708-711.
- Fowles, D. J., Cui, W., Johnson, S. A., Balmain, A. und Akhurst, R. J.** (1996). Altered epidermal cell growth control *in vivo* by inducible expression of transforming growth factor beta 1 in the skin of transgenic mice. *Cell Growth Differ* **7**, 679-687.
- Freedman, M. H., Grunberger, T., Correa, P., Axelrad, A. A., Dube, I. D. und Cohen, A.** (1993). Autocrine und paracrine growth control by granulocyte-monocyte colony-stimulating factor of acute lymphoblastic leukaemia cells. *Blood* **81**, 3068-3075.
- Fuchs, E. und Green, H.** (1980). Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* **19**, 1033-1042.
- Fuchs, E. und Cleveland, D. W.** (1998). A structural scaffolding of intermediate filaments in health disease. *Science* **279**, 514-519.
- Fürstenberger, G., Krieg, P., Schnapke, R., Feil, S. und Marks, F.** (1993). The role of endogenous factors in skin carcinogenesis. In Hecker, E., Jung, E. G., Marks, F., Tilgen, W.: "Skin carcinogenesis in man and in experimental models." Springer Verlag. *Recent Results in Cancer Research* **128**, 323-338.
- Fujisawa, H., Wang, B., Kondo, S., Shivji, G. M. und Sauder, D. N.** (1997). Costimulation with ultraviolet B und interleukin-1 alpha dramatically increase tumor necrosis factor-alpha production in human dermal fibroblasts. *J Interferon Cytokine Res* **17**, 307-313.
- Gallo, R. L., Staszewski, R., Sauder, D. N., Knisely, T. L. und Granstein, R. D.** (1991). Regulation of GM-CSF and IL-3 production from the murine keratinocyte cell line PAM 212 following exposure to ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* **97**, 203-209.

- Gamble, J. R., Elliott, M. J., Jaipargas, E., Lopez, A. F. und Vadas, M. A.** (1989). Regulation of human monocyte adherence by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7169-7173.
- Gasson, J. C.** (1991). Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **77**, 1131-1145.
- Gasson, J. C., Weisbart, R. H., Kaufmann, S. E., Clark, S. C., Hewick, R. M., Wong, G. G. und Golde, D. W.** (1984). Purified human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: direct action on neutrophils. *Science* **226**, 1339-1342.
- Ghosh, G., van Duyne, G., Ghosh, S. und Sigler, P. B.** (1995). Structure of NF-kappa B p50 homodimer bound to a kappa B site. *Nature* **373**, 303-310.
- Ghosh, S., Gifford, A. M., Riviere, L. R., Tempst, P., Nolan, G. P. und Baltimore, D.** (1990). Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF-kappa-B: Homology to rel and dorsal. *Cell* **62**, 1019-1029.
- Gonzalez-Garcia, M., Perez-Ballester, R., Ding, L., Duan, L., Boise, L. H., Thompson, C. B. und Nunez, G.** (1994). Bcl-X<sub>L</sub> is the major bcl-x mRNA form expressed during murine development and its product localizes to mitochondria. *Development (Camb)* **120**, 3033-3042.
- Gough, N. M., Gough, J., Metcalf, D., Kelso, A., Grail, D., Nicola, N. A., Burgess, A. W. und Dunn, A. R.** (1984). Molecular cloning of cDNA encoding a murine haematopoietic growth regulator, granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Nature* **309**, 763-767.
- Griffin, J. D., Spertini, O., Ernst, T. J., Belvin, M. P., Levine, H. B., Kanakura, Y. und Tedder, T. F.** (1990). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor und other cytokines regulate surface expression of the leukocyte adhesion molecule-1 on human neutrophils, monocytes, und their precursors. *J Immunol* **145**, 576-584.
- Grumont, R. J. und Gerondakis, S.** (1989). Structure of a mammalian c-rel protein deduced from the nucleotide sequence of murine cDNA clones. *Oncogene* **4**, 1-8.
- Guthridge, M. A., Stomski, F. C., Thomas, D., Woodcock, J. M., Bagley, C. J., Berndt, M. C. und Lopez, A. F.** (1998). Mechanism of activation of the GM-CSF, IL-3, und IL-5 family of receptors. *Stem cells* **16**, 301-313.
- Gutierrez-Steil, C., Wrone-Smith, T., Sun, X., Krueger, J. G., Coven, T. und Nickoloff, B. J.** (1998). Sunlight-induced basal cell carcinoma tumor cells und ultraviolet-B-irradiated psoriatic plaques express Fas ligand (CD95L). *J Clin Invest* **101**, 33-38.
- Gutschalk, C. M., Herold-Mende, C. C., Fusenig, N. E. und Mueller, M. M.** (2006). Granulocyte colony-stimulating factor und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promote malignant growth of cells from head und neck squamous cell carcinomas *in vivo*. *Cancer Res* **66**, 8026-8036.
- Haak-Frendscho, M., Arai, N., Arai, K., Baeza, M. L., Finn, A. und Kaplan, A. P.** (1988). Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor und interleukin 3 cause basophil histamine release. *J Clin Invest* **82**, 17-20.

- Hammerberg, C., Duraiswamy, N. und Cooper, K. D.** (1994). Active induction of unresponsiveness (tolerance) to DNFB by in vivo ultraviolet-exposed epidermal cells is dependent upon infiltrating class II MHC<sup>+</sup> CD11b<sup>bright</sup> monocytic/macrophagic cells. *J Immunol* **153**, 4915-4924.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hancock, G. E., Kaplan, G. und Cohn, Z. A.** (1988). Keratinocyte growth regulation by the products of immune cells. *J Exp Med* **168**, 1395-1402.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. und Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Harris, C. C.** (1996). Structure und function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* **88**, 1442-1445.
- Hart, P. H., Whitty, G. A., Piccoli, D. S. und Hamilton, J. A.** (1988). Synergistic activation of human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma. Increased TNF-alpha but not IL-1 activity. *J Immunol* **141**, 1516-1521.
- Hart, P. H., Grimaldeston, M. A., Swift, G. J., Sedgwick, J. D., Korner, H. und Finlay-Jones J. J.** (1998). TNF modulates susceptibility to UVB-induced systemic immunomodulation in mice by effects on dermal mast cell prevalence. *Eur J Immunol* **28**, 2893-2901.
- Hart, P. H., Grimaldeston, M. A. und Finlay-Jones, J. J.** (2000). Mast cells in UV-B-induced immunosuppression. *J Photochem Photobiol B* **55**, 81-87.
- Hart, P. H., Grimaldeston, M. A. und Finlay-Jones, J. J.** (2001). Sunlight, immunosuppression and skin cancer: role of histamine and mast cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **28**, 1-8.
- Hart, P. H., Townley, S. L., Grimaldeston, M. A., Khalil, Z. und Finlay-Jones, J. J.** (2002). Mast cells, neuropeptides, histamine, and prostaglandins in UV-induced systemic immunosuppression. *Methods* **28**, 79-89.
- Hart, R. W., Setlow, R. B. und Woodhead, A. D.** (1977). Evidence that pyrimidine dimers in DNA can give rise to tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5574-5578.
- Hawk, J. L., Murphy, G. M. und Holden, C. A.** (1988). The presence of neutrophils in human cutaneous ultraviolet-B inflammation. *Br J Dermatol* **118**, 27-30.
- Hazar, V., Ongun, H., Yesilipek, M. A. und Yegin, O.** (1999). Failure of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in a patient with Kostmann syndrome. *Turk J Pediatr* **41**, 117-120.
- Henseleit, U., Zhang, J., Wanner, R., Haase, I., Kolde, G. und Rosenbach, T.** (1997). Role of p53 in UVB-induced apoptosis in human HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* **109**, 722-727.
- Herbst, B., Kohler, G., Mackensen, A., Veelken, H. und Lindemann, A.** (1998). GM-CSF promotes differentiation of a precursor cell of monocytes und Langerhans-type dendritic cells from CD34<sup>+</sup> haemopoietic progenitor cells. *Br J Haematol* **101**, 231-241.

- Heufler, C., Koch, F. und Schuler, G.** (1988). Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* **167**, 700-705.
- Hill, L. L., Outhit, A., Loughlin, S. M., Kripke, M. L., Ananthaswamy, H. N. und Owen-Schaub, L. B.** (1999). Fas ligand: A sensor for DNA damage critical in skin cancer etiology. *Science* **285**, 898-900.
- Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A. und Sherr, C. J.** (1995). Novel INK4 proteins, p19 und p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6. *Mol. Cell Biol* **15**, 2672-2681.
- Hockenberry, D. M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. und Korsmeyer, S. J.** (1991). Bcl2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6961-6965.
- Horii, A., Shimamura, K. und Honjo, Y.** (1997). Granulocyte colony stimulating factor-producing tongue carcinoma. *Head Neck* **19**, 351-356.
- Horio, T., Miyauchi, H., Sindhvanunda, J., Soh, H., Kurokawa, I. und Asada, Y.** (1993). The effect of ultraviolet (UVB und PUVA) radiation on the expression of epidermal keratins. *Br J Dermatol* **128**, 10-15.
- Huang, A. J., Golumbek, P., Ahmadzadeh, M., Jaffee, E., Pardoll, D. und Levitsky, H.** (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* **264**, 961-965.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D. und Levitsky, H.** (1988). The central role of CD4<sup>+</sup> T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* **188**, 2357-2368.
- Ichiishi E., Yoshikawa T., Kogawa T., Yoshida N. und Kondo M.** (2000). Possible paracrine growth of adenocarcinoma of the stomach induced by granulocyte colony stimulating factor produced by squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Gut* **46**, 432-434.
- Ihle, J. N., Rebar, L., Keller, J., Lee, J. C. und Hapel, A. J.** (1982). Interleukin 3: possible roles in the regulation of lymphocyte differentiation and growth. *Immunol Rev* **63**, 5-32.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. und Steinmann, R. M.** (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-1702.
- Innaccone, P. M., Gardner, R. L. und Harris, H.** (1978). The cellular origin of chemically induced tumours. *J Cell Sci* **29**, 249-269.
- Ismael, A., Khalil, E. A., Musa, A. M., El Hassan, I. M., Ibrahim, M. E., Theander, T. G. und El Hassan, A. M.** (2006). The pathogenesis of post kala-azar dermal leishmaniasis from the field to the molecule: does ultraviolet light (UVB) radiation play a role? *Med Hypotheses* **66**, 993-999
- Isoherranen, K., Sauroja, I., Jansen, C. und Punnonen, K.** (1999). UV irradiation induces downregulation of bcl-2 expression *in vitro* and *in vivo*. *Arch Dermatol Res* **291**, 212-216.

- Jacks, T. und Weinberg, R. A.** (1996). Cell-cycle control and its watchman. *Nature* **381**, 643-644.
- Jaschke, E., Zabernigg, A. und Gattringer, C.** (1999). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied locally in low doses enhances healing and prevents recurrence of chronic venous ulcers. *Int J Dermatol* **38**, 380-386.
- Jiang, W., Ananthaswamy, H. N., Muller, H. K. und Kripke, M. L.** (1999). p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation. *Oncogene* **18**, 4247-4253.
- Kamb, A.** (1994). Sun protection factor p53. *Nature* **372**, 730-731.
- Kang, K., Gilliam, A. C., Chen, G., Tootell, E. und Cooper, K. D.** (1998). In human skin, UVB initiates early induction of IL-10 over IL-12 preferentially in the expanding dermal monocytic/macrophagic population. *J Invest Dermatol* **111**, 31-38.
- Kanjilal, S., Perceall, W. E., Cummings, K. K., Kripke, M. L. und Ananthaswamy, H. N.** (1993). High frequency of p53 mutations in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: Evidence of strand bias and tumor heterogeneity. *Cancer Res* **53**, 2961-2964.
- Kanjilal, S. und Ananthaswamy, H. N.** (1996). Molecular biology of skin carcinomas. In: Weber, R., Müller, M. und Goepfert, H. (Eds.), *Basal and squamous cell skin cancers of the head and neck. Williams und Wilkins, Baltimore*, 25-26.
- Kaplan, G., Walsh, G., Guido, L. S., Meyn, P., Burkhardt, R. A., Abalos, R. M., Barker, J., Frindt, P. A., Fajardo, T. T., Celona, R. et al.** (1992). Novel responses of human skin to intradermal recombinant granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor: Langerhans cell recruitment, keratinocyte growth, and enhanced wound healing. *J Exp Med* **175**, 1717-1728.
- Kastelein, R. A. und Shanafelt, A. B.** (1993). GM-CSF receptor: interactions and activation. *Oncogene* **8**, 231-236.
- Kawada, A., Hiruma, M., Noguchi, H., Ishibashi, A., Motoyoshi, K. und Kawada, I.** (1997). Granulocyte and macrophage colony-stimulating factors stimulate proliferation of human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* **289**, 600-602.
- Kayaga, J., Souberbielle, B. E., Sheikh, N., Morrow, W. J., Scott-Taylor, T., Vile, R., Chong, H. und Dalglish, A. G.** (1999). Anti-tumor activity against B16-F10 melanoma with a GM-CSF secreting allogeneic tumour cell vaccine. *Gene Ther* **6**, 1475-1481.
- Kelfkens G., de Gruijl F. R. und van der Leun J. C.** (1991). Tumorigenesis by short-wave ultraviolet A: papillomas versus squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* **12**, 1377-1382.
- Keller, M., Spanou, Z., Schaerli, P., Britschgi, M., Yawalkar, N., Seitz, M., Villiger, P. M. und Pichler, W. J.** (2005). T cell-regulated neutrophilic inflammation in autoinflammatory diseases. *J Immunol* **175**, 7678-7686.
- Kibitel, J., Hejmadi, V., Alas, L., O'Connor, A., Sutherland, B. M. und Yarosh, D. B.** (1998). UV-DNA damage in mouse und human cells induces the expression of tumor necrosis factor alpha. *Photochem Photobiol* **67**, 541-546.
- Kingsley, D. M.** (1994). The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* **8** (2), 133-146.

- Kirnbauer, R., Kock, A., Neuner, P., Forster, E., Krutmann, J., Urbanski, A., Schauer, E., Ansel, J. C., Schwarz, T. and Luger T. A.** (1991). Regulation of epidermal cell interleukin-6 production by UV light and corticosteroids. *J Invest Dermatol* **96**, 484-489.
- Kischkel, F., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. und Peter, M.** (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Eur Mol Biol Org (EMBO) J* **14**, 5579-5588.
- Klein, J. B., Rane, M. J., Scherzer, J. A., Coxon, P. Y., Kettritz, R., Mathiesen, J. M., Buridi, A. und McLeish, K. R.** (2000). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol* **164**, 4286-4291.
- Kobayashi, S. D., Voyich, J. M., Whitney, A. R. und deLeo, F. R.** (2005). Spontaneous neutrophil apoptosis and regulation of cell survival by granulocyte macrophage-colony stimulating factor. *J Leukoc Biol* **78**, 1408-1418.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N. und Schuler, G.** (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* **184**, 741-746.
- Kock, A., Schwarz, T., Kirnbauer, R., Urbanski, A., Perry, P., Ansel, J. C. und 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. *Exp Med* **172**, 1609-1614.
- Konecki, D. S., Brennand, J., Fuscoe, J. C., Caskey, C. T. und Chinault, A. C.** (1982). Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase genes of mouse and Chinese hamster: construction and sequence analysis of cDNA recombinants. *Nucl Acids Res* **10**, 6763-6775.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Miyashita, T., Wang, H. G. und Reed, J. C.** (1994a). Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am J Pathol* **145**, 1323-1336.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H. G., Irie, S., Fong, L. und Reed, J. C.** (1994b). Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res* **54**, 5501-5507.
- Krajewski, S., Krajewska, M. und Reed, J. C.** (1996). Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of Bak expression, a proapoptotic member of the Bcl-2 protein family. *Cancer Res* **56**, 2849-2855.
- Krammer, P. H., Dhein, J., Walczak, H., Behrmann, I., Mariani, S., Matiba, B., Fath, M., Daniel, P. T., Knipping, E., Westendorp, M. O., Stricker, K., Bäuml, C., Hellbardt, S., Germer, M., Peter, M. E. und Debatin, K.-M.** (1994). The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol Rev* **142**, 175-191.
- Kremer, I. B., Hilkens, C. M., Sylvia-Steenland, R. M., Koomen, C. W., Kapsenberg, M. L., Bos, J. D. und Teunissen, M. B.** (1996). Reduced IL-12 production by monocytes upon ultraviolet-B irradiation selectively limits activation of T helper-1 cells. *J Immunol* **157**, 1913-1918.

- Kress, S., Sutter, C., Stricklund, P. T., Mukhtar, H., Schweitzer, J. und Schwarz, M.** (1992). Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res* **52**, 6400-6403.
- Kripke, M. L.** (1991). Immunological effects of ultraviolet radiation. *J Dermatol* **18**, 429-433.
- Kripke, M. L.** (1994). Ultraviolet radiation and immunology: Something new under the sun-presidential address. *Cancer Res* **54**, 6102-6105.
- Kroemer, G.** (1997). The proto-oncogene Bcl-2 und its role in regulating apoptosis. *Nat Med* **3**, 614-620.
- Kubo, Y., Murao K., Matsumoto K. und Arase, S.** (2002). Molecular carcinogenesis of squamous cell carcinomas of the skin. *J Med Invest* **49**, 111-117.
- Kuerbitz, S. J., Plunkbett, B. S., Walsh, W. V. und Kastan, M. B.** (1992). Wildtype p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 7491-7495.
- Kulkarni, A. B., Huh, C. G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flunders, K. C., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Ward, J. M. und Karlsson, S.** (1993). Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 770-774.
- Kupper, T. S., Coleman, D. L., McGuire, J., Goldminz, D. und Horowitz, M. C.** (1986). Keratinocyte-derived T-cell growth factor: a T-cell growth factor functionally distinct from interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4451-4455.
- Kupper, T. S., Horowitz, M., Birchall, N., Mizutani, H., Coleman, D., McGuire, J., Flood, P., Dower, S. und Lee, F.** (1988). Hematopoietic, lymphopoietic, und proinflammatory cytokines produced by human and murine keratinocytes. *Ann N Y Acad Sci* **548**, 262-270.
- Kurimoto, I. und Streilein, J. W.** (1992). Cis-urocanic acid suppression of contact hypersensitivity induction is mediated via tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **148**, 3072-3078.
- Kyo S., Kanaya T., Takakura, M. und Inoue, M.** (2000). A case of cervical cancer with aggressive tumor growth: possible autocrine growth stimulation by G-CSF und IL-6. *Gynecol Oncol* **78**, 383-387.
- Lane, D. P.** (1992). p53, guardian of the genome. *Nature (Lond)* **358**, 15-16.
- Lathers, B. M. R., Achille, N., Kolesiak, K., Hulett, K., Sparano, A., Petruzzelli, G. J. und Young, M. R.** (2001). Increased levels of immune inhibitory CD 34<sup>+</sup> progenitor cells in the peripheral blood of patients with node positive head und neck squamous cell carcinomas and the ability of these CD34<sup>+</sup> cells to differentiate into immune stimulatory dendritic cells. *Otolaryngol* **125**, 205-212.
- Lee, F., Yokota, T., Otsuka, T., Gemmell, L., Larson, N., Luh, J., Arai, K. und Rennick, D.** (1985). Isolation of cDNA for a human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by functional expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 4360-4364.



- Leong, S. P., Enders-Zohr, P., Zhou, Y. M., Stuntebeck, S., Habib, F. A., Allen, R. E., Jr., Sagebiel, R. W., Glassberg, A. B., Lowenberg, D. W. und Hayes, F. A.** (1999). Recombinant human granulocyte macrophage-colony stimulating factor (rhGM-CSF) and autologous melanoma vaccine mediate tumor regression in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* **22**, 166-174.
- Lersch, R., Stellmach, V., Stocks, C., Giudice, G. und Fuchs, E.** (1989). Isolation, sequence, and expression of a human keratin K5 gene: transcriptional regulation of keratins und insights into pairwise control. *Mol Cell Biol* **9**, 3685-3697.
- Leverkus, M., Yaar, M. und Gilchrest, B. A.** (1997). Fas/Fas ligand interaction contributes to UV-induced apoptosis in human keratinocytes. *Exp Cell Res* **232**, 255-262.
- Levine, A. J.** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth und division. *Cell* **88**, 323-331.
- Levine, A. J., Momund, J. und Finlay, C. A.** (1991). The p53 tumour suppressor gene *Nature* **351**, 453-456.
- Li, G., Mitchell, D. L., Ho, V. C., Reed, J. C. und Tron, V. A.** (1996). Decreased DNA repair but normal apoptosis in ultraviolet-irradiated skin of p53-transgenic mice. *Am J Pathol* **148**, 1113-1123.
- Li, G., Mitchell, D. L., Ho, V. C. und Tron, V. A.** (1997). Differentiation-dependent p53 regulation of nucleotide excision repair in keratinocytes. *Am J Pathol* **150**, 1457-1464.
- Liebermann, D. A., Hoffman, B. und Steinman, R. A.** (1995). Molecular controls of growth arrest und apoptosis: p53-dependent and independent pathways. *Oncogene* **11**, 199-210.
- Lindemann, A., Riedel, D., Oster, W., Ziegler-Heitbrock, H. W., Mertelsmann, R. und Herrmann, F.** (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces cytokine secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *J Clin Invest* **83**, 1308-1312.
- Lippke, J. A., Gordon, L. K., Brash, D. E. und Haseltine, W. A.** (1981). Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside –cytidine sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3388-3392.
- Liu, M., Dhanwada, K. R., Birt, D. F., Hecht, S. und Pelling, J. C.** (1994). Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis* **15**, 1089-1092.
- Liu, W., Li, C. C. und Lu, G. X.** (2006). Effects of GM-CSF on the proliferation and activation of dendritic cells *in vivo*. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* **31**, 32-35.
- Liu, X., Alexander, V., Vijayachandra, K., Bhogte, E., Diamond, I. und Glick, A.** (2001). Conditional epidermal expression of TGF- $\beta$ 1 blocks neonatal lethality but causes a reversible hyperplasia and alopecia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9139-9144.
- Lopez, A. F., Williamson, D. J., Gamble, J. R., Begley, C. G., Harlan, J. M., Klebanoff, S. J., Waltersdorff, A., Wong, G., Clark, S. C. und Vadas, M. A.** (1986). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates *in vitro* mature human neutrophil und eosinophil function, surface receptor expression, and survival. *J Clin Invest* **78**, 1220-1228.

- Lowe, S. W., Ruley, H. E., Jacks, T. und Housman, D. E.** (1993). p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell* **74**, 957-967.
- Luger, T. A. und Schwarz, T.** (1990). Evidence for an epidermal cytokine network. *J Invest Dermatol* **95**, 100S-104S.
- Ma, L. J., Guzman, E. A., DeGuzman, A., Walter, B., Muller, H. K., Walker, A. M. und Owen, L. B.** (2006). Unexpected effects of UVB in IL-10 transgenic mice: normalization of contact hypersensitivity response. *Arch Dermatol Res* **297**, 417-420.
- Ma, R. Z. und Teuscher, C.** (1998 und 1999). Veterinary Pathobiology, University of Illinois
- Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M. und O'Garra, A.** (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of T<sub>H</sub>1 cells from naive CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **154**, 5071-5079.
- Maeda, A., Schneider, S. W., Kojima, M., Beissert, S., Schwarz, T. und Schwarz, A.** (2006). Enhanced photocarcinogenesis in interleukin-12-deficient mice. *Cancer Res* **66**, 2962-2969.
- Mann, A., Breuhahn, K., Schirmacher, P. und Blessing, M.** (2001a). Keratinocyte-derived GM-CSF accelerates wound healing: stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation and vascularisation. *J Invest Dermatol* **117**, 1382-1390.
- Mann, A., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Wilhelmi, P., Beyer, C., Rosenau, A., Özbek, S., Rose-John, S. und Blessing, M.** (2001b). Up- and down-regulation of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor activity in murine skin increase susceptibility to skin carcinogenesis by independent mechanisms. *Cancer Research* **61**, 2311-2319.
- Mann, E. A., Spiro, J. D., Chen, L. L. und Kreutzer, D. L.** (1992). Cytokine expression by head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg* **164**, 567-573.
- Mano, H., Nishida, J., Usuki, K., Maru, Y., Kobayashi, Y., Hirai, H., Okabe, T., Urabe, A. und Takaku, F.** (1987). Constitutive expression of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene in human solid tumors. *Jpn J Cancer Res* **78**, 1041-1043.
- Martin, P.** (1997). Wound healing-aiming for perfect skin regeneration. *Science* **276**, 75-81.
- Martinez-Moczygemba, M. und Huston, D. P.** (2001). Proteasome regulation of  $\beta$ c signaling reveals a novel mechanism for heterotypic desensitization. *J Clin Invest* **108**, 1797-1806.
- Martinez-Moczygemba, M. und Huston, D. P.** (2003). Biology of common  $\beta$  receptor-signaling cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF. *J Allergy Clin Immunol*, 653-666.
- Mastrangelo, M. J., Maguire, H. C., Jr., Eisenlohr, L. C., Laughlin, C. E., Monken, C. E., McCue, P. A., Kovatich, A. J. und Lattime, E. C.** (1999). Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as a gene therapy in patients with cutaneous melanoma. *Cancer Gene Ther* **6**, 409-422.
- Masucci, G., Ragnhammar, P., Wersall, P. und Mellstedt, H.** (1990). Granulocyte-monocyte colony-stimulating-factor augments the interleukin-2-induced cytotoxic activity of human lymphocytes in the absence and presence of mouse or chimeric monoclonal antibodies (mAB 17-1A). *Cancer Immunol Immunother* **31**, 231-235.

- Meeran, S. M., Mantena, S. K., Elmets, C. A. und Katiyar, S. K.** (2006a). (-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents photocarcinogenesis in mice through interleukin-12-dependent DNA repair. *Cancer Res* **66**, 5512-5520.
- Meeran, S. M., Mantena, S. K., Meleth, S., Elmets, C. A. und Katiyar, S. K.** (2006b). Interleukin-12-deficient mice are at greater risk of UV radiation-induced skin tumors and malignant transformation of papillomas to carcinomas. *Mol Cancer Ther* **5**, 825-832.
- Mellmann, I.** (1996). Endocytosis and molecular sorting. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 575-625.
- Metcalf, D.** (1988). Colony stimulating factors and hemopoiesis. *Ann Acad Med Singapore* **17**, 166-170.
- Metcalf, D. und Nicola, N. A.** (1983). Proliferative effects of purified granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) on normal mouse hemopoietic cells. *J Cell Physiol* **116**, 198-206.
- Metcalf, D., Begley, C. G., Johnson, G. R., Nicola, N. A., Vadas, M. A., Lopez, A. F., Williamson, D. J., Wong, G. G., Clark, S. C. und Wang, E. A.** (1986). Biologic properties *in vitro* of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **67**, 37-45.
- Metcalf, D., Begley, C. G., Williamson, D. J., Nice, E. C., De Lamarter, J., Mermod, J. J., Thatcher, D. und Schmidt, A.** (1987). Hemopoietic responses in mice injected with purified recombinant murine GM-CSF. *Exp Hematol* **15**, 1-9.
- Meunier, L.** (1999). Ultraviolet light und dendritic cells. *Eur J Dermatol* **9**, 269-275.
- Miller, P. W., Sharma, S., Stolina, M., Butterfield, L. H., Luo, J., Lin, Y., Dohadwala, M., Batra, R. K., Wu, L., Economou, J. S. und Dubinett, S. M.** (2000). Intratumoral administration of adenoviral interleukin 7 gene-modified dendritic cells augment specific antitumor immunity und achieves tumor eradication. *Hum Gene Ther* **11**, 53-65.
- Miller, S. J., Wei, Z. G., Wilson, C., Dzubow, L., Sun, T. T. und Lavker, R. M.** (1993). Mouse skin is particularly susceptible to tumor initiation during early anagen of the hair cycle: possible involvement of hair follicle stem cells. *J Invest Dermatol* **101**, 591-594.
- Mitchell, D. L., Jen, J. und Cleaver, J. E.** (1992). Sequence specificity of cyclobutane pyrimidine dimers in DNA treated with solar (ultraviolet B) radiation. *Nucl Acids Res* **20**, 225-229.
- Mitchell, D. L. und Nairn, R. S.** (1989). The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol* **49**, 805-819.
- Miyajima, A.** (1992). Molecular structure of the IL-3, GM-CSF und IL-5 receptors. *Int J Cell Cloning* **10**, 126-134.
- Moll, R., Franke, W. W., Schiller, D. L., Geiger, B. und Krepler, R.** (1982). The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors und cultured cells. *Cell* **31**, 11-24.
- Moodycliffe A. M., Kimber I. und Norval M.** (1992). The effect of ultraviolet B irradiation und urocanic acid isomers on dendritic cell migration. *Immunology* **77**, 394-399.

- Moodycliffe, A. M., Kimber, I. und Norval, M.** (1994). Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in ultraviolet B light-induced dendritic cell migration and suppression of contact hypersensitivity. *Immunology* **81**, 79-84.
- Moret-Tatay, I., Diaz, J., Marco, F. M., Crespo, A. und Alino, S. F.** (2003). Complete tumor prevention by engineered tumor cell vaccines employing nonviral vectors. *Cancer Gene Ther* **10**, 887-897.
- Mosmann, T. R. und Moore, K. W.** (1993). The role of IL-10 in crossregulation of T<sub>h</sub>1 and T<sub>h</sub>2 response. *Immunol today* **12**, A49-A53.
- Mueller, M. M. und Fusenig, N. E.** (1999). Constitutive expression of G-CSF und GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression. *Int J Cancer* **83**, 780-789.
- Mueller, M. M., Herold-Mende, C. C., Riede, D., Lange, M., Steiner, H. H. und Fusenig, N. E.** (1999). Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression. *Am J Pathol* **155**, 1557-1567.
- Mueller, M. M., Peter, W., Mappes, M., Huelsen, A., Steinbauer, H., Boukamp, P., Vaccariello, M., Garlick, J., Fusenig, N. E.** (2001). Tumor progression of skin carcinoma cells *in vivo* promoted by clonal selection, mutagenesis, and autocrine growth regulation by granulocyte colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Am J Pathol* **159**, 1567-1579.
- Muller, G., Saloga, J., Germann, T., Schuler, G., Knop, J. und Enk, A. H.** (1995). IL-12 as mediator and adjuvant for the induction of contact sensitivity *in vivo*. *J Immunol* **155**, 4661-4668.
- Nataraj, A. J., Trent, J. C. und Ananthaswamy, H. N.** (1995). p53 gene mutations and photo-carcinogenesis. *Photochem Photobiol* **62**, 218-230.
- Negrini, M., Silini, E., Kozak, C., Tsujimoto, Y. und Croce, C. M.** (1987). Molecular analysis of mbel-2: structure und expression of the murine gene homologous to the human gene involved in follicular lymphoma. *Cell* **49**, 455-463.
- Nghiem, D. X., Kazimi, N., Mitchell, D. L. et al.** (2002). Mechanisms underlying the suppression of established immune responses by ultraviolet radiation. *J Invest Dermatol* **119**, 600-608.
- Nickoloff, B. J. und Turka, L. A.** (1993). Keratinocytes: key immunocytes of the integument. *Am J Pathol* **143**, 325-331.
- Nicola, N. A., Metcalf, D., Matsumoto, M. und Johnson, G. R.** (1983). Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukaemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem* **258**, 9017-9023.
- Nishigori, C., Yarosh, D. B., Ullrich, S. E., Vink, A. A., Bucana, C. D., Roza, L. und Kripke, M. L.** (1996). Evidence that DNA damage triggers interleukin 10 cytokine production in UV-irradiated murine keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10254-10359.

- Nishijima, I., Nakahat. T., Hirabayashi, Y., Inou, T., Kurata, H., Miyajima, A., Hayashi, N., Iwakura, Y., Arai, K. und Yokota, T.** (1995). A human GM-CSF receptor expressed in transgenic mice stimulates proliferation and differentiation of hemopoietic progenitors to all lineages in response to human GM-CSF. *Mol Biol Cell* **6**, 497-508.
- Nishimura, N., Tohyama, C., Satoh, M., Nishimura, H. und Reeve, V. E.** (1999). Defective immune response und severe skin damage following UVB irradiation in interleukin-6 deficient mice. *Immunology* **97**, 77-83.
- Nishino, H., Miyata, M. und Kitamura, K.** (1998). The effect of interleukin 6 on enhancing the invasiveness of head and neck cancer cells *in vitro*. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **255**, 468-472.
- Nolan, G. P., Gosh, S., Liou, H. C., Tempst, P. und Baltimore, D.** (1991). DNA binding und I-kappa-B inhibition of the cloned p65 subunit of NF-kappa-B, a rel-related polypeptide. *Cell* **64**, 961-969.
- Noonan, F. P., De Fabo, E. C. und Kripke, M. L.** (1981). Suppression of contact hypersensitivity by UV radiation und its relationship to UV-induced suppression of tumor immunity. *Photochem Photobiol* **34**, 683-689.
- Norris, P., Poston, R. N., Thomas, D. S., Thornhill, M., Hawk, J. und Haskard, D. O.** (1991). The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), und vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: a comparison of ultraviolet B erythema und delayed hypersensitivity. *J Invest Dermatol* **96**, 763-770.
- Nozaki, S., Abrams, J. S., Pearce, M. K. und Sauder, D. N.** (1991). Augmentation of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor expression by ultraviolet irradiation is mediated by interleukin 1 in PAM 212 keratinocytes. *J Invest Dermatol* **97**, 10-14.
- Obermueller, E., Vosseler, S., Fusenig, N. E. und Mueller, M. M.** (2004). Cooperative autocrine und paracrine functions of granulocyte colony-stimulating factor und granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the progression of skin carcinoma cells. *Cancer Res* **64**, 7801-7812.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausman, G., Adams, J. M., Cory, S. und Huang, D. C.** (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* **17**, 384-395.
- O'Kane, S. und Ferguson, M. W.** (1997). Transforming growth factor beta und wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* **29**, 79-89.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L. und Korsmeyer, S. J.** (1993). Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* **74**, 609-619.
- Ota, S., Kato, A. und Kobayashi, H.** (1998). Monoclonal origin of an esophageal carcinoma producing granulocyte-colony-stimulating factor. *Cancer* **82**, 2102-2111.
- Ouhtit, A. und Ananthaswamy, H. N.** (2001). A Model for UV-Induction of Skin Cancer. *J Biomed Biotechnol* **1**, 5-6.

- Pak, A. S., Wright, M. A., Matthews, J. P., Collins, S. L., Petruzzelli, G. J. und Young, M. R. I.** (1995). Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34<sup>+</sup> cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* **1**, 95-103.
- Paquet, P. und Pierard, G. E.** (1996). Interleukin-6 and the skin. *Int Arch Allergy Immunol* **109**, 308-317.
- Pastore, S., Fanales-Belasio, E., Albanesi, C., Chinni, L. M., Gianetti, A. und Girolomoni, G.** (1997). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J Clin Invest* **99**, 3009-3017.
- Paterno, G. D. und Downs, K. M.** (1992). Sequence of a cDNA encoding a mouse cyclin B protein. *Gene* **108**, 315-316.
- Pearse, A. D., Gaskell, S. A. und Marks, R.** (1987). Epidermal changes in human skin following irradiation with either UVB or UVA. *J Invest Dermatol* **88**, 83-87.
- Plaut, M., Pierce, J. H., Watson, C. J., Hanley-Hyde, J., Nordan, R. P. und Paul, W. E.** (1989). Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* **339**, 64-67.
- Pluznik, D. H., Bickel, M. und Mergenhagen, S. E.** (1989). B lymphocyte derived hematopoietic growth factors. *Immunol Invest* **18**, 103-116.
- Polyak, K., Lee, M. H., Erdjument-Breomage, H., Koff, A., Roberts, J. M., Tempst, P. und Massague, J.** (1994). Cloning of p27kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor, and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**, 56-66.
- Rady, P., Scinicariello, F., Wagner, R. F. und Tyring, S. K.** (1992). p53 mutations in basal cell carcinomas. *Cancer Res* **52**, 3804-3806.
- Rajagopalan, L. E., Burkholder, J. K., Turner, J., Culp, J., Yang, N. S. und Malter, J. S.** (1995). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA stabilization enhances transgenic expression in normal cells und tissues. *Blood* **86**, 2551-2558.
- Randolph, J. B. und Waggoner, A. S.** (1997). Stability, specificity und fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucleic Acids Res* **25**, 2923-2929.
- Rattis F. M., Peguet-Navarro J., Courtellemont P., Redziniak G. und Schmitt D.** (1995). Cis-urocanic acid failed to affect in vitro human Langerhans cell allostimulatory function. *Photochem Photobiol* **62**, 914-916.
- Reddi, A. H.** (1997). Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 11-20.
- Reed, J. C.** (1996). Mechanisms of bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease. *Behring Inst Mitt* **97**, 72-100.

- Regnier, M., Vaigot, P., Darmon, M. und Prunieras, M.** (1986). Onset of epidermal differentiation in rapidly proliferating basal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **87**, 472-476.
- Reiss, M.** (1999). TGF-beta and cancer. *Microbes Infect* **1**, 1327-1347.
- Richter, J., Undersson, T. und Olsson, I.** (1989). Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation. *J Immunol* **142**, 3199-3205.
- Rieger, M., Jorcano, J. L. und Franke, W. W.** (1985). Complete sequence of a bovine type I cytokeratin gene: conserved and variable intron positions in genes of polypeptides of the same cytokeratin subfamily. *EMBO J* **4**, 2261-2267.
- Rijken, F., Kiekens, R. C., van den Worm, E., Lee, P. L., van Weelden, H. und Bruijnzeel, P. L.** (2006). Pathophysiology of photoaging of human skin: focus on neutrophils. *Photochem Photobiol Sci* **5**, 184-189.
- Rincon M., Derijard B., Chow C. W., Davis R. J. und Flavell R. A.** (1997). Reprogramming the signalling requirement for AP-1 (activator protein-1) activation during differentiation of precursor CD4<sup>+</sup> T-cells into effector T<sub>h</sub>1 and T<sub>h</sub>2 cells. *Genes Funct* **1**, 51-68.
- Rivas, J. M. und Ullrich, S. E.** (1992). Systemic suppression of delayed-type hypersensitivity by supernatants from irradiated keratinocytes. An essential role for keratinocyte-derived IL-10. *J Immunol* **149**, 3865-3871.
- Robertson, F. M., Bijur, G. N., Oberyszyn, A. S., Pellegrini, A. E., Boros, L. G., Sabourin, C. L. und Oberyszyn, T. M.** (1994). Granulocyte-macrophage colony stimulating factor gene expression and function during tumor promotion. *Carcinogenesis* **15**, 1017-1029.
- Rochet, N., Dubouset, J., Mazeau, C., Zanghellini, E., Farges, M. F., de Novion, H. S., Chompret, A., Delpuch, B., Cattani, N., Frenay, M. und Gioanni, J.** (1999). Establishment, characterisation and partial cytokine expression profile of a new human osteosarcoma cell line (CAL 72). *Int J Cancer* **82**, 282-285.
- Rokhlin, O. W., Griebeling, T. L., Karassina, N. V., Raines, M. A. und Cohen, M. B.** (1996). Human prostate carcinoma cell lines secrete GM-CSF and express GM-CSF-receptor on their cell surface. *Anticancer Res* **16**, 557-563.
- Roop, D. R.** (1987). Regulation of keratin gene expression during differentiation of epidermal and vaginal epithelial cells. *Curr Top Dev Biol* **22**, 195-207.
- Rosario, R., Mark, G. J., Parrish, J. A. und Mihm, M. C.** (1979). Histological changes produced in skin by equally erythemogenic doses of UV-A, UV-B, UV-C and UV-A with psoralens. *Br J Dermatol* **101**, 299-308.
- Ross, J. A., Howie, S. E., Norval, M., Maingay, J. und Simpson, T. J.** (1986). Ultraviolet-irradiated urocanic acid suppresses delayed-type hypersensitivity to herpes simplex virus in mice. *J Invest Dermatol* **87**, 630-633.
- Ruff, M. R., Farrar, W. L. und Pert, C. B.** (1986). Interferon gamma und granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibit growth and induce antigens characteristic of myeloid differentiation in small-cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6613-6617.

- Ruggeri, B., Caamano, J., Goodrow, T., DiRado, M., Bianchi, A., Trono, D., Conti, C. J. und Klein-Szanto, A. J.** (1991). Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res* **51**, 6615-6621.
- Russell, N. H.** (1992). Autocrine growth factors and leukaemic haemopoiesis. *Blood Rev* **6**, 149-156.
- Ryseck, R. P., Bull, P., Takamiya, M., Bours, V., Siebenlist, V., Dobranski, P. und Bravo, R.** (1992). RelB, a new family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa-B. *Mol Cell Biol* **12**, 674-684.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. und Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences und restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. *New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press*.
- Schäfer-Korting, M.** (2004).  
<http://userpage.fuberlin.de/~msk/pharmakologie/Hautmodelle%20WS04-05.pdf>
- Scheibenbogen, C., Schmittel, A., Keilholz, U., Allgauer, T., Hofmann, U., Max, R., Thiel, E. und Schadendorf, D.** (2000). Phase 2 trial of vaccination with tyrosine peptides and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* **23**, 275-281.
- Schena, M. und Davis, R. W.** (2000). Technology Standards for Microarray Research. In: *Microarray Biochip Technology (ed. by Mark Schena); BioTechniques Books*.
- Schlichtholz, B., Legros, Y., Gillet, D., Gaillard, C., Marty, M., Lane, D., Calvo, F. und Soussi, T.** (1992). The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. *Cancer Res* **52**, 6380-6384.
- Schmitt, D. A., Owen-Schaub, L. und Ullrich, S. E.** (1995). Effect of IL-12 on immune suppression and suppressor cell induction by ultraviolet radiation. *J Immunol* **154**, 5114-5120.
- Schwarz, A., Grabbe, S., Riemann, H., Aragane, Y., Simon, M., Manon, S., Andrade, S., Luger, T. A., Zlotnik, A. und Schwarz, T.** (1994). *In vivo* effects of interleukin-10 on contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity reactions. *J Invest Dermatol* **103**, 211-216.
- Schwarz, A., Grabbe, S., Aragane, Y., Sundkuhl, K., Riemann, H., Luger, T. A., Kubin, M., Trinchieri, G. und Schwarz, T.** (1996). Interleukin-12 prevents ultraviolet B-induced local immunosuppression and overcomes UVB-induced tolerance. *J Invest Dermatol* **106**, 1187-1191.
- Schwarz, A., Grabbe, S., Gross-Heitmeyer, K., Roters, B., Riemann; H., Luger, T. A., Trinchieri, G. und Schwarz, T.** (1998). Ultraviolet light-induced immune tolerance is mediated via the Fas/Fas-ligand system. *J Immunol* **160**, 4262-4270.
- Schwarz, A., Maeda, A., Wild, M. K., Kernebeck, K., Gross, N., Aragane, Y., Beisert, S., Vestweber, D. und Schwarz, T.** (2004). Ultraviolet radiation-induced regulatory T cells not only inhibit the induction but can suppress the effector phase of contact hypersensitivity. *J Immunol* **172**, 1036-1043.



- Schwarz, A., Maeda, A., Kernebeck, K., van Steeg, H., Beissert, S. und Schwarz, T.** (2005). Prevention of UV radiation-induced immunosuppression by IL-12 is dependent on DNA repair. *J Exp Med* **201**, 173-179.
- Schwarz, A., Maeda, A., Stander, S., van Steeg, H. und Schwarz, T.** (2006). IL-18 reduces ultraviolet radiation-induced DNA damage and thereby affects photoimmunosuppression. *J Immunol* **176**, 2896-2901.
- Schwarz, T., Urbanska, A., Gschnait, F. und Luger, T. A.** (1986). Inhibition of the induction of contact hypersensitivity by a UV-mediated epidermal cytokine. *J Invest Dermatol* **87**, 289-291.
- Schwarz, T.** (2005). Mechanisms of UV-induced immunosuppression. *Keio J Med* **54**, 165-171.
- Scott, C. L. und Begley, C. G.** (1999). The beta common chain (beta c) of the granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, interleukin 3 and interleukin 5 receptors. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1011-1015.
- Sellheyer, K., Bickenbach, J. R., Rothnagel, J. A., Bundmann, D., Longley, M. A., Krieg, T., Roche, N. S., Roberts, A. B. und Roop, D. R.** (1993). Inhibition of skin development by overexpression of transforming growth factor beta 1 in the epidermis of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5237-5241.
- Sheikh, M. S., Antinore, M. J., Huang, Y. und Fournance, A. J.** (1998). Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1. *Oncogene* **17**, 2555-2563.
- Shi, F. S., Weber, S., Gan, J., Rakhmievich, A. L. und Mahvi, D. M.** (1999). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) secreted by cDNA-transfected tumor cells induces a more potent antitumor response than exogenous GM-CSF. *Cancer Gene Ther* **6**, 81-88.
- Shi, Y., Liu, C. H., Roberts, A. I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Z. R., Tan, H. S. W., Das, G. und Devadas, S.** (2006). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Oncogene* **16**, 126-133.
- Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V.W. und Ullrich, S. E.** (1998). A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression. *J Immunol* **160**, 3783-3789.
- Shull, M. M., Ormsby, I., Kier, A. B., Pawlowski, S., Diebold, R. J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annuziata, N. und Doetschmann, T.** (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**, 693-699.
- Sieff, C. A., Emerson, S. G., Donahue, R. E., Nathan, D. G., Wang, E. A., Wong, G. G. und Clark, S. C.** (1985). Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a multilineage hematopoietin. *Science* **230**, 1171-1173.
- Siegel, P. M. und Massague, J.** (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 807-821.

- Silberstein, D. S., Owen, W. F., Gasson, J. C., DiPersio, J. F., Golde, D. W., Bina, J. C., Sobermann, R., Austen, K. F. und David, J. R.** (1986). Enhancement of human eosinophil cytotoxicity and leukotriene synthesis by biosynthetic (recombinant) granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* **137**, 3290-3294.
- Simon, J. C., Cruz, P. D., Bergstresser, P. R. und Tigelaar, R. E.** (1990). Low dose ultraviolet B-irradiated Langerhans Cells preferentially activate CD4<sup>+</sup> cells of the T helper 2 subset. *J Immunol* **145**, 2087-2091.
- Simon, J. C., Mosmann, T., Edelbaum, D., Schopf, E., Bergstresser, P. R. und Cruz, P. D.** (1994). *In vivo* evidence that ultraviolet B-induced suppression of allergic contact sensitivity is associated with functional inactivation of T<sub>H</sub>1 cells. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **10**, 206-211.
- Simon, J. C., Tigelaar, R. E., Bergstresser, P. R., Edelbaum, D. und Cruz, P. D.** (1991). Ultraviolet B radiation converts Langerhans cells from immunogenic to tolerogenic antigen-presenting cells: induction of specific clonal anergy in CD4<sup>+</sup> T helper 1 cells. *J Immunol* **146**, 485-491.
- Sisson, S. D. und Dinarello, C. A.** (1988). Production of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta und tumor nekrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulated factor. *Blood* **72**, 1368-1374.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., O'Connor, P. M. und Fornace, A. J.** (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* **10**, 1053-1059.
- Soehnge, H., Ouhitit, A. und Ananthaswamy, H. N.** (1997). Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. *Front Biosci* **2**, 538-551.
- Sontag, Y., Guikers, C. L., Vink, A. A., de Gruijl, F. R., van Loveren, H., Garssen, J., Roza, L., Kripke, M. L., van der Leun, J. C. und van Vloten, W. A.** (1995). Cells with UV-specific DNA damage are present in murine lymph nodes after *in vivo* UV irradiation. *J Invest Dermatol* **104**, 734-738.
- Soo Hoo, W., Lundeen, K. A., Kohrumel, J. R., Pham, N. L., Brostoff, S. W., Bartholomew, R. M. und Carlo, D. J.** (1999). Tumor cell surface expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor elicits antitumor immunity and protects from tumor challenge in the P815 mouse mastocytoma tumor model. *J Immunol* **162**, 7343-7349.
- Stadler, R. und Hartig, C.** (2003). Epidermale Tumoren. In: *Histopathologie der Haut*. Kerl, H., Garbe, C., Cerroni, L. und Wolff, H. H. (Hrsg.). Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, S. 577-578.
- Stagno, F., Guglielmo, P., Consoli, U., Fiumura, P., Russo, M. und Giustolisi, R.** (1999). Successful healing of hydroxyurea-related leg ulcers with topical granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **94**, 1479-1480.
- Stanley, E. R. und Heard, P. M.** (1977). Factors regulating macrophage production und growth. Purification und some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem* **252**, 4305-4312.

- Stanley, E. R., Metcalf, D., Sobieszczuk, P., Gough, N. M. und Dunn, A. R.** (1985). The structure und expression of the murine gene encoding granulocyte-macrophage colony stimulating factor: evidence for utilisation of alternative promoters. *Embo J* **4**, 2569-2573.
- Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J. L., Rayner, J. R. und Jenkins, B. J.** (1997). A family of cytokine inducible inhibitors of signaling. *Nature* **387**, 917-921.
- Starr, R. und Hilton, D. J.** (1999). Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* **21**, 47-52.
- Stary, A., Robert, C. und Sarasin, A.** (1997). Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells. *Mutat Res* **383**, 1-8.
- Stellmach, V. M. und Fuchs, E.** (1989). Exploring the mechanisms underlying cell type-specific and retinoid-mediated expression of keratins. *New Biol* **3**, 305-317.
- Stenn, K. S., Lawrence, L., Veis, D., Korsmeyer, S. und Seiberg, M.** (1994). Expression of the bcl-2 protooncogene in the cycling adult mouse hair follicle. *J Invest Dermatol* **103**, 107-111.
- Sterenberg, H. J. und van der Leun, J. C.** (1990). Tumorigenesis by a long wavelength UV-A source. *Photochem Photobiol* **51**, 325-330.
- Strausberg, R. L.** (2001). The cancer genome anatomy project: new resources for reading the molecular signatures of cancer. *J Pathol* **195**, 31-40.
- Sugihara, A., Okamoto, H. und Horio, T.** (2005). Effects of UVB on fascin expression in dendritic cells and Langerhans cells. *J Dermatol Sci* **40**, 177-185.
- Sweeny, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S. E., Hawkins, C. F., Wohlgemut, D. J. und Carrington, M.** (1996). A distinct cyclin a is expressed in germ cells in the mouse. *Development* **122**, 53-64.
- Szabowski, A., Maas-Szabowski, N. und Undrecht, S.** (2000). c-Jun und JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in the skin. *Cell* **103**, 745-755.
- Tachibana, M., Miyakawa, A. und Nakashima, J.** (2000). Autocrine growth promotion by multiple hematopoietic growth factors in the established renal cell carcinoma line KU-19-20. *Cell Tissue Res* **301**, 353-367.
- Tada, Y., Asahina, A., Nakamura, K., Tomura, M., Fujiwara, H. und Tamaki, K.** (2000). Granulocyte macrophage colony-stimulating factor inhibits IL-12 production of mouse langerhans cells. *J Immunol* **164**, 5113-5119.
- Tada, Y., Asahina, A., Nakamura, K., Miyazono, K., Tomura, M., Fujiwara, H. und Tamaki, K.** (2001). Transforming growth factor-beta up-regulates CD40-engaged IL-12 production of mouse Langerhans cells. *Eur J Immunol* **31**, 294-300.
- Takahashi, T., Tanaka, M., Brannan, C. I., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Suda, T. und Nagata, S.** (1994). Generalized lymphoproliferation disease (gld) in mice caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell* **76**, 969-976.

- Takahashi, K., Yan, B., Yamanishi, K., Imamura, S. und Coulombe, P. A.** (1998). The two functional keratin 6 genes of mouse are differentially regulated und evolved independently from their human orthologs. *Genomic* **53**, 170-183.
- Takashima, A. und Bergstresser, P. R.** (1996). Cytokine-mediated communication by keratinocytes und Langerhans cells with dendritic epidermal T cells. *Semin Immunol* **8**, 333-339.
- Takeda, K., Hatakeyama, K., Tsuchiya, Y., Rikiishi, H. und Kumagai, K.** (1991). A correlation between GM-CSF gene expression and metastases in murine tumors. *Int J Cancer* **47**, 413-420.
- Tang, A. und Udey, M. C.** (1992). Effects of ultraviolet radiation on murine epidermal Langerhans cells: doses of ultraviolet radiation that modulate ICAM-1 (CD54) expression und inhibit Langerhans cell function cause delayed cytotoxicity *in vitro*. *J Invest Dermatol* **99**, 83-89.
- Teunissen, M. B., Sylva-Steenland, R. M. und Bos, J. D.** (1993). Effect of low-dose ultraviolet-B radiation on the function of human T lymphocytes *in vitro*. *Clin Exp Immunol* **94**, 208-213.
- Teunissen, M. B., Piskin, G., di Nuzzo, S., Sylva-Steenland, R. M., de Rie, M. A. und Bos, J. D.** (2002). Ultraviolet B radiation induces a transient appearance of IL-4<sup>+</sup> neutrophils, which support the development of T<sub>H</sub>2 responses. *J Immunol* **168**, 3732-3739.
- Thomas, J. W., Lee-Lin, S. Q. und Green, E. D.** (1999). Human-mouse comparative mapping of the genomic region containing cdk6: localization of an evolutionary breakpoint. *Mamm Genome* **10**, 764-767.
- Thorens, B., Mermod, J. J. und Vassalli, P.** (1987). Phagocytosis und inflammatory stimuli induce GM-CSF mRNA in Macrophages through posttranscriptional regulation. *Cell* **48**, 671-679.
- Toews, G. B., Bergstresser, P. R. und Streilein, J. W.** (1980). Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* **124**, 445-453.
- Tornaletti, S. und Pfeiffer, G. P.** (1996). UV damage und repair mechanisms in mammalian cells. *BioEssays* **18**, 221-228.
- Trenam, C. W., Dabbagh, A. J., Morris, C. J. und Blake, D. R.** (1991). Skin inflammation induced by reactive oxygen species (ROS): an *in-vivo* model. *Br J Dermatol* **125**, 325-329.
- Trinchieri, G.** (1995). Interleukin-12 und interferon-gamma. Do they always go together? *Am J Pathol* **147**, 1534-1538.
- Tsukuda, M., Nagahara, T., Yago, T., Matsuda, H. und Yanoma, S.** (1993). Production of granulocyte colony-stimulating factor by head und neck carcinomas. *Biotherapy* **6**, 183-187.
- Tyrrell, R. M.** (1995). Ultraviolet radiation und free radical damage to skin. *Biochem Soc Sym* **61**, 47-53.
- Tyrrell, R. M.** (2000). Role for singlet oxygen in biological effects of ultraviolet A radiation. *Methods Enzymol* **319**, 290-296.
- Ullrich, S. E.** (1994). Mechanisms involved in the systemic suppression of antigen-presenting cell function by UV Irradiation. Keratinocyte-derived IL-10 modulates antigen-presenting cell function of splenic adherent cells. *J Invest Dermatol* **94**, 267-272.

- Ullrich, S. E.** (1995). The role of epidermal cytokines in the generation of cutaneous immune reactions and ultraviolet radiation-induced immune suppression. *Photochem Photobiol* **62**, 389-401.
- Ullrich, S. E.** (1996). Does exposure to UV radiation induce a shift to a T<sub>H</sub>2-like immune reaction? *Photochem Photobiol* **64**, 254-258.
- Ulrich, E., Kauffmann- Zeh, A., Hueber, A. O., Williamson, J., Chittenden, T., Ma, A. und Evan, G.** (1997). Gene structure, cDNA sequence, and expression of murine bak, a proapoptotic bcl-2 family member. *Genomics* **44**, 195-200.
- Urbanski, A., Schwarz, T., Neuner, P., Krutmann, J., Kirnbauer, R., Kock, A. und Luger, T. A.** (1990). Ultraviolet light induces increased circulating interleukin-6 in humans. *J Invest Dermatol* **94**, 808-811.
- Van Elsas, A., Hurwitz, A. A. und Allison, J. P.** (1999). Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* **190**, 355-366.
- Vermeer, M. und Streilein, J. W.** (1990). Ultraviolet B light-induced alterations in epidermal Langerhans cells are mediated in part by tumor necrosis factor-alpha. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **7**, 258-265.
- Vincek, V., Kurimoto, I., Medema, J. P., Prieto, E. und Streilein, J. W.** (1993). Tumor necrosis factor alpha polymorphism correlates with deleterious effects of ultraviolet B light on cutaneous immunity. *Cancer Res* **53**, 728-732.
- Vink, A. A., Berg, R. J., de Grujil, F. R., Lohman P. H., Roza, L. und Baan, R. A.** (1993). Detection of thymine dimers in suprabasal and basal cells of chronically UV-B exposed hairless mice. *J Invest Dermatol* **100**, 795-799.
- Vink, A. A., Sontag, Y., de Grujil, F. R., Roza, L. und Baan, R. A.** (1994). Immunochemical detection of cyclobutane thymine dimers in epidermal Langerhans cells of ultraviolet B-irradiated hairless mice. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **10**, 8-12.
- Vink, A. A., Yarosh, D. B. und Kripke, M. L.** (1996). Chromophore for UV-induced immunosuppression: DNA. *Photochem Photobiol* **63**, 383-386.
- Vishalakumar, S., Patel, H., Moharita, A. L., Harrison, J. S. und Rameshwar. P.** (2006). The anti-proliferative effect of neurokinin-A on hematopoietic progenitor cells is partly mediated by p53 activating the 5' flanking region of neurokinin-2 receptor. *Cell Signal* **18**, 422-432
- Vogelstein, B. und Kinzler, K. W.** (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* **70**, 523-526.
- Wachter, T., Averbek, M., Hara, H., Tesmann, J. P., Simon, J. C., Termeer, C. C. und Denfeld, R. W.** (2003). Induction of CD4<sup>+</sup> T cell apoptosis as a consequence of impaired cytoskeletal rearrangement in UVB-irradiated dendritic cells. *J Immunol* **171**, 776-782.
- Wada, H., Noguchi, Y., Marino, M. W., Dunn, A. R., Old, L. J.** (1997). T cell functions in granulocyte/macrophage colony-stimulating factor deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12557-12561.

- Wahl, S. M.** (1999). TGF-beta in the evolution and resolution of inflammatory and immune processes. Introduction. *Microbes Infect* **1**, 1247-1249
- Wahl, S. M., Orenstein, J. M. und Chen, W.** (2000). TGF-beta influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**, 71-79.
- Walsh, L. J.** (1995). Ultraviolet B irradiation of skin induces mast cell degranulation and release of tumor necrosis factor-alpha. *Immunol Cell Biol* **73**, 226-233.
- Wang, X. J., Greenhalgh, D. A., Bickenbach J. R., Jiang, A., Bundmann, D. S., Krieg, T., Derynck, R. und Roop, D. R.** (1997). Expression of dominant-negative type II transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) receptor in the epidermis of transgenic mice blocks TGF- $\beta$ -mediated growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2386-2391.
- Wang, X. J., Liefer, K. M., Tsai, S., O'Malley, B. W. und Roop, D. R.** (1999). Development of gene-switch transgenic mice that inducibly express transforming growth factor  $\beta$ 1 in the epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8483-8488.
- Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Friedberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G. et al.** (1995). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* **10**, 188-194.
- Washio, F., Ueda, M., Ito, A. und Ichihashi, M.** (1999). Higher susceptibility to apoptosis following ultraviolet B irradiation of xeroderma pigmentosum fibroblasts is accompanied by upregulation of p53 and downregulation of bcl-2. *Br J Dermatol* **140**, 1031-1037.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Itoh, N., Yonehara, S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. und Nagata, S.** (1992). The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* **148**, 1274-1279.
- Weiss, J. M., Renkl, A. C., Denfeld, R. W., de Roche, R., Spitzlei, M., Schopf, E. und Simon, J. C.** (1995). Low-dose UVB radiation perturbs the functional expression of B7.1 und B7.2 co-stimulatory molecules on human Langerhans cells. *Eur J Immunol* **25**, 2858-2862.
- WHO (World Health Organization).** <http://www.who.int/uv/faq/skincancer>
- Willis, A. G., Abdul-Rauf, M., Du, M., Price, H., Karran, L., Pan, L., Hamoudi, R., Catovsky, D., Isaacson, P. und Dyer, M. J.** (1998). Bcl-10 inhibits RAIDD induced apoptosis. *Cell* **96**, 35-45.
- Willis, I. und Cylus, L.** (1977). UVA erythema in skin: is it a sunburn? *J Invest Dermatol* **68**, 128-129.
- Wislez, M., Fleury-Feith, J., Rabbe, N., Moreau, J., Cesari, D., Milleron, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P. und Cadranel, J.** (2001). Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor und granulocyte colony-stimulating factor prolong the survival of neutrophils infiltrating bronchoalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma. *Am J Pathol* **159**, 1423-1433.
- Wong, G. G., Witek, J. S., Temple, P. A., Wilkens, K. M., Leary, A. C., Luxenberg, D. P., Jones, S. S., Brown, E. L., Kay, R. M., Orr, E. C. et al.** (1985). Human GM-CSF: molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins. *Science* **228**, 810-815.

- Woodcock, J. M., Bagley, C. J. und Lopez, A. F.** (1999). The functional basis of granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-3 and interleukin-5 receptor activation, basic and clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 1017-1025.
- Worley, J., Bechtol, K., Penn, S., Roach, D., Hanzel, D., Trounstein, M. und Barker, D.** (2000). A system approach to fabricating and analyzing DNA Microarrays. In: *Microarray Biochip Technology* (ed. by Mark Schena).
- Wozney, J. M. und Rosen, V.** (1988). Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Relat Res* **346**, 26-37.
- Xie, Y. und Muller, W. A.** (1993). Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 5569-5573.
- Xing, Z., Gauldie, J., Tremblay, G. M., Hewlett, B. R. und Addison, C.** (1997). Intradermal transgenic expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neutrophilia, epidermal hyperplasia, Langerhans cell/ macrophage accumulation, and dermal fibrosis. *Lab Invest* **77**, 615-622.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. und Beach, D.** (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704.
- Yamato, K., El-Hajjaoui, Z., Kuo, J. F. und Koeffler, H. P.** (1989). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: signals for its mRNA accumulation. *Blood* **74**, 1314-1320.
- Yang, E., Zha, J., Jockel, J., Boise, L. H., Thompson, C. B. und Korsmeyer, S. J.** (1995). Bad, a heterodimeric partner for Bcl-x<sub>L</sub> and Bcl-2, displaces bax and promotes cell death. *Cell* **80**, 285-291.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 und pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yoshikawa, T. und Streilein, J. W.** (1990). Tumor necrosis factor and ultraviolet B light have similar effects on contact hypersensitivity in mice. *Reg Immunol* **3**, 139.
- Young, A. R.** (1990). Cumulative effects of ultraviolet radiation on the skin: cancer and photoaging. *Semin Dermatol* **9**, 25-31.
- Young, D. C. und Griffin, J. D.** (1986). Autocrine secretion of GM-CSF in acute myeloblastic leukemia. *Blood* **68**, 1178-1181.
- Zhao, W., Kepley, C. L., Morel, P. A., Okumoto, L. M., Fukuoka, Y. und Schwartz, L. B.** (2006). Fc gamma RIIa, not Fc gamma RIIb, is constitutively and functionally expressed on skin-derived human mast cells. *J Immunol* **177**, 694-701.
- Ziegler, A., Leffel, D. J., Kunala, S., Sharma, H. W., Gailani, M., Simon, J. A., Halperin, A. J., Baden, H. P., Shapiro, P. E., Bale, A. E. und Brash, D. E.** (1993). Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4216-4220.
- Ziegler, A., Jonason, A. S., Leffell, D. J., Simon, J. A., Sharma, H. W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T. und Brash, D. E.** (1994). Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* **372**, 773-776.

**Zinzar, S. N., Svet-Moldavsky, G. J., Fogh, J., Mann, P. E., Arlin, Z., Iliescu, K. und Holland, J. F.** (1985). Elaboration of granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2. *J Clin Invest* **77**, 1857-1863.



## B. Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AcOH</b>	<i>acetic acid</i> Essigsäure
<b>Ag</b>	Agonist
<b>Ak</b>	Antikörper
<b>AML</b>	akute myeloide Leukämie
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>Ant</b>	Antagonist
<b>AP</b>	alkalische Phosphatase
<b>APC</b>	<i>antigen presenting cells</i> antigenpräsentierende Zellen
<b>APO-1</b>	<i>apoptosis antigen-1</i> Apoptose Antigen-1
<b>AS</b>	Aminosäure
<b>B[a]P</b>	Benzo[a]pyrene
<b>BCC</b>	<i>basal cell carcinoma</i> Basalzellkarzinom
<b>BLAST</b>	<i>basic local alignment search tool</i>
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BMP</b>	<i>bone morphogenetic protein</i> Knochenwachstumsfaktor
<b>BrdU</b>	Bromodeoxyuridin
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumin</i> Rinderserumalbumin
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>C</b>	<i>cytosin</i> Zytosin
<b>°C</b>	Grad Celcius
<b>ca.</b>	circa
<b>CD</b>	<i>clusters of differentiation</i> Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen
<b>cDNA</b>	<i>complimentary DNA</i> komplementäre DNA
<b>CHS</b>	<i>contact hypersensitivity</i> Kontakthypersensivität
<b>cm</b>	Zentimeter
<b>CPD</b>	<i>cyclobutan-pyrimidin dimer</i> Zyklobutan-Pyrimidin-Dimer
<b>CSF</b>	<i>colony-stimulating factor</i> koloniestimulierender Faktor
<b>CTL</b>	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i> zytotoxische T-Lymphozyten
<b>Da</b>	Dalton

<b>dATP</b>	Desoxyadenosyl-triphosphat
<b>DC</b>	<i>dendritic cells</i> dendritische Zellen
<b>DEPC</b>	Diethyl-Pyrocbonat
<b>DETC</b>	<i>dendritic epidermal T cells</i> dendritische epidermale T-Zellen
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>DISC</b>	<i>death-inducing signaling complex</i>
<b>DMBA</b>	7,12-Dimethylbenz(α)anthrazen
<b>DNA</b>	<i>desoxyribonucleic acid</i> Desoxyribonucleinsäure
<b>dNTP</b>	Desoxyribonucleotid
<b>DTH</b>	<i>delayed-type hypersensitivity</i> Hypersensitivität vom verzögerten Typ
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
<b>ELISA</b>	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> Immunologisches Nachweisverfahren
<b>EGR</b>	<i>early growth response factor</i>
<b>EST</b>	<i>expressed sequence tags</i>
<b>et al.</b>	<i>et alii (lat.)</i> und andere
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>FADD</b>	<i>Fas associating protein with death-domain</i>
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FKS</b>	fötales Kälberserum
<b>G</b>	Guanin
<b>G<sub>0</sub>-Phase</b>	Ruhephase außerhalb des Zellzyklus'
<b>G<sub>1</sub>-Phase</b>	erste Ruhephase des Zellzyklus'
<b>G<sub>2</sub>-Phase</b>	zweite Ruhephase des Zellzyklus'
<b>g</b>	Gramm oder Erdbeschleunigung
<b>G-CSF</b>	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i> Granulozyten koloniestimulierender Faktor
<b>GDF</b>	<i>growth differentiation factor</i>
<b>GM-CSF</b>	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
<b>h</b>	<i>hour</i> Stunde
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-2-Ethansulfonsäure
<b>HG</b>	Haushaltsgen
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
<b>ICE</b>	<i>interleukin-1beta converting enzyme</i>
<b>IFN-γ</b>	Interferon-gamma
<b>IgE</b>	Immunglobulin E
<b>IgG</b>	Immunglobulin G

<b>IL</b>	Interleukin
<b>IPTG</b>	Isopropylthio- $\beta$ -D-galaktosid
<b>JAK</b>	Janus Kinase
<b>kb</b>	Kilobasen
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kJ</b>	Kilojoule
<b>konz.</b>	konzentriert
$\lambda$	Wellenlänge
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	<i>Luria burtani</i>
<b>LC</b>	<i>Langerhans cells</i> Langerhans-Zellen
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>Lsg.</b>	Lösung
$\mu$	mikro
<b>m</b>	milli
<b>M</b>	Molekularmasse oder Mitose
<b>mA</b>	Milliampere
<b>MAPK</b>	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
<b>M-CSF</b>	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> Makrophagen koloniestimulierender Faktor
<b>mg</b>	Milligramm
<b>MGG</b>	May-Grünwald-Giemsa
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MNNG</b>	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitro-Guanidin
<b>MOPS</b>	3-( <i>N</i> -Morpholino)-Propansulfonsäure
<b>mRNA</b>	<i>messenger ribonucleic acid</i> Boten-RNA
<b>mt</b>	mutiert
$\mu$ l	Mikroliter
<b>ng</b>	Nanogramm
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NMU</b>	Methyl-Nitrosoharnstoff
<b>Nr.</b>	Nummer
<b>OD<sub>xnm</sub></b>	optische Dichte bei der Wellenlänge von x nm
<b>ORF</b>	<i>open reading frame</i> offenes Leseraster
<b>p.a.</b>	<i>pro analysi (lat.)</i> für die Analyse
<b>PI3-K</b>	Phosphatidylinositol 3-Kinase
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i> phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> Polymerasekettenreaktion
<b>pH</b>	pH-Wert
<b>p</b>	Pico oder p-Wert

<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PKDL</b>	<i>post kala-azar dermal leishmaniasis</i> Post-Kala-Azar-Hautleishmanid
<b>polyA-Signal</b>	Polyadenylierungssignal
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> Ribonukleinsäure
<b>RNase</b>	Ribonuklease
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i> Reaktive Sauerstoffspezies
<b>rpm</b>	<i>rotations per minute</i> Umdrehungen pro Minute
<b>RT</b>	Raumtemperatur oder reverse Transkription
<b>S</b>	DNA-Synthesephase innerhalb des Zellzyklus
<b>s</b>	Sekunden
<b>SCC</b>	<i>squamous cell carcinoma</i> Plattenepithelkarzinom
<b>SCCL</b>	<i>small cell carcinoma of the lung</i> kleinzelliges Lungenkarzinom
<b>SDS</b>	<i>sodiumdodecylsulfate</i> Natriumdodecylsulfat
<b>SEM</b>	<i>standard error of the mean</i> Standardfehler des Mittelwertes
<b>s.o.</b>	siehe oben
<b>S-Phase</b>	Synthesephase des Zellzyklus
<b>STAT</b>	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
<b>T</b>	Thymin
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TE</b>	Tris EDTA-Puffer
<b>Tg</b>	transgen
<b>TGF</b>	<i>transforming growth factor</i>
<b>T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2</b>	T-Helfer-Zellen vom Typ 1 bzw. 2
<b>TNF</b>	<i>tumor necrosis factor</i>
<b>TPA</b>	12-O-Tetradecaoylphorbol-13-Azetat
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
<b>TUNEL</b>	<i>terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated nick end labeling</i>
<b>U</b>	<i>Units</i> Enzymeinheiten
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>UCA</b>	<i>urocan acid</i> Urocansäure
<b>üN</b>	über Nacht
<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>vgl.</b>	vergleiche

---

<b>Vol.</b>	Volumen
<b>v/v</b>	<i>volume for volume</i>
<b>v/w</b>	<i>volume per weight</i>
	Volumenprozent
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>
	Weltgesundheitsorganisation
<b>wt</b>	Wildtyp
<b>w/w</b>	<i>weight per weight</i>
	Gewichtsprozent
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>ZVTE</b>	Zentrale Versuchstiereinrichtung

## C. Darstellungsverzeichnis

C. I Abbildungen		Seite
Abb. 1.1:	Aufbau der Haut und der Epidermis. Penetrationstiefe der UV-A- und UV-B-Strahlen.	2
Abb. 1.2:	Wirkung der UV-B-Strahlung auf die Haut und das Immunsystem.	5
Abb. 3.1:	Chronische UV-B-Karzinogenese. Anzahl der benignen Läsionen pro Tier der Linien Keratin 10/GM-CSF Antagonist und Keratin 5/GM-CSF Agonist über 30 Wochen.	41
Abb. 3.2:	Chronische UV-B-Karzinogenese. Anzahl der Karzinome pro Tier der Linien Keratin10/GM-CSF Antagonist und Keratin5/GM-CSF Agonist über 30 Wochen.	42
Abb. 3.3:	Chronische UV-B-Karzinogenese. Anzahl der transgenen und Kontrolltiere im Verlauf des Experimentes.	43
Abb. 3.4:	Chronische UV-B-Karzinogenese. Relative Konversionsraten der Kontrollgruppe und transgenen Linien nach 30 Versuchswochen.	44
Abb. 3.5:	Chronische UV-B-Karzinogenese. Graduierung der Plattenepithelkarzinome nach <i>Broders</i> .	45
Abb. 3.6:	Akute UV-B-Bestrahlung. Histologische Untersuchung von Präparaten unbestrahlter und bestrahlter Haut.	49
Abb. 3.7:	Mitotische Indizes in der Epidermis nach akuter UV-B-Bestrahlung.	52
Abb. 3.8:	Infiltration von Mastzellen und neutrophilen Granulozyten in die Dermis nach akuter UV-B-Bestrahlung.	53
Abb. 3.9:	Histologische Untersuchung von Präparaten unbestrahlter und bestrahlter Haut zur Ermittlung der Mastzellanzahl.	55

---

Abb. 3.10:	Histologische Untersuchung von Präparaten unbestrahlter und bestrahlter Haut zur Ermittlung der Anzahl von neutrophilen Granulozyten und Mastzellen.	56
Abb. 3.11:	cDNA <i>Microarray</i> -Analyse.	58
Abb. 3.12:	Konzentrationsbestimmung von GM-CSF bzw. des GM-CSF-Antagonisten in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.	61
Abb. 3.13:	Konzentrationsbestimmung von IL-10 in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.	63
Abb. 3.14:	Konzentrationsbestimmung von TNF- $\alpha$ in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.	64
Abb. 3.15:	Konzentrationsbestimmung von TGF- $\beta$ 1 in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.	65
Abb. 3.16:	Konzentrationsbestimmung von IL-4 in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.	66
Abb. 3.17:	Konzentrationsbestimmung von IL-6 in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.	68
Abb. 3.18:	Konzentrationsbestimmung von IL-12p40 und Interferon- $\gamma$ in der Haut nach akuter UV-B-Bestrahlung.	69

**C. II Tabellen**

Tab. 3.1:	Chronische UV-B-Karzinogenese. Graduierung und Verteilung von Karzinomen aller untersuchten Versuchsgruppen.	46
Tab. 3.2:	Zusammenfassung der Ergebnisse aus den cDNA- <i>Microarray</i> -Analysen.	58
Tab. 3.3:	Darstellung der Ergebnisse aus der <i>Lightcycler</i> -Analyse.	59



## D. Anhang

Im Folgenden sind die Gene aufgelistet, die auf dem cDNA-Microarray vertreten waren. Die Nummerierung für die Position auf dem Chip setzt sich dabei wie folgt zusammen: Der erste Großbuchstabe mit der Zahl steht für einen der vier *Microarrays*. Die Anordnung erfolgte jeweils von links nach rechts (also A1, A2 in der ersten Reihe; B1, B2 in der zweiten Reihe). Der kleine Buchstabe steht für die Reihe eines jeden *Subarrays* (a-l). Die letzte Ziffer gibt die Position in der jeweiligen Reihe an (1-16).

Genname	Accession-Nr.	Chip-Position
<b>A1</b>	L16462	A1k13; A1k14
<b>Acvr1</b> ( <i>Activin A Receptor type 1</i> )	NM_007394	A1k1; A1k2; B1i1; B1i2
<b>Acvr1b</b> ( <i>Activin A Receptor type 1b</i> )	NM_007395	B2i1; B2i2
<b>Acvr2b</b> ( <i>Activin A Receptor type 2b</i> )	NM_007397	B1h5; B1h6
<b>B7.1</b>	AF065893	B1e5, B1e6
<b>B7.2</b>	AF065897	A1f15, A1f16
<b>Bad</b>	L37296	B1f13, B1f14
<b>Bak</b>	Y13231	A1f13, A1f14
<b>Bax</b>	L22472	B1f11, B1f12
<b>Bcl-2</b>	M16506	A1f11, A1f12
<b>Bcl-3</b>	M90397	B1f9; B1f10
<b>Bcl-10</b>	AJ006289	A1f9, A1f10
<b>Bcl-x<sub>L</sub></b>	L35049	B1f7, B1f8
<b>β-Actin</b>	X03765	A2j5, A2j6; B1f15, B1f16; B2e13; B2e14
<b>β<sub>2</sub>-microglobulin</b>	NM_004048	B1d1, B1d2
<b>BimEL</b>	AF032459	A1f7, A1f8
<b>Blimp1</b>	U08185	B2h7; B2h8
<b>BMP2</b> ( <i>Bone morphogenetic protein 2</i> )	NM_007553	A2i15, A2i16
<b>BMP4</b> ( <i>Bone morphogenetic protein 4</i> )	NM_007554	A1i3, A1i4
<b>BMP5</b> ( <i>Bone morphogenetic protein 5</i> )	NM_007555	A2i3, A2i4
<b>BMP8a</b> ( <i>Bone morphogenetic protein 8a</i> )	M97017	A1j9, A1j10
<b>BMP9</b> ( <i>Bone morphogenetic protein 9</i> )	AF188286	A1h7, A1h8
<b>BMP10</b> ( <i>Bone morphogenetic protein 10</i> )	NM_009756	B1f5, B1f6
<b>BMP R1a</b> ( <i>Bone morphogenetic protein Receptor 1a</i> )	NM_009758	B1i13; B1i14
<b>BMP R1b</b> ( <i>Bone morphogenetic protein Receptor 1b</i> )	NM_007560	B2i13; B2i14
<b>BMP R2</b> ( <i>Bone morphogenetic protein Receptor, type II</i> )	NM_007561	A2g11, A2g12
<b>Camk-2</b> ( <i>Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II</i> )	X63615	B1k3; B1k4
<b>Caspase 1</b>	L28095	A2k15, A2k16
<b>Caspase 8</b>	AF067834	B2j15; B2j16
<b>Cathepsin D</b>	X53337	B1j7; B1j8
<b>Cathepsin H</b>	U06119	B2j7; B2j8
<b>Cathepsin L</b>	X06086	A1l11, A1l12
<b>CD3e</b>	NM_007648	B1h3, B1h4
<b>CD4</b>	NM_013488	B2h3; B2h4
<b>CD8b</b>	NM_009858	B1g7, B1g8
<b>CD11a</b>	AF065902	A1h13; A1h14

<b>CD19</b>	NM_009844	B1h7; B1h8; B2g7; B2g8
<b>CD44</b>	BC005676	A2i11, A2i12
<b>Cdc2 homolog (s, pombe)-like</b>	M58633	B2g13; B2g14
<b>Cdc42</b>	U37720	B2k3; B2k4
<b>Cdc2</b>	NM_013486	B2h15; B2h16
<b>cdk4 (Cyclin-dependent kinase 4)</b>	L01640	B2h9; B2h10
<b>cdk6 (Cyclin-dependent kinase 6)</b>	AF132483	A1f5, A1f6
<b>cdk7 (Cyclin-dependent kinase 7)</b>	U11822	B1g13, B1g14
<b>cdk inhibitor 1A (p21) (Cyclin-dependent kinase Inhibitor 1A)</b>	U24173	A1i5, A1i6
<b>cdk inhibitor 1B (p27) (Cyclin-dependent kinase Inhibitor 1B)</b>	U09968	A2i5, A2i6; B1e9, B1e10
<b>cdk inhibitor 1C (p57) (Cyclin-dependent kinase Inhibitor 1C)</b>	U20553	A1h9, A1h10
<b>cdk inhibitor 2C (p18) (Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2C)</b>	U19596	B1g1, B1g2
<b>cdk inhibitor 2D (p19) (Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2D)</b>	U20497	B1e11, B1e12; B2g1; B2g2
<b>c-myc (Myelocytomatosis Oncogene)</b>	NM_010849	B1h15; B1h16
<b>collagen pro-alpha-1 type I chain</b>	U08020	B1i7; B1i8
<b>c-rel</b>	X15842	B2f15; B2f16
<b>Csf2rb2 (Colony-stimulating factor 2 Receptor, beta 2)</b>	NM_007781	B1i9; B1i10
<b>Csf2rb1 (Colony-stimulating factor 2 Receptor, beta 1)</b>	NM_007780	A2h15, A2h16
<b>Cyclin A2</b>	X75483.1	A1i7, A1i8
<b>Cyclin B</b>	X58708	A2i7, A2i8
<b>Cyclin B2</b>	X66032	A1h11, A1h12
<b>Cyclin C</b>	U62638	A2h11, A2h12
<b>Cyclin D1</b>	S78355	A1g15, A1g16
<b>Cyclin D2</b>	M83749	A2g15, A2g16
<b>Cyclin D3</b>	NM_007632	A1g3, A1g4
<b>Cyclin E</b>	X75888	A2g3, A2g4
<b>Cyclin F</b>	Z47766	B1i5, B1i6
<b>Cyclin G</b>	Z37110	B2i5; B2i6
<b>Cyclin G2</b>	U95826	B1h9; B1h10
<b>E-Cadherin/L-CAM</b>	X06115	B2i15; B2i16
<b>EGF (Early growth factor)</b>	NM_010113	B2i9; B2i10
<b>Epimorphin</b>	E06629	B1i3; B1i4
<b>ERG1 (Early response gene)</b>	NM_007913	A2k13, A2k14
<b>Fadd (Fas (TNFRSF6)-associated via death domain)</b>	NM_010175	B1j15; B1j16
<b>Fas</b>	M83649	A2f13, A2f14
<b>FasL (Fas Ligand)</b>	U06948	B2f11; B2f12
<b>FGF-9 (Fibroblast growth factor)</b>	D38258	A2j9, A2j10
<b>Fibronectin</b>	BC004724	A2k1, A2k2
<b>fos (Osteosarcoma Oncogene)</b>	NM_010234	B2i11; B2i12
<b>GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase)</b>	NM_008084	A1j5, A1j6, A2e15, A2e16
<b>GATA-4 (GATA-binding transcription factor)</b>	M98339	A2j11, A2j12
<b>G-CSF (Granulocyte colony-stimulating factor)</b>	M13926	A2g7, A2g8
<b>GM-CSF (Granulocyte macrophage-stimulating factor)</b>	X03020	A1h15, A1h16
<b>growth hormone receptor</b>	M33324	B2l1; B2l2
<b>HMBS (Hydroxymethyl-bilane synthase)</b>	NM_000190	A1d11, A1d12
<b>HPRT (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase)</b>	NM_000194	A1d1, A1d2
<b>Hsp 70 (Heat shock protein 70 kDa)</b>	D78645	A2g1, A2g2
<b>Hsp 25 (Heat shock protein, 25 kDa)</b>	U03560	A2h9, A2h10
<b>Hsp 60 (Heat shock protein, 60 kDa)</b>	X53584	A1g13, A1g14

<b>Hsp 84</b> ( <i>Heat shock protein, 84 kDa 1</i> )	M36829	A2g13, A2g14
<b>Hsp 86</b> ( <i>Heat shock protein, 86 kDa 1</i> )	M36830	A1g1, A1g2
<b>ICAM1</b> ( <i>Intercellular adhesion molecule 1</i> )	X52264	A1i9, A1i10
<b>IFN-<math>\gamma</math></b> ( <i>Interferon-<math>\gamma</math></i> )	K00083	B2f7; B2f8
<b>IFN-<math>\gamma</math>R</b> ( <i>Interferon-<math>\gamma</math> Receptor</i> )	NM_010511	A1h1, A1h2; B1i13; B1i14
<b>I<math>\kappa</math>B-<math>\beta</math></b>	U19799	B2e7; B2e8; B2f9; B2f10
<b>IL-1<math>\beta</math></b> ( <i>Interleukin 1<math>\beta</math></i> )	M15131	A1g5, A1g6
<b>IL-2</b> ( <i>Interleukin 2</i> )	AF065914	B2i5; B2i6
<b>IL-3</b> ( <i>Interleukin 3</i> )	NM_010556	B2f5; B2f6
<b>IL-4</b> ( <i>Interleukin 4</i> )	M25892	A2i13, A2i14
<b>IL-5</b> ( <i>Interleukin 5</i> )	NM_010558	B2k9; B2k10
<b>IL-6</b> ( <i>Interleukin 6</i> )	NM_031168	B2j13; B2j14
<b>IL-7</b> ( <i>Interleukin 7</i> )	X07962	B1k15; B1k16
<b>IL-11</b> ( <i>Interleukin 11</i> )	U03421	B1i7; B1i8
<b>IL-12b</b> ( <i>Interleukin 12b</i> )	NM_008352	B2i7; B2i8
<b>IL-12p40</b> ( <i>Interleukin 12p40</i> )	M86671	A1d3, A1d4, A1j15, A1j16
<b>IL-13</b> ( <i>Interleukin 13</i> )	NM_008355	A2i9, A2i10
<b>IL-15</b> ( <i>Interleukin 15</i> )	U14332	B1h11; B1h12
<b>IL-17</b> ( <i>Interleukin 17</i> )	NM_010552	A2f7; A2f8
<b>IL-18</b> ( <i>Interleukin 18</i> )	NM_008360	A1i1, A1i2
<b>IL-18R</b> ( <i>Interleukin 18 Receptor</i> )	NM_008365	A1i9, A1i10
<b>IL-1R2</b> ( <i>Interleukin 1 Receptor 2</i> )	X59769	A2g5, A2g6
<b>IL-4R<math>\alpha</math></b> ( <i>Interleukin 4 Receptor, alpha</i> )	M27959	B2i13; B2i14
<b>IL-7R</b> ( <i>Interleukin 7 Receptor</i> )	M29697	B1k17; B1k18
<b>IL-9R</b> ( <i>Interleukin 9 Receptor</i> )	M84746	B1f3, B1f4
<b>IL-6 signal transducer gp130</b>	NM_010560	A1h3, A1h4
<b>Inhba</b> ( <i>Inhibin beta-A</i> )	NM_008380	A2h7, A2h8
<b>Inhbc</b> ( <i>Inhibin beta-C</i> )	NM_010565	A1g11, A1g12
<b>integrin <math>\alpha</math> 3 (Cd49c)</b>	D13867	A2k5, A2k6
<b>integrin <math>\alpha</math> 4 (Cd49d)</b>	X53176	B2j11; B2j10
<b>integrin <math>\alpha</math> 6</b>	X69902	B1j9; B1j10
<b>integrin <math>\alpha</math> 7</b>	L23423	A2i13, A2i14
<b>integrin <math>\alpha</math> M (Cdli b)</b>	X07640	A1i13, A1i14
<b>integrin <math>\beta</math> 2 (Cd18)</b>	X14951	B1k5; B1k6
<b>integrin <math>\beta</math> 7</b>	M95633	A2i1, A2i2
<b>integrin-b1</b> ( <i>Integrin beta subunit</i> )	Y00769	A1i1, A1i2
<b>JAK3</b> ( <i>Janus kinase 3</i> )	L33768	B2k7; B2k8
<b>jun</b> ( <i>Jun oncogene</i> )	NM_010591	B1i11; B1i12
<b>Jun proto-oncogen related gene</b>	J05205	B2g15; B2g16
<b>Jun-B oncogene</b>	J03236	B1g15; B1g16
<b>KGF-Receptor</b> ( <i>Keratinocyte growth factor Receptor</i> )	M63503	B1h13, B1h14
<b>KRT1</b> ( <i>Keratin 1</i> )	NM_016958	A1f3, A1f4
<b>KRT6</b> ( <i>Keratin 6</i> )	NM_008476	A1d15, A1d16
<b>KRT8</b> ( <i>Keratin 8</i> )	NM_000224	B1e15, B1e16
<b>KRT10</b> ( <i>Keratin 10</i> )	AF245658	B1f1, B1f2
<b>KRT14</b> ( <i>Keratin 14</i> )	NM_016958	A1e15, A1e16
<b>KRT18</b> ( <i>Keratin 18</i> )	NM_000224	A1f1, A1f2
<b>KRT20</b> ( <i>Keratin 20</i> )	NM_023256	B1d5, B1d6
<b>L19</b>	BC087961	B1d3, B1d4
<b>L32</b>	NM_172086	A1d7, A1d8

<b>LIF</b> ( <i>Leukemia inhibitory factor</i> )	X06381	B1111; B1112
<b>limk</b> ( <i>Lim kinase</i> )	U15159	B2j11; B2j12
<b>Ltbp1</b> ( <i>Latent transforming growth factor <math>\beta</math> binding protein 1</i> )	NM_019919	A2i1, A2i2
<b>Ltbp2</b> ( <i>Latent transforming growth factor <math>\beta</math> binding protein 2</i> )	NM_013589	A1h5, A1h6
<b>L-Selectin</b>	NM_011346	A1i11, A1i12
<b>Madh1</b> ( <i>Smad1</i> )	NM_008539	B1j1; B1j2
<b>Madh2</b> ( <i>Smad2</i> )	NM_010754	A2j15, A2j16
<b>Madh3</b> ( <i>Smad3</i> )	NM_016769	A1g9, A1g10
<b>Madh4</b> ( <i>Smad4</i> )	NM_008540	A2g9, A2g10
<b>Madh5</b> ( <i>Smad5</i> )	NM_008541	B1l5; B1l6
<b>Madh6</b> ( <i>Smad6</i> )	NM_008542	B1k9; B1k10
<b>Madh7</b> ( <i>Smad7</i> )	NM_008543	A1i15, A1i16
<b>MAPK10</b> ( <i>Mitogen-activated protein (MAP) kinase stress activated protein B</i> )	L35236	B1j11; B1j12
<b>MAPK PK2</b> ( <i>MAP kinase-activated protein kinase 2</i> )	X76850	A2l15, A2l16
<b>MAPKK8</b>	D13759	B2g3; B2g4
<b>MAPKKK3</b>	U43187	A2l3, A2l4
<b>MAPKKI</b>	L02526	A1l3, A1l4
<b>MAPK14</b>	U10871	A1l15, A1l16
<b>mast cell protease 4</b>	M55617	A1k3, A1k4
<b>M-CSF</b> ( <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> )	NM_007778	A1g7, A1g8
<b>mdm2</b>	X58876	B2i3; B2i4
<b>MMP2</b> ( <i>Matrix metalloproteinase 2</i> )	M84324	A2l11, A2l12
<b>MMP9</b> ( <i>Matrix metalloproteinase 9</i> )	X72795/Z27231	A1k15, A1k16
<b>Myosine heavy chain</b>	M76601	B2k15; B2k16
<b>NF-<math>\kappa</math>Bp105</b> ( <i>Nuclear factor kappa B p105</i> )	L28118	A1i13, A1i14
<b>NF-<math>\kappa</math>Bp65</b> ( <i>Nuclear factor kappa B p65</i> )	M61909	B2g9; B2g10
<b>p15</b> ( <i>Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2B (inhibits CDK4)</i> )	BC002010	B1e13, B1e14
<b>p18</b> ( <i>Cdk4 and Cdk6 Inhibitor p18 protein</i> )	U19596	A1e13, A1e14
<b>p50</b> ( <i>Transcription factor NF-kappa-B DNA-binding subunit</i> )	M57999	A1e9, A1e10
<b>PCNA</b> ( <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> )	X53068	A1j11, A1j12
<b>PDGF-A</b> ( <i>Platelet-derived growth factor, alpha</i> )	NM_008808	B1j5; B1j6; B2l7; B2l8
<b>PDGF-B</b> ( <i>Platelet-derived growth factor, beta</i> )	NM_011057	B2j5; B2j6
<b>PDGF R<math>\alpha</math></b> ( <i>Platelet-derived growth factor, Receptor alpha</i> )	NM_011058	A2h3, A2h4; B1k11; B1k12
<b>PDGF R <math>\beta</math></b> ( <i>Platelet-derived growth factor, Receptor beta</i> )	NM_008809	B2k11; B2k12
<b>PECAM</b> ( <i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i> )	NM_008816	B2f3; B2f4; B2k5; B2k6
<b>pF4</b> ( <i>platelet factor 4</i> )	AB017491	B1i15; B1i16
<b>plasminogen activator inhibitor, type II</b>	X16490	B2l9; B2l10
<b>plasminogen activator, tissue</b>	J03520	A1j7, A1j8
<b>plasminogen activator, urokinase</b>	X02389	A2j7, A2j8
<b>P-Selectin</b>	NM_011347	A2f3, A2f4; B2h1; B2h2
<b>raf-related oncogene</b>	M13071	B1g3, B1g4
<b>relA</b> ( <i>Transcription factor p65 (NF-kappa-B p65)</i> )	M61909	B2f1; B2f2
<b>relB</b>	M83380	A2e9, A2e10
<b>SDHA</b> ( <i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A</i> )	NM_004168	B1d7, B1d8
<b>serine protease inhibitor</b>	X70296	A2k3, A2k4
<b>serine protease inhibitor</b>	X69832	B2k13; B2k14
<b>serine protease inhibitor 2-2</b>	M64086	B1k13; B1k14
<b>SP1</b> ( <i>Transcription factor Sp1</i> )	AF062566	B2h5; B2h6

<b>STAT1</b> ( <i>Signal transducer and acitvator of transcription 1</i> )	NM_009283	B2h13; B2h14
<b>STAT3</b> ( <i>Signal transducer and acitvator of transcription 3</i> )	U06922	B1l15; B1l16
<b>STAT5A</b> ( <i>Signal transducer and acitvator of transcription 5A</i> )	NM_011488	B2l15; B2l16
<b>STRAP</b> ( <i>Serine/threonine kinase receptor associated protein</i> )	NM_011499	B1g9, B1g10
<b>TBP</b> ( <i>TATA box binding protein</i> )	NM_003194	B2l3; B2l4; A1d13, A1d14
<b>TGF-<math>\alpha</math></b> ( <i>Transforming growth factor a</i> )	NM_031199	A2i9, A2i10
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b> ( <i>Transforming growth factor <math>\beta</math>1</i> )	NM_011577	A1d9,A1d10; B1e7, B1e8
<b>TGF-<math>\beta</math>2</b> ( <i>Transforming growth factor <math>\beta</math>2</i> )		A1e7, A1e8
<b>TGF-<math>\beta</math>3</b> ( <i>Transforming growth factor <math>\beta</math>3</i> )	NM_009368	A1d5,A1d6, A1j3, A1j4
<b>thrombomodulin</b>	X14432	B2l11; B2l12
<b>Timp</b> ( <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i> )	NM_011593	A1l7, A1l8
<b>Timp 2</b> ( <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 2</i> )	M93954	A2l7, A2l8; B1k1; B1k2
<b>Timp 3</b> ( <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i> )	L19622	B2k1; B2k2
<b>Tnc</b> ( <i>tenascin C</i> )	NM_011607	B1h1; B1h2
<b>TNF Receptor 1</b> ( <i>Tumor necrosis factor Receptor 1</i> )	NM_011609	B1j3; B1j4
<b>TNF Receptor 2</b> ( <i>Tumor necrosis factor Receptor 1</i> )	NM_011610	B2j3; B2j4
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> ( <i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )	NM_019980	B2g5; B2g6
<b>TNF-ligand, member 10</b> ( <i>Tumor necrosis factor Ligand 10</i> )	U37522	A2k7, A2k8
<b>TNF-ligand, member5</b> ( <i>Tumor necrosis factor Ligand 5</i> )	X65453	B2e15; B2e16
<b>TNF-R 1a</b> ( <i>Tumor necrosis factor Receptor 1a</i> )	X57796	A1k7, A1k8
<b>TTF-I</b> ( <i>Transcription termination factor</i> )	X83974	B2h11; B2h12
<b>Ubiquitin C</b>	M26880	B1d9, B1d10
<b>V-CAM-1</b> ( <i>Vascular cell adhesion molecule 1</i> )	X67783	A1k5,A1k6; A2h13, A2h14
<b>VEGF-A</b> ( <i>Vascular endothelial growth factor A</i> )	NM_009505	B1g5; B1g6
<b>XBP1</b> ( <i>X box binding protein-1</i> )	AF027963	B1g11, B1g12; B2g11; B2g12
<b>zinc finger protein 36</b>	M57422	B1k7; B1k8





