

Wechselwirkungen UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktionsprozesse in humanen Hautzellen

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Karsten Ruwiedel
aus Düsseldorf

Düsseldorf, August 2007

Aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf gGmbH. Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissen-
schaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. J. Krutmann

Koreferent: Prof. Dr. D. Riesner

Koreferent: Prof. Dr. D. Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2007

DANKSAGUNG

Bei Prof. Dr. J. Krutmann möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir diese Arbeit am Institut für umweltmedizinische Forschung ermöglichte und mir vielfältige und interessante Aufgaben übertrug. Viele Arbeitsbesprechungen brachten wertvolle Anregungen für diese Arbeit hervor und gaben mir Gelegenheit in vielerlei Hinsicht über den Tellerrand des eigenen Themas zu schauen.

Prof. Dr. D. Riesner und Prof. Dr. D. Willbold danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferates.

„Die drei Damen vom Grill“, insbesondere aber Frau Dr. K. Medve-Koenigs, haben mich bei der Bestrahlung von Probanden und durch die Entnahme von Hautbiopsien im Rahmen der *in vivo*-Studie tatkräftig unterstützt und nebenbei mein Ohr gerettet.

Ich danke den vielen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppen Zellbiologie und molekulare Alternsforschung, besonders aber Frau Heidi Brenden und Frau Suse Bruhnke für Zellkultur- und PCR-Support, ich wünsche Euch allen noch viel Erfolg für Eure jeweiligen Projekte!

Dr. T. D. Rockel schlug mich in den letzten vier Jahren etwa 1489 mal im Blitzschach (bei 27 Siegen). Das war nicht schön, aber lehrreich.

Mein Lieblingsgangster Calles produzierte den Song „Wo seid Ihr...?“ und damit den Soundtrack zur Promotion. Danke für dieses wundervolle Stück Musik.

„Der Preisträger“, Dr. S. Schieke, führte mich so manches mal zurück auf den Pfad der Effizienz.

Dr. P. Schröder danke ich für die häufige Androhung körperlicher Gewalt und dafür, dass es niemals zur Anwendung solcher kam.

Den vielen Korrekturlesern dieser Arbeit danke ich für Ihren Einsatz und Dr. Gerhard Steger für die Unterstützung im Kampf mit der EDV.

Bei Dr. E. Fritsche möchte ich für ihre Geduld mit „Altlasten“ und neue Perspektiven bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau und Funktion der menschlichen Haut	1
1.2	Ultraviolette Strahlung	2
1.3	Klinische Wirkung von UV-Strahlung auf die Haut	4
1.4	Molekulare Grundlagen der Wirkung von UV-Strahlung auf die Haut	5
1.4.1	Durch UV-Strahlung ausgelöste Signaltransduktionsprozesse	5
1.4.2	MMPs und die extrazelluläre Matrix der Dermis	7
1.4.3	UV-induzierte DNS-Schäden und die Regulation des Zellzyklus	7
1.5	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Zellkultur primärer humaner Hautzellen	11
2.1.1	Präparation primärer humaner dermaler Fibroblasten	11
2.1.2	Präparation primäre humaner epidermaler Keratinozyten	12
2.1.3	Medien und Lösungen für die Zellkultur	12
2.2	Strahlungsquellen und Bestrahlung von Zellkulturen	13
2.3	Western-Blot	15
2.3.1	SDS-Gelelektrophorese	15
2.3.2	Proteinkonzentrationsbestimmung	15
2.3.3	Western-Blot	16
2.3.4	Puffer und Lösungen für Western-Blot und Gelelektrophorese	16
2.3.5	Dokumentation und Quantifizierung	18
2.4	Behandlung von Zellkulturen mit Ceramiden	18
2.5	Zellzyklusanalyse	18
2.5.1	Puffer und Lösungen für die Zellzyklusanalyse	19
2.6	Nachweis apoptotischer Zellen durch FACS-Analyse	20
2.7	MTT-Färbung als Viabilitätstest	20
2.7.1	Puffer und Lösungen für die MTT-Färbung	21
2.8	Comet Assay	21
2.8.1	Puffer und Lösungen für den Comet Assay	23
2.9	RT-PCR	23
2.9.1	RNS-Isolation	23
2.9.2	Durchführung der cDNS-Synthese und RT-PCR	24
2.9.3	Primersequenzen für die RT-PCR	24
2.10	MMP1-Zymographie	25
2.10.1	Färbung und Dokumentation von Zymogrammen	26
2.10.2	Puffer und Lösungen für die Zymographie	26
2.11	<i>in vivo</i> -Studie	27
3	Ergebnisse	28

3.1	Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion in Keratinozyten	28
3.2	Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion in Fibroblasten	32
3.3	C ₂ -Ceramid als Mediator UVA-induzierter Signaltransduktion	37
3.4	Toxizität der eingestzten UV-Dosen	38
3.5	Einfluss von UVA und UVB auf die MMP1-Expression <i>in vitro</i>	41
3.6	Einfluss von UVA und UVB auf die MMP1-Expression <i>in vivo</i>	43
3.7	Durch UVA- und UVB-Strahlung induzierter Zellzyklusarrest	46
3.8	Regulation des durch UV-Strahlung induzierten Zellzyklusarrests durch Zyklin D1	47
3.9	Reparatur von durch UV-Strahlung induzierten DNS-Schäden	49
4	Diskussion	51
4.1	Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion	51
4.2	C ₂ -Ceramid als Mediator UVA-induzierter Signaltransduktion	53
4.3	MMP1 unterliegt der Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion	55
4.4	UVA- und UVB-induzierte Wechselwirkung auf Ebene der Zellzykluskontrolle	59
4.5	UVA- und UVB-induzierte DNS-Schäden als Ursache für den Zellzyklusarrest	61
4.6	Klinische Relevanz der Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion	62
4.6.1	Die Entwicklung der UV-Antwort als Reaktion auf UVA- und UVB-Exposition	62
4.6.2	UV-induzierte Kanzerogenese und Hautalterung	63
4.6.3	Konsequenzen für zukünftige Hautmodellsysteme	64
5	Zusammenfassung	66
6	Literatur	67
7	Abkürzungen	75

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Aufbau der menschlichen Haut	2
1.2	Das elektromagnetische Spektrum und seine Absorption durch die Erdatmosphäre	3
1.3	Prinzip der Signaltransduktion durch MAPKinasen	6
1.4	Durch UVB und ROS bedingte Modifikationen der Basen der DNS	8
1.5	Die Phasen des Zellzyklus	9
2.1	Emissionsspektrum UVA-Lampe	14
2.2	Emissionsspektrum UVB-Lampe	14
2.3	Beispiel eines PI-Histogramms	19
2.4	Der Comet Assay und das Tail Moment	22
3.1	UVA- und UVB-induzierte Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 in HNKs	30
3.2	Durch Kombinationsbestrahlungen mit UVA + UVB und UVB + UVA induzierte Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 in HNKs	31
3.3	Durch UVA, UVB und Kombinationsbestrahlungen mit UVA + UVB induzierte Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 in Fibroblasten	34
3.4	Refraktionszeit der UVB-induzierten Aktivierung von ERK1/2 nach vorausgehender Bestrahlung mit UVA	35
3.5	Aktivierung von ERK1/2 nach Bestrahlungssequenzen mit UVA und UVA sowie UVB und UVB	35
3.6	Durch UVA, UVB und Kombinationsbestrahlungen mit UVA + UVB induzierte Aktivierung von ERK1/2 24 h nach Bestrahlung	36
3.7	Wirkung von C ₂ -Ceramid auf UVB-induzierte Signaltransduktion auf Ebene der MAPKinasen	37
3.8	MMT-Assay als Viabilitätstest nach UV-Bestrahlung	39
3.9	Apoptose in Fibroblasten nach UV-Bestrahlung	40
3.10	MMP1-Expression <i>in vitro</i> nach UV-Bestrahlung	42
3.11	Nachweis von aktivem MMP1 durch Zymographie	43
3.12	MMP1-Expression <i>in vivo</i> nach UV-Bestrahlung	45
3.13	Proliferation von Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVA, UVB und UVA+B	47
3.14	Zyclin D1 in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVA, UVB und UVA+B	48
3.15	Reparaturkinetik von durch UV-Strahlung induzierten DNS-Schäden	50

Tabellenverzeichnis

2.1	Liste der für Western-Blots verwendeten Antikörper	17
2.2	Pipettierschema zur Herstellung cDNS-Synthesemix 1	24
2.3	Pipettierschema zur Herstellung cDNS-Synthesemix 2	24
2.4	PCR-Programm zur Synthese von cDNS	24
2.5	Pipettierschema für die RT-PCR	25
2.6	PCR-Programm für die RT-PCR	25
2.7	Coomassie Färbung nach Neuhoff	26

1 Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Die Haut ist mit einer Oberfläche von bis zu 2 m² und einer Masse von bis zu 3 kg eines der größten Organe des Menschen. Sie ist ein komplexes Organ, welches vielfältige Schutzfunktionen erfüllt. Durch die Hornschicht (*Stratum corneum*) der Haut wird der Austausch von Gas und Wasser mit der Umwelt unterbunden. Austrocknung und das Eindringen nicht körpereigener Substanzen wird dadurch verhindert. Man spricht in diesem Zusammenhang von der Barrierefunktion der Haut. Die Haut trägt wesentlich zur Fähigkeit des Körpers zur Thermoregulation bei. Das in die Unterhaut (Subcutis) eingelagerte Fett isoliert den Körper gegen Kälte, während die Schweißdrüsen der Lederhaut (Dermis) die aktive Kühlung des Körpers ermöglichen. Zum Schutz vor ultravioletter Strahlung (UV-Strahlung) kann die Haut den Grad ihrer Pigmentierung erhöhen. Dies geschieht in den Melanozyten, welche die UV-Strahlung absorbierende Pigment Melanin synthetisieren können (siehe auch Kapitel 1.3). Das saure (pH 5,5) und trockene Milieu der Hornschicht ist ein Schutz vor Mikroorganismen. Darüber hinaus verfügt die Haut auch über immunologische Schutzmechanismen. Nicht zuletzt stellt die Haut auch einen wirksamen Schutz vor mechanischen Belastungen verschiedener Art dar. Die starke Verzahnung von Epidermis und Dermis (siehe Abbildung 1.1) sorgt für Dehnungsreserven, während die stark vernetzten Proteinstrukturen der extrazellulären Matrix der Dermis, bestehend aus Kollagen und anderen Makromolekülen (siehe Kapitel 1.4.2), für die hohe Zugbelastbarkeit der Haut verantwortlich sind (nach Fritsch, 2004; Freedberg *et al.*, 2003).

Abbildung 1.1 zeigt den Aufbau der Haut und ihrer verschiedenen Schichten. 90 % der Zellen der Epidermis sind Keratinozyten (Fritsch, 2004). Die unterste Schicht der Epidermis ist das *Stratum basale*, eine Schicht von Stammzellen und Amplifikationszellen, welche permanent Keratinozyten hervorbringen und auf der Basallamina aufsitzen. In das *Stratum spinosum* eingebettet finden sich weitere Zelltypen der Epidermis, die Langerhans-Zellen und die Melanozyten. Die Keratinozyten migrieren vom Ort ihrer Entstehung, dem *Stratum basale*, durch *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum*. Währenddessen durchlaufen die Keratinozyten einen Differenzierungsprozess, der in die Entstehung von Korneozyten mündet. Die Korneozyten entstehen unter Abflachen der Form und dem Verlust von Wasser, Zellkern und Organellen. Sie sind im biologischen Sinne tot und bilden die äußerste Schicht der Epidermis, das *Stratum corneum*. Dermis und Epidermis haften beide an der Basallamina. Während die Keratinozyten des *Stratum basale* über Ankerfilamente mit der Basallamina verbunden sind, ist die extrazelluläre Matrix der Dermis über Ankerfibrillen mit der Basallamina verbunden. Die Dermis ist kein Gewebe in dem es einen dichten Zellverband gibt, vielmehr liegen hier vereinzelt Fibroblasten in einem Netz aus miteinander verknüpften Kollagenfaserbündeln vor. Diese Kollagenfasern und die Fibroblasten liegen eingebettet in ein Gemisch aus Glykosamin-

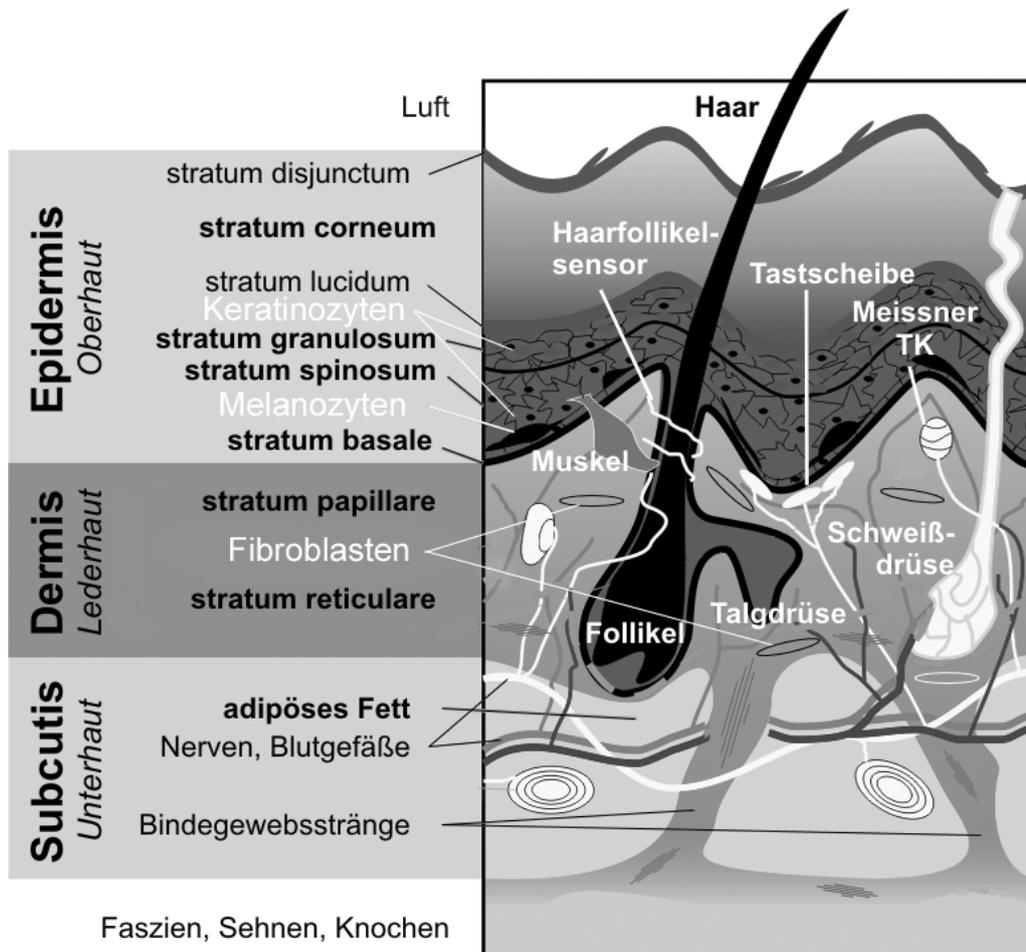


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau der menschlichen Haut. Die drei Hauptschichten der Haut, Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Dermis) und Unterhaut (Subcutis) sind mit ihren jeweiligen Unterstrukturen dargestellt. Abbildung verändert nach medOCT (medOCT group, 2006).

glykanen und Proteoglykanen (Fritsch, 2004). Die Gesamtheit des Volumens der Dermis, welches nicht innerhalb einer Zelle ist, stellt die extrazelluläre Matrix dar (siehe auch Kapitel 1.4.2). Ferner sind in die Dermis eingebettet: Blutgefäße, Nerven, Schweißdrüsen und Haarwurzeln. Fettzellen finden sich erst unterhalb der Dermis, in der Subcutis.

1.2 Ultraviolette Strahlung

Die von der Sonne emittierte elektromagnetische Strahlung umfasst ein breites Spektrum in einem Wellenlängenbereich von über neun Zehnerpotenzen. Die meiste Energie gelangt in Form der sogenannten optischen Strahlung auf die Erdoberfläche. Die optische Strahlung umfasst die UV-Strahlung (100 - 400 nm), das sichtbare Licht (400 - 700 nm) und die infrarote Strahlung (IR-Strahlung) (700 nm - 1 mm). Durch die Erdatmosphäre wird das

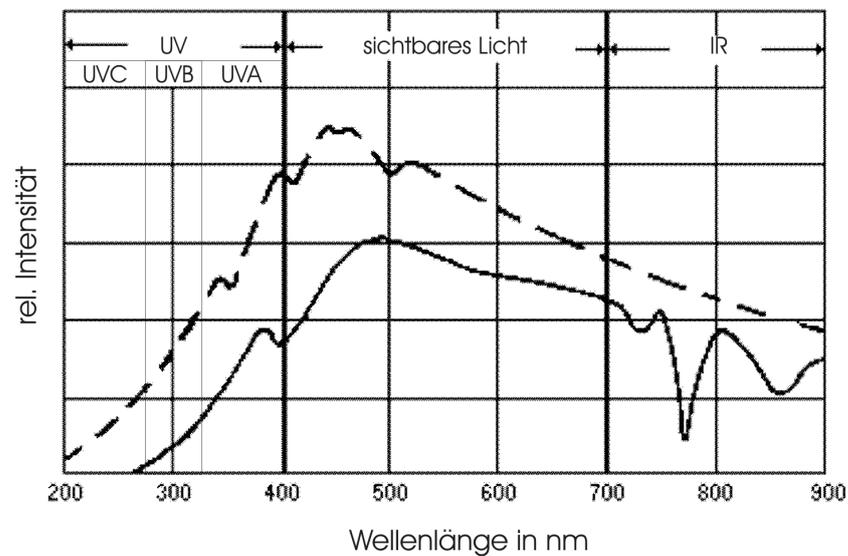


Abbildung 1.2: Das elektromagnetische Spektrum und seine Absorption durch die Erdatmosphäre. Dargestellt sind hier die UV-, die sichtbaren und die IR-Komponenten des elektromagnetischen Spektrums vor (gestrichelt) und nach Filterung (durchgezogen) durch die Atmosphäre der Erde. Der IR-Bereich des Spektrums ist hier nur bis 900 nm dargestellt. Abbildung verändert nach World Health Organization (WHO, 1994).

von der Sonne emittierte optische Spektrum gefiltert und erreicht daher die Erdoberfläche nur teilweise (siehe Abbildung 1.2).

Die UV-Strahlung wird in drei Wellenlängenbereiche unterteilt, UVC (100 - 280 nm), UVB (280 - 320 nm) und UVA (320 - 400 nm). Diese Einteilung anhand der Wellenlängen hat überwiegend historische Gründe und keine physikalische oder biologische Bedeutung. UVC wird durch die Erdatmosphäre nahezu vollständig absorbiert und spielt daher allenfalls in extremen Höhen eine für biologische Systeme relevante Rolle (Henderson, 1977).

UVA und UVB gelangen jedoch in biologisch wirksamen Dosen auf die Erdoberfläche. Je nach Hauttyp, Pigmentierung und genetischem Hintergrund kann eine bestimmte Dosis UV-Strahlung bei verschiedenen Individuen unterschiedliche Wirkungen haben. Daher wurde die Einheit der MED (minimale erythemale Dosis) eingeführt. Sie ist definiert als die Dosis UV-Strahlung die bei einem Individuum ein gerade erkennbares Erythem hervorruft. Ausgeprägte Stadien dieses Phänomens gehen mit der Bildung von Lichtschwielen und dem apoptotischen Tod von Hautzellen einher. Man spricht dann von *Dermatitis solaris*, bzw. Sonnenbrand. Problematisch an der MED ist, dass sie nichts über den Anteil UVA-Strahlung dieser Dosis aussagt, denn nur UVB löst die Bildung eines Erythems aus. Für sensitive Hauttypen entspricht eine MED einer Energie von ca. 200 J/m^2 UVB (Driscoll, 1992). In einer MED natürlichen Sonnenlichts ist gleichzeitig ein vielfaches dieser Dosis an UVA enthalten (siehe Abbildung 1.2). UVA-Strahlung wird vom *Stratum corneum* zu 50 % absorbiert, die stark proliferierenden Zellen des *Stratum basale* erreichen noch 19 % der Energie, aber auch die Zellen der Dermis können noch bis in eine Tiefe von über $200 \mu\text{m}$ erreicht werden (Bruls *et al.*, 1984a). Die Subcutis wird nur noch von etwa 1 % der UVA-Energie erreicht (Parrish *et al.*, 1982). Das kürzerwelligere UVB wird stärker

absorbiert, lediglich 33 % der Energie passieren das *Stratum corneum*. Die Eindringtiefe ist jedoch ausreichend, um je nach Dicke der Epidermis die Zellen der Dermis zu erreichen (Bruls *et al.*, 1984a). Diese Eindringtiefen sind stark abhängig von der Pigmentierung und der Dicke der Epidermis, die individuell und je nach Körperregion variieren (Bruls *et al.*, 1984b).

In den letzten 25 Jahren hat die Bedeutung von künstlichen UV-Strahlungsquellen, wie z.B. Sonnenbänken, als Risikofaktor für die Gesundheit der Haut stark zugenommen. Sonnenstudios ermöglichen es in kurzer Zeit, eine, verglichen mit dem natürlichen Sonnenlicht, hohe Dosis UV-Strahlung zu applizieren. Der aus kosmetischen Gründen gewünschte Bräunungseffekt stellt sich zwar in der Regel rasch ein, es ist aber mittlerweile allgemein anerkannt, dass eine Korrelation zwischen der Sonnenbanknutzung und dem Hautkrebsrisiko besteht (Gallagher *et al.* (2005); zur Übersicht: Autier (2005)).

Sowohl UVA als auch UVB können das Erbgut der menschlichen Hautzellen schädigen (siehe Kapitel 1.4.3). Während UVB direkt mit der DNS der Hautzellen wechselwirkt und dadurch verschiedene DNS-Schäden verursacht, wirkt UVA durch die Generierung von oxidativem Stress indirekt auf die DNS (Ravanat *et al.*, 2001). Diese DNS-Schäden können verschiedene Krankheitsbilder induzieren, welche in Kapitel 1.3 näher beschrieben sind. Aber auch die durch UV-Strahlung ausgelösten Signaltransduktionsprozesse können zu hautschädigenden Prozessen führen (siehe Kapitel 1.4.1).

1.3 Klinische Wirkung von UV-Strahlung auf die Haut

Es gilt seit langem als bewiesen, dass UV-Strahlung ein Faktor ist, der maßgeblich an der Entstehung von Hautkrebs beteiligt ist (Lancaster & Nelson (1957), zur Übersicht: Krutmann (2001)). Die lichtinduzierte vorzeitige Hautalterung, auch als Photoaging bezeichnet, ist ebenfalls ein Krankheitsbild der Haut, welches auf dauerhafte und hohe UV-Exposition zurückzuführen ist (Gilcrest & Krutmann, 2006). Die suppressive Wirkung von UV-Strahlung auf das Immunsystem der Haut (Photoimmunosuppression) mit negativen Folgen sowohl für die Kanzerogenese als auch für Infektionskrankheiten sind ebenfalls allgemein akzeptiert (Krutmann & Elmetts, 1995).

In den letzten 30 Jahren ist die Hautkrebsinzidenz in der Bundesrepublik Deutschland stark gestiegen. So hat sich die Zahl der jährlichen Hautkrebsneuerkrankungen seit 1970 etwa vervierfacht. Pro Jahr erkranken über 100.000 Menschen in der Bundesrepublik an Hautkrebs (Daten des saarländischen Krebsregisters (SLS, 1995)). Dieser Anstieg wird allgemein auf das geänderte Freizeitverhalten der Bevölkerung in den Industrienationen zurückgeführt. Eine Rolle des Abbaus der Ozonschicht wird ebenfalls diskutiert, denn eine Reduktion der Ozonschicht um 1 % führt zu einer Erhöhung der Belastung durch UVB um ca. 2 % und so zu einer signifikanten Erhöhung des Hautkrebsrisikos in den betroffenen Regionen (van der Leun & de Gruijl, 2002).

Unter dem Oberbegriff Hautkrebs werden mehrere Arten von Tumoren zusammengefasst. Die häufigsten Typen sind das Basalzellkarzinom (Basaliom) und das Stachelzellkarzinom (Plattenepithelkarzinom). Diese Krebsarten sind wenig invasiv und bei rechtzeitiger Diagnose meist gut behandelbar. Das maligne Melanom macht lediglich etwa 3 % der Hautkrebserkrankungen aus, verursacht aber eine hohe Sterblichkeitsrate, weil es früh und aggressiv zu Metastasieren beginnt (RKI, 2004). Die molekularen Mechanismen der

UV-induzierten Krebsentstehung sind bislang nicht vollständig verstanden, doch verschiedene beteiligte Mechanismen sind bekannt und unter Kapitel 1.4 beschrieben.

Photoaging äußert sich durch eine Störung der Barrierefunktion der Haut, Pigmentierungsänderungen, ein Nachlassen der Heutelastizität und eine gesteigerte Faltenbildung. Diese Symptome werden unter anderem durch die UV-induzierte Degradation des Kollagens der extrazellulären Matrix der Dermis hervorgerufen (Krutmann, 2003). Das Phänomen des Photoagings mag angesichts von Hautkrebs als eher kosmetisches und nachrangiges Problem erscheinen, es zeigte sich jedoch, dass die degradierte extrazelluläre Matrix der Dermis das Wachstum von invasiven Tumoren stark begünstigt (Brenneisen *et al.*, 2002). Die molekularen Mechanismen dieser Prozesse sind in Kapitel 1.4.2 beschrieben. Zudem gewinnt die vorzeitige Hautalterung vor dem Hintergrund der aktuellen demographischen Entwicklung eine zunehmende gesundheitspolitische Bedeutung.

1.4 Molekulare Grundlagen der Wirkung von UV-Strahlung auf die Haut

1.4.1 Durch UV-Strahlung ausgelöste Signaltransduktionsprozesse

Bei der UV-induzierten Kanzerogenese und Hautalterung ist die Kenntnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und Signaltransduktionsprozesse von großer Bedeutung, daher steht die durch UVA- und UVB-induzierte Aktivierung der MAPKinasen (Mitogen-Activated Protein Kinases) im Mittelpunkt vielfältiger Forschungen. Die MAPKinasen sind eine Familie von Proteinkinasen, welche in der Signaltransduktion eukaryotischer Zellen eine zentrale Rolle übernehmen. Ihre Aufgabe ist es, ein durch eine extrazelluläre Noxe ausgelöstes Signal durch Phosphorylierung weiterer Proteine vom betreffenden Rezeptor zu den Transkriptionsfaktoren weiter zu leiten (zur Übersicht: Seger & Krebs (1995)). Dabei sind die MAPKinasen meist zu sogenannten MAPKinasekaskaden hintereinandergeschaltet (siehe Abbildung 1.3). Ausgangspunkt ist meist eine rezeptorabhängige GTPase (z.B. Ras), welche sogenannte MAPKKKs (MAPKinasekinasekinasen) (z.B. Raf) aktiviert. Diese aktivieren dann wiederum MAPKKs (MAPKinasekinasen) (z.B. MEK1). Die durch MAPKKs aktivierten MAPKs können verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche dann wiederum im Zellkern genregulatorische Funktionen ausführen. Drei zentrale MAPKs sind ERK1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 + 2), p38 und JNK1/2/3 (c-Jun NH₂-terminal Kinases 1, 2 + 3). Alle drei werden aktiviert durch Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin ihres Threonin-X-Tyrosin-Motivs im sogenannten Aktivierungs-Loop. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass diese drei MAPKinasen maßgeblich an der UV-induzierten Signaltransduktion beteiligt sind (zur Übersicht: Bode & Dong (2003)).

ERK1/2, die JNKs und p38 sind an der Regulation von zentralen Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Proproliferative Signale, wie z.B. die Bindung von EGF (epidermal growth factor) an den EGFR (epidermal growth factor rezeptor), resultieren in der Aktivierung von ERK1/2 (Seger & Krebs, 1995). ERK1/2 wird auch als eine Stresskinase bezeichnet und reagiert auf Stress wie z.B. gesteigerte Mengen von ROS (reactive oxygen species) oder Hitzeschock (Minden *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte ROS-Mengen eine direkte Folge von UVA-Strahlung

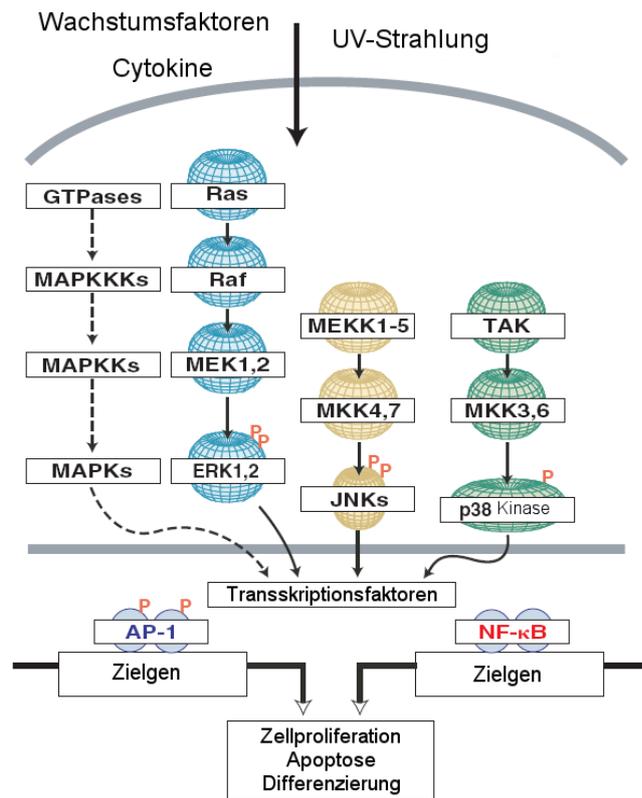


Abbildung 1.3: Prinzip der Signaltransduktion durch MAPKinasen. Extrazelluläre Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Cytokine oder auch UV-Strahlung können die drei wichtigsten MAPKinasen in der Familie der MAPKinasen, ERK1/2, JNK1/2/3 und p38, aktivieren. Diese können dann zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, z.B. AP-1 oder NF- κ B, führen. Konsequenz ist die Regulation von die Zellproliferation, die Apoptose oder die Differenzierung betreffenden Genen. Abbildung verändert nach Bode & Dong (2003).

sein können und so zur Aktivierung von MAPKinasen, unter anderem ERK1/2, führen (Grether-Beck *et al.*, 1997). Wie UVA-Strahlung die MAPKinasewege aktiviert ist nicht genau bekannt. Fest steht, dass durch UVA-induzierte ROS-Bildung möglich ist. Diskutiert wird eine Rolle für den EGFR dessen Aktivierung als Folge von UVA-Bestrahlung gezeigt wurde (Zhang *et al.*, 2001). Das Beispiel der Aktivierbarkeit von ERK1/2 zeigt, dass scheinbar widersprüchliche Prozesse wie Proliferation und Stress von der gleichen MAPKinase induziert werden können. Die Spezifität der Signaltransduktion für einen bestimmten Reiz kommt erst durch die Kombination mit anderen MAPKinasen zu Stande.

Höhere Dosen UV-Strahlung können Apoptose induzieren. Zentrale Bedeutung bei der Regulation der UV-induzierten Apoptose hat das Tumorsuppressorprotein p53, es kann bei Aktivierung, Zellzyklusarrest und DNS-Reparatur oder aber Apoptose induzieren (zur Übersicht: Latonen & Laiho (2005)). Es konnten bereits verschiedene Arten der Aktivierung von p53 gezeigt werden, z.B. ist p53 an Serin 15 durch ERK1/2 und p38 phosphorylierbar (She *et al.*, 2000). Ebenfalls beobachtet wurde die Aktivierung über JNK1/2 an Serin 20 als Folge von UVB-Bestrahlung (She *et al.*, 2002).

MAPKinasen können von Phosphatasen durch Dephosphorylierung deaktiviert werden (Ellinger-Ziegelbauer *et al.* (1997), zur Übersicht: Neel & Tonks (1997)). Durch diesen Mechanismus wird die Phosphorylierung der MAPKinasen reversibel und ermöglicht so die Regulation von Signaltransduktionsprozessen in einem Zeitraum von wenigen Minuten.

Es gibt zwei Transkriptionsfaktorkomplexe, die häufig an der Übertragung von UV-induzierten Signalen beteiligt sind: AP-1 (Activating Protein 1) und NF- κ B (Nuclear Factor κ B). ERK1/2, JNK1/2/3 und p38 sind maßgeblich an ihrer Entstehung beteiligt (Angel (1995), Liebenlist *et al.* (1995)). AP-1 ist nach Moon und Chung notwendig für die UV-induzierte Expression von MMP1 (Matrixmetalloproteinase 1) (Moon & Chung, 2006) und damit ein wichtiger Faktor für die UV-induzierte Degradation der extrazellulären Matrix der Dermis (siehe Kapitel 1.4.2).

1.4.2 MMPs und die extrazelluläre Matrix der Dermis

Die MMPs (Matrixmetalloproteinasen) gehören zu einer Familie von zinkabhängigen Metalloendopeptidasen. Momentan unterscheidet man über 20 verschiedene MMPs. Besondere Bedeutung kommt den MMPs beim Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix der Dermis zu. Von den Fibroblasten der Dermis werden vor allem die MMPs 1, 2, 3, 13 und 14 produziert. Sie besitzen unterschiedliche Substratspezifitäten und werden in den extrazellulären Raum sekretiert. Dort kann dann z.B. der Abbau von bereits denaturiertem Kollagen durch MMP13 erfolgen (zur Übersicht: Hijova (2005)). Die Sekretion von Peptidasen, die die extrazelluläre Matrix abbauen können, erfordert eine strikte Kontrolle. Diese erfolgt durch sogenannte TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases). TIMPs vermögen MMPs durch Bindung zu inaktivieren. Die TIMPs sind, wie die MMPs, eine eigene Proteinfamilie und besitzen unterschiedliche Bindespezifitäten für die verschiedenen MMPs (zur Übersicht: Lambert *et al.* (2004)).

MMP1 (auch: interstitielle Kollagenase) kommt eine besondere Rolle sowohl in der UV-induzierten Hautalterung als auch in der Tumorentwicklung zu. Die Substrate der MMP1 sind die fibrillären Kollagene (Kollagen vom Typ I, II, III, V und XI), d.h. durch MMP1 werden Kollagene und somit die Bindegewebestrukturen abgebaut. Konsequenz dieses Kollagenabbaues aufgrund von erhöhter MMP1-Expression ist beim Photoaging die erhöhte Faltenbildung (Gilchrest & Krutmann, 2006), und bei der Tumorentwicklung ein erleichtertes Metastasieren, sowie ein beschleunigtes invasives Wachstum durch eine Aufweichung des den Tumor umgebenden Gewebes (Lemaitre & D'Armiento, 2006).

Erhöhte MMP1-Expression kann durch unterschiedliche Umweltnoxen in der Haut hervorgerufen werden. So kann UVA-Strahlung in humanen Fibroblasten die Expression von MMP1 erhöhen (Wlaschek *et al.*, 1994). Möglicherweise geschieht dies durch ROS (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1993). Aber auch UVB vermag die Induktion der MMP1-Expression auszulösen. Girolamo *et al.* konnten diesen Mechanismus in der Hornhaut des menschlichen Auges nachweisen (Girolamo *et al.*, 2005).

1.4.3 UV-induzierte DNS-Schäden und die Regulation des Zellzyklus

UV-induzierte Mutationen in Genen, welche Proliferation und Apoptose kontrollieren, sind Initiatoren von Hautkrebs. So weisen z.B. Zelllinien aus malignen Melanomen außer-

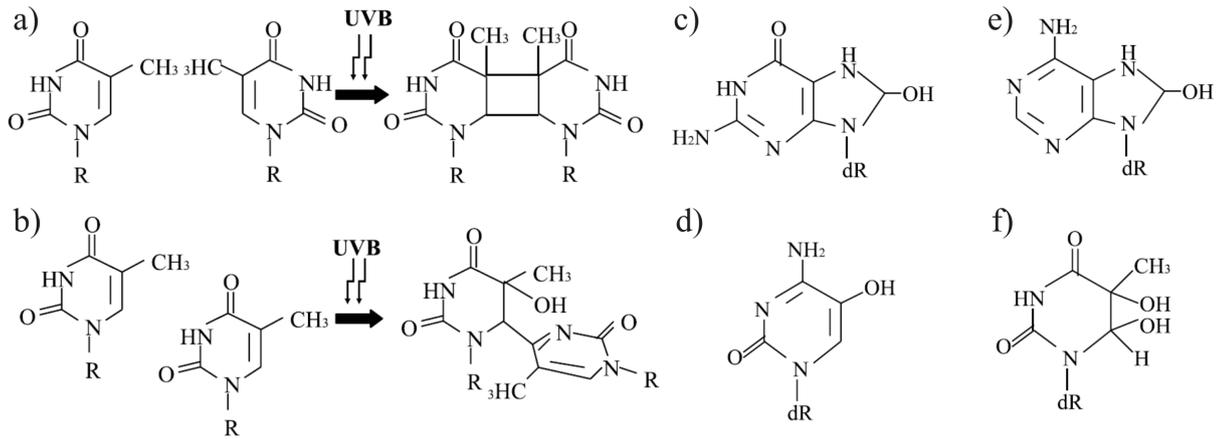


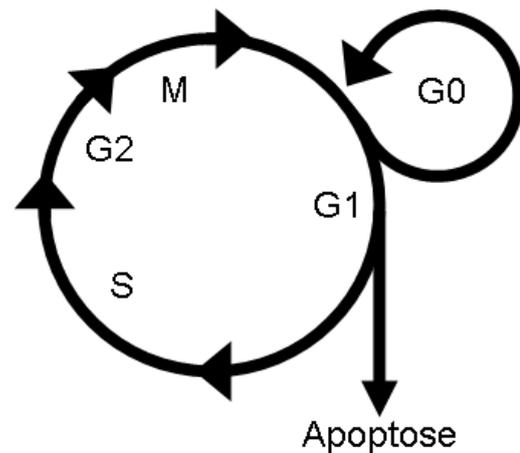
Abbildung 1.4: Durch UVB und ROS bedingte Modifikationen der Basen der DNS.
 a) + b) UVB vermag benachbarte Pyrimidinbasen kovalent zu verknüpfen. c) - f) durch UVA induzierte ROS können ebenfalls Modifikationen der Basen der DNS hervorrufen (Ichihashi *et al.*, 2003). a) UVB-induziertes Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) aus benachbarten Pyrimidinen desselben DNS Stranges. b) UVB-induziertes (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukt ((6-4)-PP). c) 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG). d) 8-Hydroxydeoxycytosin (8-OHdC). e) 8-Hydroxydeoxyadenosin (8-OHdA). f) Thyminglycol.

gewöhnlich häufig Basenaustausche wie CC → TT oder TC → TT im Tumorsupressorgen p53 auf (Daya-Grosjean *et al.*, 1995).

UV-Strahlung vermag verschiedene Modifikationen der DNS zu induzieren, die häufigsten sind in Abbildung 1.4 zusammengefasst. Solche kovalenten Veränderungen der Basen können bei der Replikation zu Fehlinterpretationen führen und so Mutationen verursachen (zur Übersicht: Ravanat *et al.* (2001)). Ein zu 8-Hydroxydeoxyguanosin (8-OHdG) (siehe Abbildung 1.4 c)) oxidiertes Guanosen führt z.B. zu G → T und A → C Transversionen (Cheng *et al.*, 1992). Die DNS ist kein Chromophor für UVA, es gibt hier also keine direkte Wechselwirkung (Rosenstein & Mitchell, 1987), UVB hingegen wird direkt von der DNS absorbiert und kann zu kovalenten Veränderungen führen (siehe Abbildung 1.4 a) und b)). Die mutagene Wirkung von UVA auf die DNS ist indirekt. UVA induziert ROS in den Zellen der Haut, welche dann zu oxidativen Veränderungen von Basen führen können (siehe Abbildung 1.4 c), d), e) und f)). Die Entstehung von 8-OHdG ist keine spezifische Wirkung von UVA, sondern kann auch durch Oxidanzien wie Peroxynitrit, OH-Radikale oder Singuletsauerstoff erzeugt werden (Kasai & Nishimura, 1984). Weitere, durch UV-Strahlung bedingte DNS-Schäden sind Protein-DNS Addukte, sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche.

Es existieren in der Zelle verschiedene Mechanismen, um UV-induzierte Mutationen zu erkennen und zu reparieren. Der Mechanismus zur Reparatur von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPDs) und (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukten ((6-4)-PPs) wird als Nucleotide Excision Repair (NER) bezeichnet. Die NER ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, an dem mindestens 30 verschiedene Genprodukte beteiligt sind (Aboussekhra *et al.*, 1995). Der Vorgang erfordert die Neusynthese eines Strangabschnittes von 24 bis 32 Basen. Die Notwendigkeit der NER wird in einem beim Menschen vorkommenden Syn-

Abbildung 1.5: Die Phasen des Zellzyklus. Die Phasen des Zellzyklus sind hier in einem vereinfachten Schema dargestellt. G1-Phase (Gap1-Phase): Wachstum der Zelle. S-Phase (Synthese-Phase): Replikation des Genoms. G2-Phase (Gap2-Phase): Vorbereitung der Mitose. M-Phase (Mitose-Phase): Ablauf der Mitose. G0-Phase (Gap0-Phase): Ruhephase. Erst der apoptotische Tod der Zelle beendet den Replikationskreislauf.



drom, der Xeroderma pigmentosum (XP), deutlich. XP bezeichnet eine erblich bedingte Krankheit, bei der die Zellmaschinerie von betroffenen Patienten nicht mehr in der Lage ist eine fehlerfreie NER durchzuführen. Verursacht wird die mangelnde Reparaturfähigkeit hierbei durch Mutationen, wodurch Faktoren, die zur Erkennung des DNS-Schadens oder der DNS-Reparatur erforderlich sind, nicht mehr funktionsfähig sind (zur Übersicht: Berneburg & Krutmann (2003)). Die Betroffenen bilden bei geringen UV-Expositionen, bereits im frühen Alter multiple Hauttumore aus.

Zur Reparatur von Basenaustauschen, die z.B. durch 8-OHdG verursacht werden, existiert ein Mechanismus, der als Base Excision Repair (BER) bezeichnet wird. Dieser Prozess ist weniger aufwendig als die NER. Es wird hierbei unter Einsatz einer Glycosylase, des Replication Protein A (RPA), des Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) und einer Endonuclease eine einzelne Base ohne Neusynthese ganzer Regionen ausgetauscht (zur Übersicht: Wood (1996)).

Die Teilung von Zellen, deren Genom nicht mehr fehlerfrei ist, zu verhindern ist der grundlegende Mechanismus zur Vermeidung der Krebsentstehung und der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. Eine zentrale Rolle spielt hierbei die Regulation des Zellzyklus, welche über verschiedene Signaltransduktionswege an die DNS-Reparatur gekoppelt ist (zur Übersicht: Samuel *et al.* (2002)). Der Zellzyklus und seine Phasen sind schematisch in Abbildung 1.5 dargestellt. Die Progression der eukaryotischen Zelle durch den Zellzyklus wird durch Zykline reguliert. Das Vorliegen eines bestimmten Zyklin ist dabei charakteristisch für eine bestimmte Zellzyklusphase. Zyklin-E ist z.B. erforderlich für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase, während hohe Konzentrationen von Zyklin-D charakteristisch für die G1-Phase sind (zur Übersicht: (Bell & Dutta, 2002)). Funktionell aktiv sind die Zykline allerdings erst im Komplex mit den Zyklin abhängigen Kinasen (CDKs). Diese Kinasen erlangen ihre Aktivität durch Bindung an die Zykline und können dann durch Phosphorylierung weitere Faktoren beeinflussen (Aleem *et al.* (2005); zur Übersicht: Obaya & Sedivy (2002)).

Die Verknüpfung von DNS-Reparatur und Zellzyklusregulation ermöglicht es, den Zellzyklus an verschiedenen Positionen zu stoppen und erst nach erfolgter Reparatur der DNS wieder fortzusetzen. Wichtige Faktoren bei den hieran beteiligten Signaltransdukti-

onsprozessen sind die beiden zur Familie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen (PI3Ks) gehörenden Proteine Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) und ATM-Rad3-related (ATR). ATM wird in Folge von Doppelstrangbrüchen aktiviert und kann über p53 und p21, einem CDK-Inhibitor, auf mehrere Kontrollpunkte des Zellzyklus wirken (Canman *et al.*, 1998). Möglich ist z.B. die Induktion eines Zellzyklusarrests am Ende der G1-Phase aber auch ein Arrest während der S-Phase (Samuel *et al.*, 2002). ATR ist neben verschiedenen weiteren Molekülen an der Erkennung von Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüchen beteiligt (Abraham, 2001). Primäres Ziel der ATM-Komplexe ist CHK1, welches als Regulator von CDK25, z.B. an der Induktion eines G2/M-Arrests beteiligt ist (Li & Zou, 2005). Bei der Zellzykluskontrolle kommt p53 eine zentrale Rolle zu, da es sowohl an der Induktion der Apoptose (Latonen & Laiho, 2005) als auch an der Einleitung eines Zellzyklusarrests maßgeblich beteiligt ist (Samuel *et al.*, 2001). Der Mechanismus, nach dem zwischen diesen beiden Wegen entschieden wird, ist bislang weitgehend unklar.

1.5 Fragestellung

Durch UVB-Strahlung induzierte Signaltransduktionsprozesse in der menschlichen Haut sind beits ausführlich untersucht worden. Das gilt in zunehmenden Maße auch für durch UVA-Strahlung induzierte Prozesse. Diese Studien konzentrierten sich meist auf Signalkaskaden, welche die Regulation der Apoptose, die Kontrolle des Zellzyklus und der Genexpression zum Endpunkt haben. Die menschliche Haut ist aber, wenn sie dem natürlichen Sonnenlicht ausgesetzt ist, sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung ausgesetzt. Ob es eine Wechselwirkung zwischen diesen bislang nur unabhängig von einander untersuchten Prozessen gibt, ist bislang nicht untersucht. Diese Arbeit beschäftigte sich daher mit der Frage, ob es Wechselwirkungen zwischen UVA- und UVB-induzierten Signaltransduktionsprozessen gibt. Dabei konzentrierte sich diese Arbeit initial auf die Aktivierung der drei MAPKs ERK1/2, JNK1/2 und p38, von denen bekannt ist, dass sie sowohl durch UVA- als auch durch UVB-Strahlung aktivierbar sind (Bode & Dong, 2003).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eventuelle Wechselwirkungen zwischen diesen Signaltransduktionsprozessen auch zu Änderungen der durch UVA- oder UVB-Strahlung induzierten Genexpression führen können. Im Mittelpunkt des Interesses stand dabei die Regulation der Expression der MMPs, weil die Induzierbarkeit von MMPs durch UVA- oder UVB-Strahlung bereits bekannt ist (Wlaschek *et al.* (1994); Girolamo *et al.* (2005)) und diese Proteasefamilie eine große Relevanz für die lichtinduzierte Hautalterung (Gilchrest & Krutmann, 2006) sowie die Progression von Hauttumoren besitzt (Brinckerhoff *et al.*, 2000).

Als Modellsystem für diese Untersuchungen dienen humane primäre epidermale Keratinozyten und dermale Fibroblasten verschiedener Spender. Diese Zellen sind die häufigsten Zelletypen der menschlichen Haut und sind sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung exponiert.

2 Material und Methoden

Sämtliche verwendeten Chemikalien entsprechen, sofern nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad „pro Analyti“. Für alle Lösungen wurde mit einer hauseigenen Anlage hergestelltes deionisiertes Wasser verwendet. Die Entsalzungsanlage der Firma Millipore liefert Wasser mit einer Leitfähigkeit von ca. $0,1 \mu\text{S}$. Im Folgenden wird dieses Wasser als $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ bezeichnet.

2.1 Zellkultur primärer humaner Hautzellen

Das Ausgangsmaterial für die Präparation von primären Hautzellen sind Vorhäute von 5- bis 15-Jährigen, die bei Zirkumzision anfallen. Diese Vorhäute wurden nach der Operation in Medium für die Keratinozytenkultur bei 4°C gelagert. Die Präparation der Zellen erfolgte maximal 2 Tage nach Entnahme der Vorhaut.

Alle Zellkulturarbeiten und die Präparation von primären Zellen wurden unter Sterilwerkbänken durchgeführt. Die Kultivierung aller Zelltypen erfolgte in Inkubatoren von Typ HeraCell der Firma Heraeus bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$. Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturflaschen und -Schalen (unbeschichtet) stammten von der Firma Greiner-bio-one und wurden je nach Versuch in unterschiedlichen Größen eingesetzt. Experimente mit primären Fibroblasten wurden bis zur Passage 20 durchgeführt, bei BJ Fibroblasten bis Passage 40. Keratinozytenkulturen wurden nur bis Passage 3 für Experimente eingesetzt. Zentrifugationen zum Pelletieren von Zellsuspensionen erfolgten sofern nicht anders angegeben bei RT und einem rcf von 1200 (Heraeus Megafuge 3.0R mit Schwenkrotor) in sterilen Einweggefäßen.

Um primäre Zellen über lange Zeiträume zu lagern wurden Aliquots früherer Passagen hergestellt. Dafür wurden die Zellen einer konfluenten Zellkulturflasche mit 175cm^2 Grundfläche nach dem Ablösen mit Trypsin und Waschen mit PBS in $4,5 \text{ml}$ Einfriemedium resuspendiert und zunächst für 24 h in einer Kryobox mit Isopropanolfüllung bei -80°C gelagert. Nach diesem langsamen Einfrierprozess erfolgt die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff. Auf diese Weise gelagerte Aliquots (je $1,5 \text{ml}$ in geeignetem Gefäß, z.B. Cryo-Tube, Nunc) können über mehrere Jahre gelagert und mit ca. 35ml Medium wieder in eine Kulturflasche von 175cm^2 Grundfläche gesät werden.

2.1.1 Präparation primärer humaner dermaler Fibroblasten

Um das Risiko von Kontaminationen zu verringern werden zu präparierende Vorhäute zunächst für 2 min vollständig mit Gentamycin-PBS bedeckt. Die Präparation primärer humaner dermaler Fibroblasten beginnt mit der Entfernung des Unterhautfettgewebes der Vorhaut. Der verbleibende Rest wird in Stücke von ca. $2 \times 2 \text{mm}$ geschnitten. Etwa 10 bis 15 solcher Stücke werden mit der Seite der Dermis nach unten in eine 100mm Kulturschale

2 Material und Methoden

gelegt. Ohne Schalendeckel trocknen die Ränder der Hautstücke nach 10 bis 15 min am Boden der Schale fest, so dass sie beim Bedecken mit 15 ml Medium nicht aufschwimmen. Nach 2 bis 4 Tagen beginnen Fibroblasten an den Rändern der Dermis auszuwachsen. Die Hautstücke können nun entfernt werden und die verbleibenden Fibroblasten weiter kultiviert werden.

2.1.2 Präparation primärer humaner epidermaler Keratinozyten

Nach einem 2 min Bad in Gentamycin-PBS wird die Vorhaut in Stücke von etwa 5 x 5 mm geschnitten. Diese Stücke werden für 16 bis 20 h in 10 ml Dispase-PBS bei 4 °C inkubiert. Die Epidermis lässt sich nach der Verdauung der Basallamina durch die Dispase leicht mit einer Präpariernadel ablösen. Die Epidermisstücke werden in 7 ml Trypsinlösung für 30 min inkubiert. Während dieser 30 min wird mehrfach kräftig geschüttelt um den Zellverband der Epidermis aufzulösen. Die Suspension wird mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und zur Entfernung des Trypsins durch Zentrifugation pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in 5 ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Je nach Anzahl der auf diese Weise präparierten Zellen kann das Homogenat mit dem entsprechenden Volumen Medium in Kulturflaschen von 25 bis 175 cm² Grundfläche gesät werden.

2.1.3 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Als Medium für die Kultur von primären humanen dermalen Fibroblasten wurde verwendet:

- EARLE'S MEM (1x), PAA Laboratories GmbH
- 10 % FCS (Foetal Bovine Serum), GIBCO - Invitrogen GmbH
- 1 % L-Glutamine 200 mM (100x), GIBCO - Invitrogen GmbH
- 1 % Antibiotic-Antimycotic, Penicillin G 10000 units/ml, Streptomycin 10000 µg/ml, Amphotericin B 25 µg/ml, GIBCO - Invitrogen GmbH

Für die Kultur von Fibroblasten unter wachstumsfaktorfreien Bedingungen wurde das Medium ohne den Zusatz von 10 % FCS eingesetzt.

Als Medium für die Kultur von primären humanen epidermalen Keratinozyten wurde verwendet:

- 1/1 Mischung aus Keratinocyte-SFM, GIBCO - Invitrogen GmbH und basal MCDB 153 Medium (1x), Biochrom AG
- 37,5 mg/l BPE, GIBCO - Invitrogen GmbH
- 5 µg/l EGF, Biochrom AG
- 2,5 mg/l Insulin, Biochrom AG
- 0,25 mg/l Hydrocortison, Biochrom AG
- 0,1 mM Ethanolamin, Biochrom AG
- 0,1 mM Phosphoethanolamin, Biochrom AG
- 1 % L-Glutamine 200 mM (100x), GIBCO - Invitrogen GmbH

- 1 % Antibiotic-Antimycotic, Penicillin G 10000 units/ml, Streptomycin 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Amphotericin B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, GIBCO - Invitrogen GmbH

Für die Kultur von Keratinozyten unter wachstumsfaktorfreien Bedingungen wurde das Medium ohne den Zusatz von BPE, EGF, Insulin, Hydrocortison, Ethanolamin und Phosphoethanolamin eingesetzt.

Die Einfriermedien zur Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff enthalten 50 % des jeweiligen Mediums, 25 % FCS und 25 % Glycerin.

Weitere Lösungen und Reagenzien:

- PBS-Puffer, D-PBS frei von CaCl_2 und MgCl_2 , GIBCO - Invitrogen GmbH
- Trypsin-EDTA (1x) in HBSS, GIBCO - Invitrogen GmbH
- Dispase-PBS, 0,2 mg/ml Dispase, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin, in PBS
- Gentamycin-PBS, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin in PBS

2.2 Strahlungsquellen und Bestrahlung von Zellkulturen

Als UVA-Strahlungsquelle wurde eine Ganzkörperbestrahlungsliege aus der Phototherapie eingesetzt. Das verwendete Modell vom Typ Sellamed ist nach dem System Dr. Sellmeier aufgebaut und verfügt über 12 einzelne UVA-Hochdruckstrahler. Das Emissionsspektrum dieser Lampe ist in Abb. 2.1 dargestellt.

Vier Leuchtstoffröhren vom Typ TL20W/12RS der Philips GmbH dienten als UVB-Quelle. Das Emissionsspektrum dieser Lampe ist in Abb. 2.2 gezeigt.

Alle Bestrahlungen von Zellen wurden nicht in Medium sondern in PBS durchgeführt. Dies ist erforderlich, da die Bestrahlung im Zellkulturmedium zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, welche die durch die Bestrahlung ausgelösten Signaltransduktionsprozesse beeinflussen können (Mahns *et al.*, 2003). Zu Beginn einer UVA-Bestrahlung sind alle Zellen mit dem für die eingesetzte Kulturschale geeigneten Volumen PBS bedeckt. Im Verlauf der UVA-Bestrahlung erwärmt sich die Lösung in der Kulturschale, jedoch nicht über 37°C . UVB-Bestrahlungen führten nicht zu einer Temperaturerhöhung über RT hinaus. Weiterhin wurden alle Bestrahlungen ohne Deckel der Kulturschalen, also unter semisterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Kontrolle der Strahlungs dosis erfolgte mit Hilfe eines UV-Dosimeters Modell Typ II der Firma Waldmann Medizintechnik. Die Messungen zur Bestimmung der UVA-Dosis erfolgten mit der Sensoreinstellung TL10R (350-400 nm), die für UVB-Dosen mit der Sensoreinstellung UV6 (285-350 nm). Nach Bestimmung der Momentanleistung pro Fläche in mW/cm^2 in einem bestimmten Abstand würde über die Dauer der Bestrahlung die Energie variiert. Wie in Abb. 2.1 und Abb. 2.2 zu sehen ist, ist die bestrahlte Fläche nicht vollkommen gleichmäßig ausgeleuchtet. Die Bestrahlungsenergie parallel bestrahlter Zellkulturschalen kann sich daher um ca. 10 % unterscheiden.

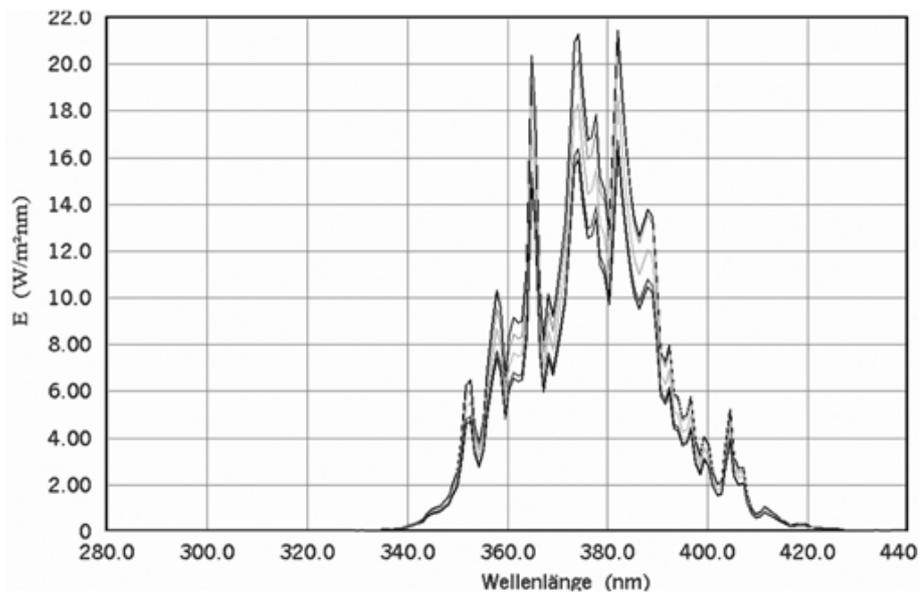


Abbildung 2.1: Emissionsspektrum UVA-Lampe. Das Emissionsspektrum der UVA-Lampe wurde mit einem Spektralphotometer aufgezeichnet. Die Spektren unterschiedlicher Graustufen zeigen Messungen des Spektrums an unterschiedlichen Positionen der bestrahlten Fläche.

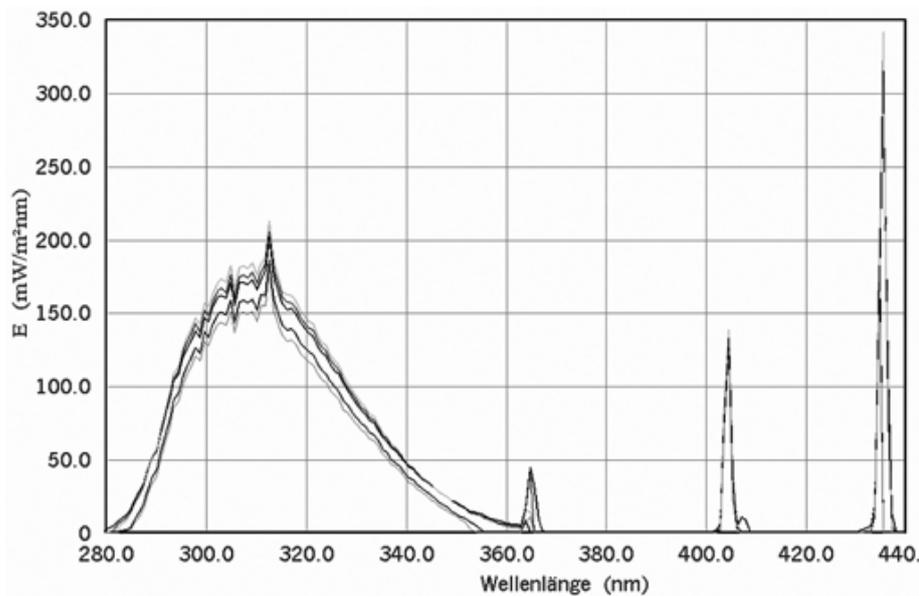


Abbildung 2.2: Emissionsspektrum UVB-Lampe. Das Emissionsspektrum der UVB-Lampe wurde mit einem Spektralphotometer aufgezeichnet. Die Spektren unterschiedlicher Graustufen zeigen Messungen des Spektrums an unterschiedlichen Positionen der bestrahlten Fläche.

2.3 Western-Blot

Für die Western-Blot analyse wurden Gesamtzelllysate verwendet. Bei der Herstellung von Zeitreihen über wenige Stunden wurde auf eine Proteinbestimmung verzichtet und zu erntende Proben jeweils in einem identischen Volumen 2x Auftragspuffer direkt lysiert. Hierbei wurden zum Lysieren von konfluenten Zellkulturen in 60 mm Kulturschalen bei Keratinozyten 150 μ l, bei Fibroblasten 250 μ l 2x Auftragspuffer eingesetzt. Die mit Auftragspuffer bedeckten Zellen wurden danach mit einem sterilen Kratzer möglichst sauber von der Kulturschale entfernt und bei 95 °C für 5 min denaturiert.

Bei der Herstellung von Western-Blots, die Zeitreihen über mehrere Tage zeigen, ist eine Proteinbestimmung zur Sicherstellung einer gleichmäßigen Beladung des Gels unverzichtbar. In diesen Fällen erfolgte die Zellyse mit den oben erwähnten Volumina in RIPA-Puffer, welcher Protease- und Phosphataseinhibitoren enthält. In diesem Puffer ist die in Kapitel 2.3.2 beschriebene Proteinbestimmung möglich. Identische Mengen an Gesamtprotein wurden dann mit 4x Auftragspuffer denaturiert.

2.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) ist eine denaturierende Gelelektrophorese in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel. Die aufzutrennende Probe wurde hierbei zunächst in einem 3%igen Sammelgel konzentriert und dann in einem 12%igen Trenngel gemäß der Größe ihrer Komponenten aufgetrennt. Als Elektrophoresekammer wurde das Modell Novex Mini-Cell der Firma Invitrogen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Die Elektrophorese wurde spannungsreguliert bei ca. 220 V bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung durchgeführt. Die Kontrolle der gewünschten Auftrennung war durch den Einsatz farbig vorgefärbter Proteinstandards (PeqGold Protein Marker IV, Peqlab) möglich.

Trenngel:	Sammelgel:
380 mM Tris HCl pH 8,8	125 mM Tris HCl pH 6,8
12 % Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)	3 % Acrylamid/Bisacrylamid (30/0,8)
0,1 % SDS	0,1 % SDS
0,1 % TEMED	0,1 % TEMED
0,1 % APS	0,1 % APS

2.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Der DC Protein Assay der Firma Biorad ermöglicht die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen in einem Bereich von 0,1 bis 2 mg/ml. Der Nachweis beruht auf einem colorimetrischen Test (Lowry *et al.*, 1951). Die Proteinbestimmungen erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Lediglich die Messung erfolgte in 96 Loch-Platten, welche folgende Volumina erforderten: 5 μ l Probe bzw. Standard, 25 μ l Lösung A' und 200 μ l Lösung B. Zur photometrischen Messung wurde ein Photometer vom Typ „Platereader MRX“ (Dynex-Technologies) bei einer Wellenlänge von 630 nm eingesetzt. Als Eichreihe diente eine BSA-Lösung in RIPA-Puffer.

2.3.3 Western-Blot

Beim Western-Blot wurden Proteine aus dem Gel einer Gelelektrophorese heraus auf eine Membran übertragen und dort immunologisch nachgewiesen. Es wurden Nitrocellulose Membranen (Schleicher&Schuell Biosciences) der Porengröße $0,2\ \mu\text{m}$ in Verbindung mit einer Blotkammer vom Typ Fast-Blot (Biometra) verwendet. Der Aufbau war dabei folgender: Kathode, Blottpapier (Blotting Paper 2 mm, Schleicher&Schuell Biosciences), Gel, Nitrocellulose-Membran, Blottpapier, Anode. Vor dem Aufbau der Apparatur wurden die Blottpapiere und die Membranen in Transfer-Puffer inkubiert. Zum Transfer Blotten wurde die Apparatur 80 min lang stromstärkereguliert bei 110 mA betrieben (110 mA pro 8×8 cm Membran).

Der Ablauf des Western-Blots mit immunologischem Nachweis war dabei stets folgender:

- Blockieren nicht mit Protein gesättigter Membranregionen mit 5 % Milchpulver in TBST (min. 40 min)
- Inkubation mit Erstantikörper über Nacht bei $4\ ^\circ\text{C}$ auf Schüttler
- 1x Waschen mit TBST
- Inkubation mit Zweitantikörper (ca. 1 h)
- 3x Waschen mit TBST (je ca. 15 min)
- Inkubation mit Chemiluminiszenzreagenz (5-10 min)

Zur Kontrolle eines gleichmäßigen Proteintransfers wurden die Membranen vor dem Blockieren mit Ponceau S gefärbt. Nur Membranen, die frei von Blasen und regelmäßig in der Färbung mit Ponceau S waren, sind für die densitometrische Auswertung verwendet worden. Die Membranen können vor dem Blockieren durch mehrmaliges Waschen mit TBST wieder entfärbt werden.

Alle verwendeten Erst- und Zweitantikörper, sowie ihre Eigenschaften, fasst Tabelle 2.1 zusammen. Alle eingesetzten Antikörper wurden in 5 % Milchpulver in TBST angesetzt. Nach erfolgter Belichtung können Erst- und Zweitantikörper wieder von der Membran entfernt werden, um weitere Erstantikörper einzusetzen. Dieser Vorgang wird als Stripping bezeichnet. Das Stripping erfolgt durch Inkubation der Membran in Stripping-Puffer bei $55\ ^\circ\text{C}$ unter schütteln. Je nach aufgetragener Proteinmenge erfolgt diese Inkubation für 15 bis 30 min. Die im Stripping-Puffer enthaltenen Detergenzien wurden durch gründliches Waschen der Membran mit TBST wieder entfernt, z.B. drei mal ca. 40 min. Die Waschschrte wurden bis zur Geruchsfreiheit der Membran wiederholt.

2.3.4 Puffer und Lösungen für Western-Blot und Gelelektrophorese

Alle Puffer und Lösungen wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ angesetzt und, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur gelagert.

2x Auftragspuffer:
125 mM Tris HCl
4 % SDS
20 % Glycerin
100 mM DTT

4x Auftragspuffer:
500 mM Tris HCl
16 % SDS
30 % Glycerin
400 mM DTT

Tabelle 2.1: Liste der für Western-Blots verwendeten Antikörper

Erstantikörper			
Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
P-ERK1/2 44-680G	Kaninchen	Biosource	1/1000
P-p38 sc-17852-R	Kaninchen	Sata Cruz Biotech.	1/200
P-JNK1/2 sc-6254	Maus	Sata Cruz Biotech.	1/100
ERK1/2 44-654G	Kaninchen	Biosource	1/1000
GAPDH ab9484	Maus	Abcam	1/25000
Zweitantikörper			
Antikörper	Spezies	Hersteller	Verdünnung
HRP-anti Maus P0260	Kaninchen	DakoCytomation	1/1000
HRP-anti Kaninchen P0217	Schwein	DakoCytomation	1/1000

0,01 % Bromphenolblau
pH 6,8

0,02 % Bromphenolblau
pH 6,8

10x Laemmli Gelelektrophorese-Puffer:
2 M Tris
0,2 mM Glycin
1 % SDS

10x TBS-Puffer:
1,5 M NaCl
0,5 M Tris
pH 7,6

TBST-Puffer:
0,15 M NaCl
0,05 M Tris
0,1 % TWEEN 20

Ponceau S Lösung:
0,1 % Ponceau S
5 % Essigsäure

Transfer-Puffer:
20 % Methanol
50 mM Tris
40 mM Glycin
0,037 % SDS

Stripping-Puffer:
100 mM β -Mercaptoethanol
60 mM Tris
2 % SDS
pH 6,8

2x RIPA-Puffer:
50 mM Tris
300 mM NaCl
0,2 mM EDTA
2 % Nonidet P40
2 % Desoxcholat
0,2 % SDS
0,05 % Natriumazid
pH 7,4
Lagerung: -20 °C

1x RIPA-Puffer:
50 % 2x RIPA-Puffer
1 % Proteaseinhibitormix complete (Boehringer)
1 mM Natriumorthovanadat
20 mM NaF

2.3.5 Dokumentation und Quantifizierung

Die Dokumentation der Chemilumineszenz erfolgte mittels einer digitalen Geldokumentationsanlage vom Typ FluorChem 8900 der Firma Alpha Innotech. Als Substrat für die an die Zweitantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase diente das ChemiGlow West Substrat der Firma Biozym. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mittels der Software AlphaEase FC ver. 3.2.3, wobei die Quantifizierung der Signale immer unter Abziehen eines manuell festgelegten Hintergrundes erfolgte. Alle Signale wurden mit den Signalen der jeweiligen Ladekontrollen verrechnet, um auch kleine Unterschiede in der aufgetragenen Proteinmenge auszugleichen.

2.4 Behandlung von Zellkulturen mit Ceramiden

Die Behandlung von Zellkulturen mit Ceramiden erfolgte mit C₂-Ceramid (D-erythro-Sphingosin) von Merck Bioscience-Calbiochem Nr.:110145. C₂-Ceramid ist nicht ohne weiteres in den gewünschten Konzentrationen wasserlöslich. Daher wurden zunächst 50 mM Stammlösungen in DMSO hergestellt (2-3 Wochen bei -20 °C lagerbar). Mit diesen Stammlösungen wurden dann die gewünschten Medien hergestellt.

2.5 Zellzyklusanalyse

Vindelov und Mitarbeiter entwickelten 1977 eine Technik zur Bestimmung der relativen DNS-Menge von eukaryotischen Zellen durch Färbung der DNS und Analyse durch FACS (Fluorescence Associated Cell Sorting) ((Vindelov, 1977), zur Übersicht: (Vindelov & Christensen, 1990)). Die FACS-Technik erlaubt es, die Menge an fluoreszierendem Farbstoff pro Zelle zu bestimmen und dennoch eine große Zahl Zellen in kurzer Zeit zu analysieren.

In diesem Fall wurde die doppelsträngige DNS von Fibroblasten durch Propidiumiodid (PI) gefärbt. Jede Messung beinhaltet Intensitäten der PI-Färbung von 30.000 Zellen. Das Ergebnis ist ein Histogramm der PI-Färbung über die gesamte Zellpopulation (siehe Abbildung 2.3). Der erste Peak kennzeichnet die Zellen der G1-Phase, Zellen die mehr doppelsträngige DNS enthalten als diese, befinden sich in der S-Phase. Die Population der sich in der G2/M-Phase befindenden Zellen liegt bei der doppelten PI-Intensität der G1-Zellen. Näherungsweise entspricht dabei die Fläche unter der Kurve eines Peaks dem prozentualen Anteil dieser Zellen an der Gesamtpopulation. Ziel der Analyse des PI-Histogramms ist es also das Histogramm durch drei Krüven nachzustellen, welche möglichst viele der 30.000 Zellen enthalten, und durch Bestimmung ihrer Integrale die prozentuale Verteilung der drei Zellzyklusphasen zu bestimmen.

Ablauf der PI-Färbung von Fibroblasten:

- Waschen der Zellen einer 100 mm Kulturschale mit PBS
- Ablösen der Zellen durch Trypsin
- Entfernen des Trypsins durch 2x Waschen mit 4 °C PBS und Abzentrifugieren bei 1200 rcf und 4 °C

- Gewaschenes Pellet in PBS resuspendieren und etwa $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml einstellen (auf Eis halten)
- 100 μ l Zellsuspension zusammen mit 500 μ l Vindelovs PI im Dunkeln bei 4 °C für min. 1 h inkubieren (längstens über Nacht)
- gefärbte Zellen im FACS analysieren

Als FACS-Gerät kam das Modell FACSCalibur der Firma BDBiosciences zum Einsatz. Die Aufzeichnung der Rohdaten erfolgte mit der Software Cell Quest 3.3, ebenfalls BDBiosciences. Nach dem Transfer der Rohdaten in die Analysesoftware ModFit LT 3.0 (Verity Software House) wurden mit dieser Modelle der Zellzyklusphasenverteilung errechnet. Grundlegende Einstellung für das Modell waren hierbei ein Zellzyklusmodell mit drei Phasen und das manuelle Festlegen des G1-peaks.

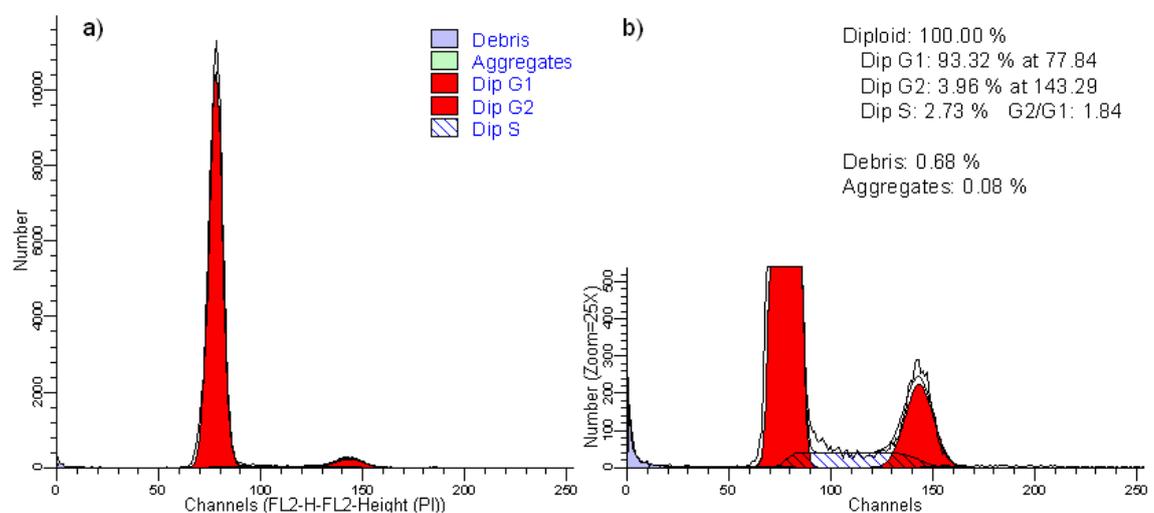


Abbildung 2.3: Beispiel eines PI-Histogramms. X-Achse: Intensitäten der PI-Färbung/DNA-Menge pro Zelle. Y-Achse: Anzahl der PI-positiven Zellen. a) Vollständiges Histogramm der PI-Färbung, Integrale der errechneten Kurven G1- und G2-Phase rot hinterlegt. b) zeigt die gleichen Daten wie a), lediglich der Maßstab der Y-Achse ist vergrößert um die Zellen der S-Phase (blaue Schraffur) sichtbar zu machen. Die in b) aufgelisteten Daten sind Ergebnis der Analyse der Rohdaten mit der Software ModFit LT 3.0

Das Beispiel zeigt eine durch 24 stündige, serumfreie Kultur synchronisierte Population G0/G1-arretierter Fibroblasten .

2.5.1 Puffer und Lösungen für die Zellzyklusanalyse

1x FACSpufer:
1 mM EDTA
0,01 % Natriumazid
in PBS

FACSRinse (BD Biosciences)

Vindelovs PI:

PBS

10 mM Tris
10 mM NaCl
75 μ M Propidium Iodid
0,1 % Nonidet NP40
700 U/l RNase
pH 8,0
dunkel bei 4 °C lagern

2.6 Nachweis apoptotischer Zellen durch FACS-Analyse

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte durch Färbung der Zellen mit Annexin V-FITC und PI und anschließender FACS-Analyse. Zum Einsatz kam dabei der Annexin V-FITC-Antikörper aus dem Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). Bei der Färbung der Zellen wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Als FACS-Gerät kam das Modell FACSCalibur der Firma BD Biosciences zum Einsatz. Die Aufzeichnung der Rohdaten erfolgte mit der Software Cell Quest 3.3, ebenfalls BD Biosciences. Die Auswertung der Daten erfolgte in der Analysesoftware WinMDI 2.9 (Joe Trotter - Freeware). Pro Probe wurden 20.000 Zellen aufgezeichnet und in die Quadrantenauswertung nach den Vorgaben des Herstellers mit einbezogen.

2.7 MTT-Färbung als Viabilitätstest

Die MTT-Färbung ist eine Methode zur Quantifizierung der Viabilität lebender Zellen. Er beruht auf der Reduktion eines Tetrazoliums Salzes (Thiazolyl-Blau-Tetrazoliumbromid) an der Membran intakter Mitochondrien (Berridge *et al.*, 2005). Es entsteht ein Produkt, dessen Hauptbestandteil ein Formazanring ist. Dieses Ringssystem ist in organischer Lösung intensiv gefärbt und colorimetrisch bestimmbar. Der MTT-Assay ist somit ein Nachweis für mitochondriale Aktivität. Der MTT-Assay wurde in 48-Lochplatten (Greiner-bioone) durchgeführt. Die colorimetrische Bestimmung des Formazan erfolgte mit einem „Plate-reader MRX“ (Dynex-Technologies) bei einer Wellenlänge von 550 nm.

Durchführung des MTT-Assays:

- Zellen mit auf 37 °C temperiertem PBS waschen
- Zellen mit 200 μ l MTT-Lösung bedecken
- Inkubation im Zellkulturschrank bis unter 40-facher Vergrößerung im Binokular violette kristalline Strukturen sichtbar sind (30 min bis 2 h)
- Absaugen der MTT-Lösung
- Zellen mit 200 μ l DMSO bedecken
- Lichtdicht abgedeckte 48-Lochplatte auf Schüttler fixieren und bei ca. 300 rpm bis zur vollständigen Auflösung der Zellen und der kristallinen Strukturen schütteln
- Messung der Absorption bei 550 nm

2.7.1 Puffer und Lösungen für die MTT-Färbung

MTT-Lösung:
2 mg/ml MTT (Sigma-Aldrich)
in PBS-Puffer
(immer frisch ansetzen,
max. 2 Wochen dunkel
bei 4 °C lagern)

Lyselösung:
DMSO tech. (Sigma-Aldrich)

2.8 Comet Assay

Der alkalische Comet Assay nach Singh (Singh *et al.*, 1988) ist ein sensitiver Nachweis für Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS eukaryotischer Zellen (zur Übersicht: (Klaude *et al.*, 1996)). Prinzipiell handelt es sich bei diesem Assay um eine Elektrophorese einzelner Zellkerne. Nach Elektrophorese und Färbung der DNS mit Ethidiumbromid kann man die DNS des Kerns unter einem Fluoreszenzmikroskop bei x-facher Vergrößerung sehen. Intakte chromosomale DNS kann den Zellkern bei den gewählten Bedingungen nicht verlassen. DNS, deren Mobilität durch Einzel- oder Doppelstrangbrüche erhöht ist, kann wesentlich einfacher den Kern verlassen. Ist das Ausmaß der Schädigung hoch genug, so bildet sich ein kometenartiger Schweif in Richtung der Anode. Die Größe dieses Schweifes ist ein Indikator für das Ausmaß des DNS-Schadens.

Als Maß für diese Methode der Bestimmung eines DNS-Schadens hat sich das sogenannte Tail Moment etabliert (Olive *et al.*, 1990). Die Aufnahme der einzelnen Kometen erfolgt durch eine sensitive Digitalkamera, welche das Fluoreszenzlicht der mit Ethidiumbromid gefärbten DNS aufzeichnen kann. Die Analysesoftware Software Comet Assay II liefert ein Histogramm der DNS-Verteilung im Kommeten, wobei Pixelintensität der DNS-Masse entspricht (siehe Abb. 2.4). Das Tail Moment ist hierbei die Distanz vom Zentrum des Kometenkopfes und dem DNS-Masseschwerpunkt des Kometenschweifs multipliziert mit dem Anteil der DNS im Schweif bezogen auf die Gesamt-DNS.

Für die mikroskopische Analyse nach Elektrophorese und Färbung kam ein Fluoreszenzmikroskop vom Typ BX60 der firma Olympus zum Einsatz. Die Vergrößerung war hierbei eine 400-fache. Pro Objektträger wurden 50 zufällig ausgewählte Zellen Ausgewertet. Die Berechnung des Tail Moments erfolgte mit Hilfe der Software Comet Assay II der Firma Preceptiv Instruments Ltd..

Durchführung des Comet Assays:

- Zellen 2x mit 4 °C kaltem PBS waschen und mit Trypsin von der Kulturschale lösen.
- Trypsin durch Zugabe des gleichen Volumens Medium mit Serum stoppen. Die Volumina sind so zu wählen, daß die Zellzahl bei $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/ml liegt.
- Zu 10 μ l dieser Zellsuspension werden 120 μ l LMP-Agarose gegeben und auf einen agarosebeschichteten Objektträger gegeben. Zum Glätten der Oberfläche mit Deckgläschen abdecken und für ca. eine min. bei 4 °C Aushärten lassen, Danach Deckgläschen wieder entfernen.
- Inkubation in Lyselösung für mindestens 1 h, Inkubation über Nacht ist ebenfalls möglich.

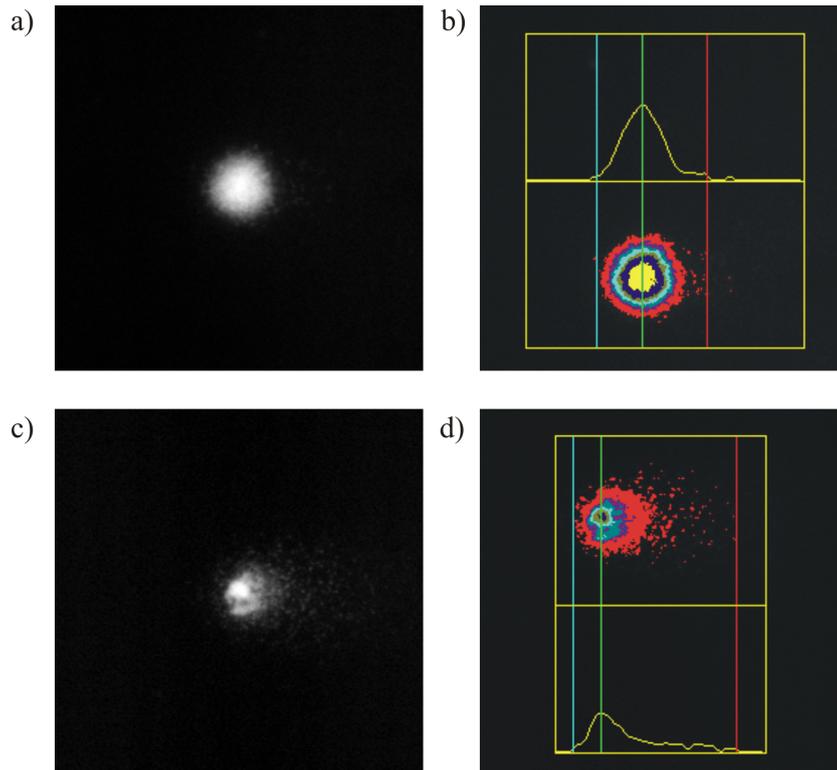


Abbildung 2.4: Der Comet Assay und das Tail Moment. a) Schwarzweiße Aufnahme des Ethidiumbromidfluoreszenzlichtes eines Zellkerns mit weitgehend unbeschädigter DNA nach der Elektrophorese. b) Falschfarbendarstellung der Fluoreszenzintensität des Zellkerns aus a) mit Darstellung des Histogramms der Fluoreszenzlichtintensitätsverteilung. c) Ethidiumbromidfluoreszenzlicht eines Zellkerns welcher 15 min zuvor mit 100 J/m^2 UVB bestrahlt wurde. d) Falschfarbendarstellung des Kerns aus c) mit Histogramm der Fluoreszenzlichtintensitätsverteilung. Elektrophoreserichtung von links nach rechts. Falschfarbendarstellung: gelb - höchste Fluoreszenzintensität, rot - geringste Fluoreszenzintensität. Vergrößerung: 400 fach. Die Histogramme wurden mit der Software Software Comet Assay II bestimmt und aus diesen das Tail Moment errechnet .

- Objektträger zum Debatuieren für 25 min in kaltem Elektrophoresepuffer inkubieren.
- Elektrophorese in kaltem Elektrophoresepuffer, bei 24 V und 300 mA (Stromstärke über Puffervolumen regulieren) für 10 min.
- Objektträger in Färbekammer 2x 5 min mit kaltem Neutralisationspuffer waschen.
- Objektträger 5 min in Färbekammer mit absoluten Ethanol zum Entwässern inkubieren.
- Bei RT Trocken und nach Bedarf Lagern.
- Färben mit $50 \mu\text{l}$ 1x Ethidiumbromidlösung, Abdecken mit Deckglas.
- Analyse unter Fluoreszenzmikroskop

2.8.1 Puffer und Lösungen für den Comet Assay

Lysepuffer: 2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris pH 10 einstellen mit NaOH Plätzchen	Lyselösung: 89 % Lysepuffer 1 % Triton X-100 10 % DMSO frisch ansetzen und auf 4 °C kühlen
Elektrophoresepuffer: 300 mM NaOH 1 mM EDTA pH \geq 13 4 °C	Neuralisationspuffer: 0,4 M Tris pH 7,5 4 °C
10x Ethidiumbromid: 100 μ g/ml	LMP-Agarose: 0,5 % LMP-Agarose in PBS frisch ansetzen
MEEO-Agarose: 1,5 % MEEO-Agarose in PBS	PBS 4 °C

Weitere Materialien zur Durchführung des Comet Assays: Deckgläser 24x60 mm (Menzel-Gläser), Objektträger mit aufgerauhtem Rand (Objektträger SuperfrostPlus, Menzel-Gläser) und Ethanol (absolut).

2.9 RT-PCR

Die RT-PCR (real-time PCR) ist eine semiquantitative PCR mit vorhergehender reverser Transskription. Das Ausgangsmaterial für die RT-PCR stellt die gesamte RNS der Zellen dar, diese wird durch reverse Transskription in cDNS umgeschrieben (Siehe Kapitel 2.9.1). Bei dieser Methode enthält der PCR-Ansatz einen fluoreszierenden Farbstoff (SYBR Green, Invitrogen), welcher unter Zunahme der Fluoreszenzintensität in doppelsträngige DNS interkaliert. Die Synthese des Amplifikates korreliert daher mit dem Ansteigen der Fluoreszenzintensität von Zyklus zu Zyklus. Dadurch wird die relative Quantifizierung nach der so genannten $\Delta\Delta$ -CT Methode möglich (Siehe Kapitel 2.9.2). Als PCR-Gerät wurde hierbei ein ABI PRISM 7000 der Firma Applied Biosystems verwendet. Die Aufzeichnung der Rohdaten und die nachfolgende Analyse erfolgte mit der Software ABI PRISM 7000 SDS 1.1, ebenfalls Applied Biosystems.

2.9.1 RNS-Isolation

Die Isolation von RNS aus Fibroblasten erfolgte mittels des Kits NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel). Für die Präparation von RNS aus Fibroblastenkultur in einer 60 mm Kulturschale wurden zur Lyse der Zellen 350 μ l Lysispuffer RA1 gegeben. Nach erfolgter Zelllyse wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Das Ergebnis dieser Extraktion war RNS mit einer Konzentration von 0,5 bis 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf) und UV-durchlässigen Einwegküvetten vom Typ UV-Küvette mikro (Brand). Für die Synthese der cDNS wurden jeweils 100 ng RNS eingesetzt.

2.9.2 Durchführung der cDNS-Synthese und RT-PCR

Die Durchführung der cDNS-Synthese und der RT-PCR ist im folgenden in tabellarischer Form dargestellt:

Tabelle 2.2: Pipettierschema zur Herstellung cDNS-Synthesemix 1

Volumen in μl	Substanz
1	Random Primer (Invitrogen)
1	10 mM dNTP Mix (Invitrogen)
7	H ₂ O für die PCR (Invitrogen)
3	RNS (100 ng)
5 min Denaturierung bei 65 °C, dann 4 °C	

Tabelle 2.3: Pipettierschema zur Herstellung cDNS-Synthesemix 2

Volumen in μl	Substanz
4	5 x 1.-Strag Synthesepuffer (Invitrogen)
2	100 mM DTT
1	RNase-Out (Invitrogen)
2 min Inkubation bei 37 °C	

Jeder Ansatz zur cDNS-Synthese beinhaltete 12 μl cDNS-Synthesemix 1, 7 μl cDNS-Synthesemix 2 und 1 μl M-MLV Reverse Transkriptase (Invitrogen). Das Programm zur Synthese von cDNS ist in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: PCR-Programm zur Synthese von cDNS

T in °C	Zeit in min
25	10
37	50
70	15
4	∞

2.9.3 Primersequenzen für die RT-PCR

Alle Primer wurden durch die Firma Operon Synthetisiert und im Reinheitsgrad "Salt-Free" bestellt.

Tabelle 2.5: Pipettierschema für die RT-PCR

Volumen in μl	Substanz
12,5	Sybr Green (Invitrogen)
0,5	ROX passiv Flurochrom (Invitrogen)
1	Primer fwd
1	Primer rev
7	H ₂ O für die PCR (Invitrogen)
3	cDNS

Tabelle 2.6: PCR-Programm für die RT-PCR

T in °C	Zeit in min
94	20
55	20
72	30
35 Zyklen	

18s-RNA forw	5'-GCC GCT AGA GGT GAA ATT CTT G-3'
18s-RNA rev	5'-CAT TCT TGG CAA ATG CTT TCG-3'
MMP1 forw	5'-CAT GAA AGG TGG ACC AAC AAT TT-3'
MMP1 rev	5'-CCA AGA GAA TGG CCG AGT TC-3'
TIMP1 forw	5'-TCG TGG CTC CCT GGA ACA-3'
TIMP1 rev	5'-CCA ACA GTG TAG GTC TTG GTG AAG-3'

2.10 MMP1-Zymographie

Die ins Zellkulturmedium sekretierten MMPs liegen dort nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Um sie mittels Zymographie nachweisen zu können, mussten sie erst höher konzentriert werden, bevor sie durch Elektrophorese in der Gelatine-SDS-Page aufgetrennt, renaturiert und schließlich detektiert wurden. Dies erfolgte gemäß dem folgenden Protokoll. Ausgangsmaterial waren konfluente Fibroblasten (20 cm Zellkulturschale), welche 24 h zuvor bestrahlt wurden und nach erfolgter Bestrahlung in PBS mit 20 ml frischem, serumfreiem Medium versorgt wurden.

Durchführung der Zymographie:

- Zentrifugation von je 20 ml Zellkulturüberständen zur Aufkonzentrierung auf ein Volumen von ca. 200 μl . Zentrifugation bei 1000 g in Vivaspin 20, 10.000 MWCO, Sartorius AG, Göttingen.
- Angleichen des Volumens der Proben mit Medium auf 250 μl .
- 200 μl versetzen mit 60 μl 4x Ladepuffer, Elektrophorese bei 150 V gemäß Kapitel 2.3.1 bis zum Erreichen der gewünschten Auftrennung. SDS-page gemäß Kapitel 2.3.1 mit 1% Gelatine in der Gelmatrix.
- Waschen des Gels mit Waschpuffer, 3 x 30 min.

2 Material und Methoden

- Inkubation des Gels in Entwicklungspuffer, über Nacht, bei 37 °C, leicht schwenkend.
- Coomassie-Färbung

2.10.1 Färbung und Dokumentation von Zymogrammen

Die über Nacht in Entwicklungspuffer inkubierten Zymogramme wurden anschließend nach der Methode von Neuhoff *et al.* (1985) Coomassie gefärbt. Die in der Gelmatrix enthaltene Gelatine wird hierbei angefärbt. Kommt es zu enzymatischer Aktivität von MMPs, ist die Coomassie-Färbung bei der entsprechenden Proteingröße weniger intensiv. Dieser Effekt tritt beim Entfärbeprozess aus und muss gestoppt werden, sobald das ideale Verhältnis von Signal (entfärbtes Areal) zu Hintergrund (gefärbte Gelatine) erreicht ist. Die Zymogramme wurden mit einem Flachbettscanner mit Durchlichteinheit digitalisiert.

Tabelle 2.7: Coomassie Färbung nach Neuhoff

Arbeitsschritt	Lösung	Zeit
Fixierung	25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure	1 h
Färbung	0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 % Methanol	2 h
Entfärbung	50 % Methanol, 10 % Essigsäure	nach Bedarf

2.10.2 Puffer und Lösungen für die Zymographie

4 x Ladepuffer Zymographie:

4 g SDS
1,6 g Succrose
20 mg Bromphenolblau
10 ml Tris HCl 1 M pH 6,8
ad 20 ml H₂O_{deion.}

Waschpuffer:

2,5 % Triton X-100 in H₂O_{deion.}

Coomassie Fixierer:

25 % Isopropanol
10 % Essigsäure

Coomassie Entfärber:

50 % Methanol
10 % Essigsäure

Entwicklungspuffer Zymographie:

50 mM Tris HCl pH 7,5
8 mM CaCl₂
200 mM NaCl
1 μM ZnCl₂
0,02 % Brij-35

Gelatine Stammlösung:

10 % Gelatine in H₂O_{deion.}
immer frisch lösen bei 37 °C

Coomassie Färber:

0,1 % Coomassie Brilliant Blue
50 % Methanol

2.11 *in vivo*-Studie

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *in vivo* Studie wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt. Die Studiennummer des Ethikantrages lautet 2226. Die erforderlichen Voruntersuchungen, Bestrahlungen, die Entnahme der Biosien und die Nachuntersuchung wurden im dermatologischen Labor des IUF von Frau Dr. Medve-Königs durchgeführt. An der Studie nahmen drei männliche, kaukasische Probanden vom Hauttyp II teil. Für alle drei Probanden wurde zunächst eine Lichttreppe angefertigt, um zu überprüfen, ob bei den jeweiligen Probanden die geplanten UV-Dosen von 30 J/cm^2 UVA, 100 J/m^2 UVB und die Kombination von 30 J/cm^2 UVA und 100 J/m^2 UVB unter der individuellen MED lagen. Dies war bei allen drei Probanden der Fall.

Drei Areale der Gesäßhaut wurden rasiert und mit den oben genannten UV-Dosen bestrahlt. Ein Kontrollfeld blieb während der Bestrahlungsprozedur abgedunkelt. Nach 24 h wurde den Probanden aus allen vier Arealen je eine Biopsie von 4 mm Durchmesser entnommen. Die Operation erfolgte unter lokaler Anästhesie. Die entstandenen Wunden wurden mit jeweils zwei Stichen genäht und die Fäden nach zehn Tagen wieder entfernt. Die Hautbiopsien wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Präparation der Gesamt-RNS gelagert. Die Isolation von RNS aus Hautbiopsien erfolgte mittels des NucleoSpin RNA II Kits der Firma Macherey-Nagel. Um das Zellmaterial der Hautbiopsien für diese Präparation nutzen zu können, war es erforderlich ein Zellhomogenat herzustellen. Dies erfolgte durch homogenisieren in einer Kugelmühle (MixaMill, Quiagen). Hierfür wurden je eine Biopsie zusammen mit einer Stahlkugel (3/16 Zoll G700-Stahl Kugellagerkugel, Nanoball GmbH) in $350 \mu\text{l}$ RNS-Lysispuffer in einem 2 ml Eppendorf-Einweggefäß aufgenommen und für zweimal 2 min mit 60 Hz geschüttelt. Membranreste wurden durch zentrifugieren für 2 min bei 2000 g pelletiert. $300 \mu\text{l}$ des Überstandes wurden dann nach dem Protokoll des Herstellers für die RNS-Präparation eingesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion in primären humanen Keratinozyten

UVA- wie auch UVB-Strahlung lösen in den Zellen der menschlichen Haut umfangreiche Signaltransduktionsprozesse aus. Zentrale Mediatoren dieser Signaltransduktionsprozesse sind die MAPKinasen. ERK1/2, p38 und JNK1/2 sind MAPKinasen mit zentraler Bedeutung für verschiedene, unter Kapitel 1.4.1 beschriebene, Prozesse. Abbildung 3.1 zeigt den Verlauf des Phosphorylierungsstatus der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 innerhalb der ersten Stunde nach der Bestrahlung mit 30 J/cm² UVA (Abb. 3.1 a)) und nach Bestrahlung mit 100 J/m² UVB (Abb.3.1 b)) in primären humanen epidermalen Keratinozyten.

Die Aktivierung der MAPKinasen wurde im Western-Blot mit phosphospezifischen Antikörpern gezeigt. Auf die SDS-Gele aufgetragen wurden Gesamtzellysate, hergestellt durch Lyse der Zellen in Auftragspuffer zum gewünschten Zeitpunkt der Zeitreihen. Als Ladekontrolle diente stets ein Western-Blot mit t-ERK1/2- oder GAPDH-Antikörpern. Die Densitometriedaten zeigen die Signalintensität des Blots mit phosphospezifischem Antikörper geteilt durch die Signalintensität des als Ladekontrolle dienenden Blots. Der Kontolle, in allen Abbildungen als C bezeichnet, wurde immer der relative Wert eins zugewiesen.

Die densitometrische Auswertung der Western-Blots zeigte einen deutlichen Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 durch die Bestrahlung mit UVA. Der Faktor der Erhöhung des Phosphorylierungsgrades betrug hierbei zu den Zeitpunkten 15 und 30 min nach Bestrahlung etwa drei. Diese Aktivierung nahm im weiteren Verlauf wieder ab und sank auf einen Faktor von etwa zwei, verglichen mit der Kontrolle. Die Aktivierung von p38 und JNK1/2 durch UVA war weniger deutlich, zwar kam es auch hier zu einer Zunahme der Phosphorylierung, aber ein Faktor von 2 wurde in den ersten 60 min nach Bestrahlung nicht überschritten (Abb. 3.1 a)).

Die Bestrahlung von Keratinozyten mit 100 J/m² UVB (Abb. 3.1 b)) zeigt ein ähnliches Bild. Die Aktivierung von ERK1/2 war hier allerdings stärker und länger anhaltend. Auch 60 min nach Bestrahlung betrug der Faktor der Aktivierungssteigerung hier noch etwa fünf. Die Wirkung von UVB auf p38 und JNK1/2 war ähnlich der von UVA. Es kam zu keiner deutlichen Steigerung der Phosphorylierung dieser beiden MAPKinasen.

Um zu untersuchen, ob eine Wechselwirkung zwischen durch UVA- und UVB-induzierten Signaltransduktionsprozessen besteht, wurden die in Abbildung 3.1 eingesetzten Keratinozyten auch einer Kombinationsbestrahlung aus UVA und UVB ausgesetzt. Aus technischen Gründen konnte hierbei die Bestrahlung nur sequenziell und nicht zeitgleich erfol-

3.1 Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion in Keratinozyten

gen. Für die Durchführung der Bestrahlung bedeutet dies zunächst Bestrahlung mit UVA, dann in ca. 1 min Abstand die Bestrahlung mit UVB (Abb.3.2 a)). Um auszuschließen, dass die hierbei gemachten Beobachtungen Artefakte dieser Bestrahlungsreihenfolge sind, wurde das Experiment auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt (Abb.3.2 b)).

Die Aktivierung von ERK1/2 nach Bestrahlung mit UVA und UVB in Abbildung 3.2 a) überstieg nicht den Faktor zwei gegenüber der Kontrolle. Dies war verglichen mit der durch UVB verursachten Aktivierung von ERK1/2 aus Abbildung 3.1 b) eine signifikante Erniedrigung der Aktivierung. Die Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB verursachte also eine Inhibition der durch UVB ausgelösten ERK1/2-Aktivierung. Anders verhielten sich die MAPKinasen p38 und JNK1/2. Hier führte die Kombinationsbestrahlung zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität gegenüber der durch UVA und UVB hervorgerufenen Aktivität. Während die alleinige Bestrahlung mit UVA oder UVB maximal zu einer Erhöhung der Aktivität von p38 um den Faktor zwei führte, betrug dieser Faktor nach Kombinationsbestrahlung vier bis acht. Auch die Aktivierung von JNK1/2 war nach Kombinationsbestrahlung deutlich erhöht gegenüber Einzelbestrahlung mit UVA oder UVB. Die Senkung der ERK1/2-Aktivität beziehungsweise Erhöhung der p38- und JNK1/2-Aktivität nach Kombinationsbestrahlung war nicht von Beginn der Zeitreihe an signifikant verschieden von der Aktivitätsentwicklung nach UVB oder UVA. Lediglich für die Zeitpunkte 45 und 60 min nach Bestrahlung ergab sich immer ein signifikanter Unterschied. Ob die Bestrahlungssequenz als UVA + UVB (Abb. 3.2 a)) oder als UVB + UVA (Abb. 3.2 b)) ausgeführt wurde, beeinflusste das Ergebnis nicht wesentlich. Obwohl Abbildung 3.2 a) und 3.2 b) nicht das exakt gleiche Ergebnis zeigen, ergaben sich keine Unterschiede im Gesamtbild der Aktivierungsmuster von ERK1/2, p38 und JNK1/2.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB zu einer niedrigeren Aktivierung von ERK1/2 führte als die Bestrahlung mit UVB allein. Für die Aktivierung von p38 und JNK1/2 galt dies nicht, hier führte die Kombination beider Strahlungsqualitäten zu einer Vervielfachung der Aktivierung gegenüber den Einzelbestrahlungen, wobei der Verstärkungseffekt synergistisch war.

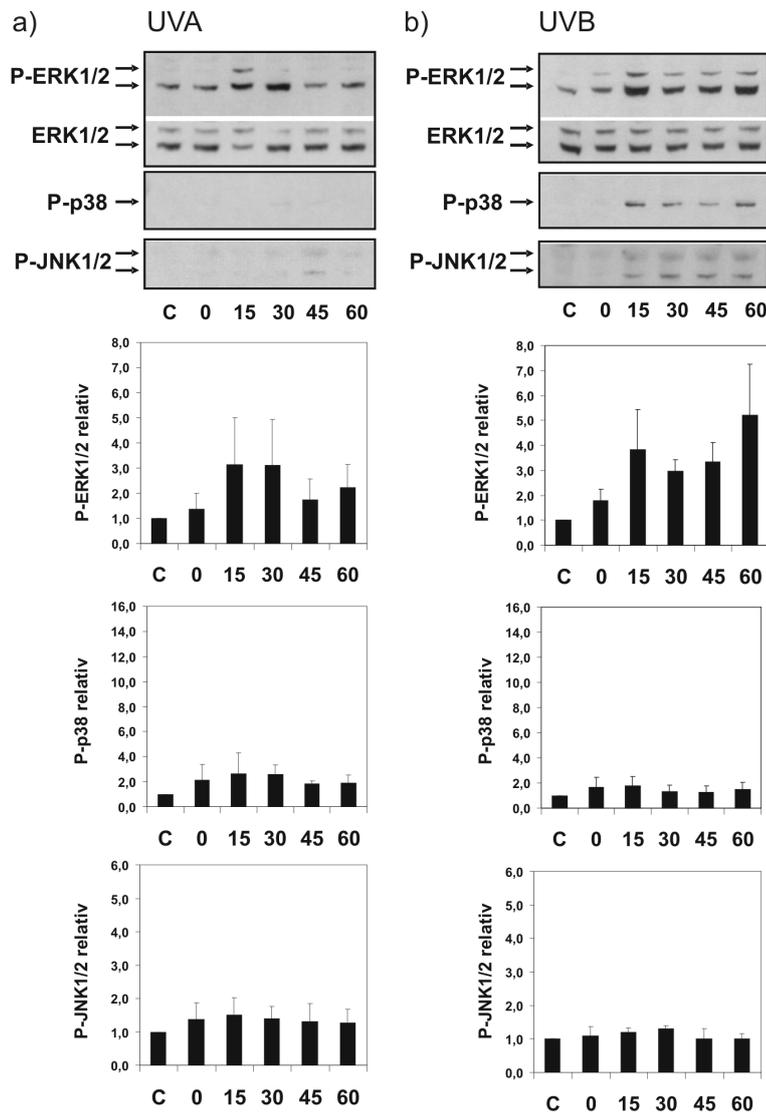


Abbildung 3.1: UVA- und UVB-induzierte Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 in HNKs. Analyse des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2, p38 und JNK1/2 im Western-Blot. a) Bestrahlung der Zellen mit UVA. b) Bestrahlung der Zellen mit UVB. Gezeigt sind zunächst Western-Blots mit phosphospezifischen Antikörpern für P-ERK1/2, P-p38 und P-JNK1/2 nacheinander durchgeführt auf der gleichen Membran. t-ERK1/2 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung innerhalb der ersten Stunde nach der Bestrahlung. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosen: UVA 30 J/cm², UVB 100 J/m². Unterhalb der Western-Blots: densitometrische Auswertung von weiteren Experimenten unter Normalisierung auf den Phosphorylierungsgrad der Kontrolle C und Berücksichtigung der Ladekontrollen. Y-Achse: relative Signalintensität, X-Achse: Zeit nach Bestrahlung in min. Fehlerbalken sind Standardabweichungen von n = 3-6 bei Verwendung von Zelllinien unterschiedlicher Spender.

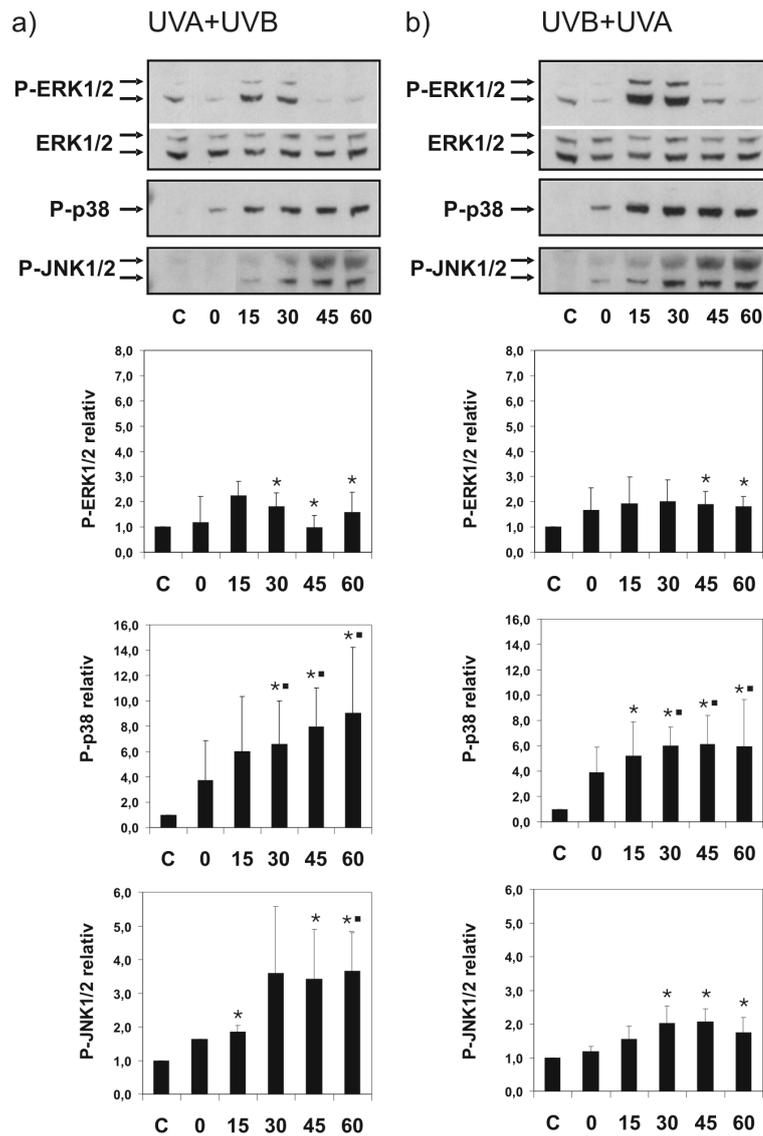


Abbildung 3.2: Durch Kombinationsbestrahlungen mit UVA + UVB und UVB + UVA induzierte Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 in HNKs. Analyse des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2, p38 und JNK1/2 im Western-Blot. a) Bestrahlung der Zellen mit UVA + UVB. b) Bestrahlung der Zellen mit UVB + UVA. Gezeigt sind Western-Blots mit phosphospezifischen Antikörpern für P-ERK1/2, P-p38 und P-JNK1/2 nacheinander durchgeführt auf der gleichen Membran. t-ERK1/2 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung innerhalb der ersten Stunde nach der Bestrahlung. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosen: a) UVA 30 J/cm² + UVB 100 J/m², b) UVB 100 J/m² + UVA 30 J/cm². Unterhalb der Western-Blots: densitometrische Auswertung von weiteren Experimenten unter Normalisierung auf den Phosphorylierungsgrad der Kontrolle C und Berücksichtigung der Ladekontrollen. Y-Achse: relative Signalintensität, X-Achse: Zeit nach Bestrahlung in min. Fehlerbalken sind Standardabweichungen von n = 3-6 bei Verwendung von Zelllinien unterschiedlicher Spender. Signifikanztest: Students t-Test. Stern: p < 0,05 für UVA + UVB und UVB + UVA getestet gegen UVB aus Abbildung 3.1 b), Quadrat: p < 0,05 für UVA + UVB und UVB + UVA getestet gegen UVA aus Abbildung 3.1 a).

3.2 Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion in primären humanen dermalen Fibroblasten

In der menschlichen Haut sind nicht nur Keratinozyten der UV-Strahlung ausgesetzt. Auch die Fibroblasten der Dermis werden von der UV-Strahlung erreicht. Daher wurde in dem in Abbildung 3.3 dargestellten Experiment überprüft, ob die im vorherigen Abschnitt in Keratinozyten gemachten Beobachtungen auch für Fibroblasten gelten. Da in Abbildung 3.2 gezeigt werden konnte, dass die Reihenfolge in der die Kombinationsbestrahlung durchgeführt wurde nicht relevant war, wurde hier die Kombinationsbestrahlung lediglich als Folge von UVA und UVB durchgeführt.

Abbildung 3.3 a) zeigt den Verlauf der Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 innerhalb der ersten Stunde nach Bestrahlung mit 30 J/cm^2 UVA. Es zeigte sich hier eine vorübergehende schwache Aktivitätssteigerung von ERK1/2, welche im Unterschied zur Situation in HNKs nur von kurzer Dauer war. Bereits nach 45 min war das Niveau der Kontrolle wieder erreicht. Die Bestrahlung mit UVA hatte keinen nennenswerten Einfluß auf den Phosphorylierungsgrad von p38 und JNK1/2. Die Aktivierung von ERK1/2 nach Bestrahlung mit UVB, dargestellt in Abbildung 3.3 b), war mit einem Faktor von etwa sechs gegenüber der Kontrolle stark und über die hier dargestellte erste Stunde hinaus anhaltend. Bei der Bestrahlung mit UVB war kein wesentlicher Einfluß auf die MAPKinasen p38 und JNK1/2 feststellbar. Die Kombinationsbestrahlung ist in Abbildung 3.3 c) dargestellt. Ähnlich wie in Keratinozyten, zeigt sich hier deutlich der inhibitorische Effekt des UVA-Anteils in der Kombinationsbestrahlung auf die UVB-induzierte Aktivierung von ERK1/2. Der Verlauf der Aktivierung entsprach weitgehend dem durch alleinige Bestrahlung mit UVA ausgelösten. Im Unterschied zu Keratinozyten hatte die Kombinationsbestrahlung in Fibroblasten keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von p38. Es kam zu keiner über das Kontrollniveau hinausgehenden Aktivierung. Die verstärkte Aktivierung von JNK1/2 durch die Kombinationsbestrahlung war hingegen deutlich und ähnlich stark wie in Keratinozyten.

Fibroblasten verhielten sich also in Bezug auf ERK1/2 und JNK1/2 in gleicher Weise wie Keratinozyten, während p38 in Fibroblasten, zumindest innerhalb des hier untersuchten Zeitraumes, nicht mit einer gesteigerten Aktivität durch die Bestrahlung zu reagieren scheint.

Das beobachtete Phänomen der wechselseitigen Beeinflussung von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion scheint also sowohl in Keratinozyten als auch in Fibroblasten stattzufinden. Eine solche Querverbindung bis dahin als unabhängig erachteter Signalwege wird als Crosstalk bezeichnet. Es stellte sich nun die Frage, ob dieser Crosstalk spezifisch für die Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierten Signaltransduktionsergebnissen war oder ob es sich hierbei um ein einfaches Artefakt der beiden aufeinander folgenden Bestrahlungen handelte. Um dies zu untersuchen, wurde das in Abbildung 3.5 gezeigte Experiment durchgeführt. In diesem Versuchsansatz wurden Fibroblasten mit 30 J/cm^2 UVA bestrahlt und die Aktivierung von ERK1/2 nach 30 und 60 min verglichen mit Fibroblasten, welche zweimal im Abstand von etwa einer Minute mit jeweils 15 J/cm^2 UVA bestrahlt wurden. Der zeitliche Abstand von einer Minute entsprach dem Abstand zwischen der UVA- und der UVB-Bestrahlung im Experiment aus Abbildung 3.3. Diese Kon-

3.2 Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion in Fibroblasten

trolle wurde auch für UVB durchgeführt, wobei die einmalige Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB verglichen wurde mit einer Folge von zweimal 50 J/m^2 UVB.

In Abbildung 3.5 ist nach 30 min die für UVA bereits gezeigte leichte Steigerung der Aktivierung von ERK1/2 zu sehen, welche hier nach 60 min sogar unter das Niveau der Kontrolle sank. Die Bestrahlung mit zweimal 15 J/cm^2 UVA führte zu einem ähnlichen Ergebnis. Die durch UVB ausgelöste Aktivierung von ERK1/2 war deutlich stärker, aber auch hier zeigt sich kein nennenswerter Unterschied zwischen der Aktivierung durch eine Bestrahlungsfolge bestehend aus zweimal 50 J/m^2 bzw. einmal 100 J/m^2 UVB. Die nur zu einer minimalen Aktivierung von ERK1/2 führende Wechselwirkung zwischen UVA und UVB kann also als spezifisch für diese beiden Strahlungsarten angesehen werden.

Die Versuche aus Abbildung 3.3 zeigen lediglich die Entwicklung des beschriebenen Crosstalks im Verlauf der ersten Stunde nach Bestrahlung. Um zu überprüfen, wie lange dieses Phänomen anhält, wurde in dem in Abbildung 3.6 dargestellten Versuch die Aktivierung von ERK1/2 24 h nach Bestrahlung bestimmt. Abbildung 3.6 zeigt, dass sowohl die starke UVB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 als auch der inhibitorische Effekt von UVA auf die UVB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 24 h anhalten.

Weiterhin wurde untersucht, ob das beschriebene System der Aktivierung von ERK1/2 eine Refraktionszeit besitzt, d.h. eine UVA-Bestrahlung die Aktivierung von ERK1/2 durch eine in einem größeren zeitlichen Abstand erfolgende Bestrahlung mit UVB verhindert. Es zeigte sich, dass ERK1/2 in mit 30 J/cm^2 UVA bestrahlten Zellen bis zu 24 h lang nicht wieder durch 100 J/m^2 UVB zu aktivieren war (siehe Abb. 3.4). UVA ist also in der Lage, länger anhaltende Prozesse zu induzieren, welche einer UVB-induzierten ERK1/2-Aktivierung entgegenwirken.

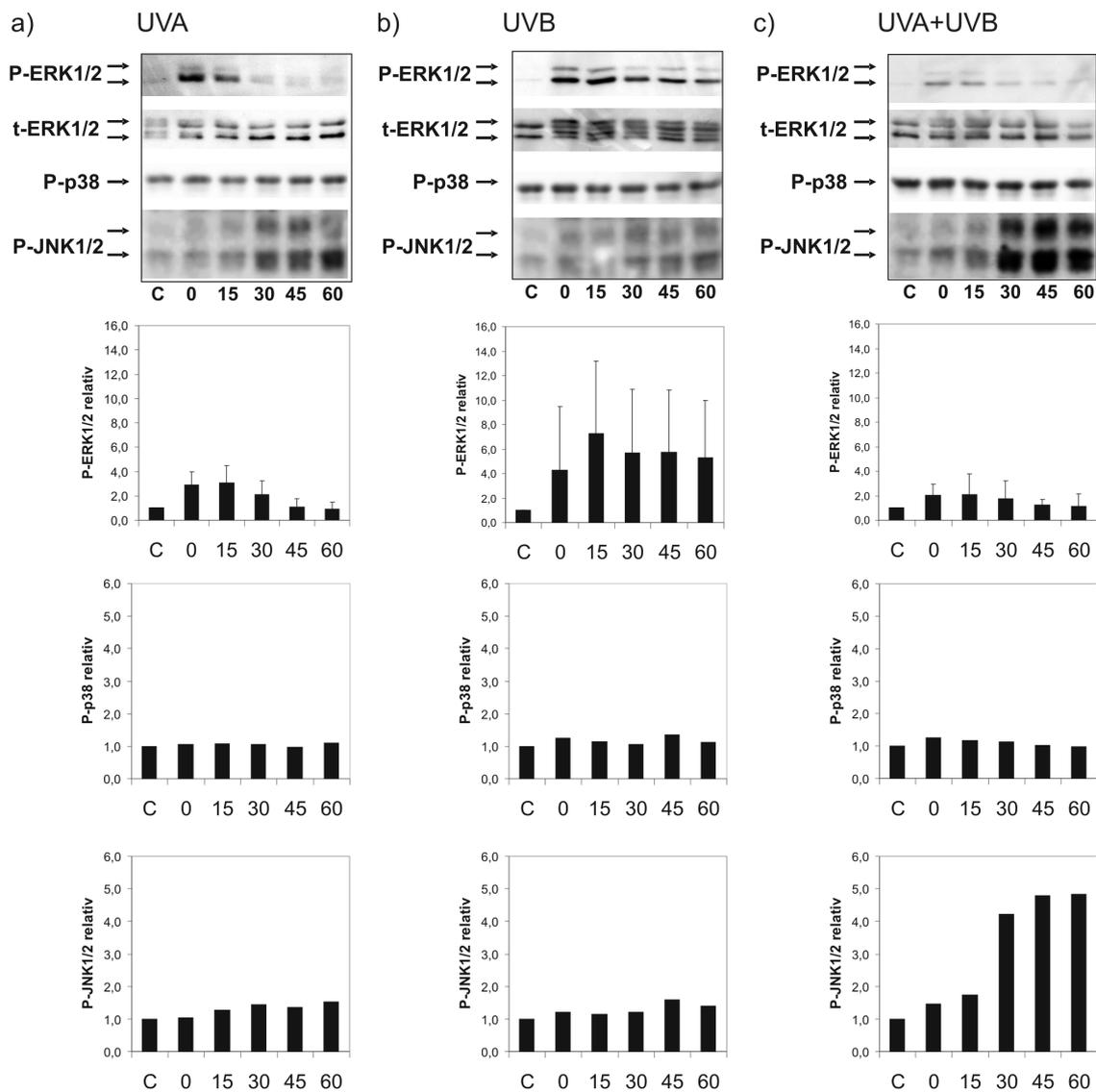


Abbildung 3.3: Durch UVA, UVB und Kombinationsbestrahlungen mit UVA + UVB induzierte Aktivierung der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 in Fibroblasten. Analyse des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2, p38 und JNK1/2 im Western-Blot. a) Bestrahlung der Zellen mit UVA b) Bestrahlung der Zellen mit UVB c) Bestrahlung der Zellen mit UVA + UVB Gezeigt sind Western-Blots mit phosphospezifischen Antikörpern für P-ERK1/2, P-p38 und P-JNK1/2. t-ERK1/2 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung innerhalb der ersten Stunde nach der Bestrahlung. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosen: a) UVA 30 J/cm², b) UVB 100 J/m², c) UVA 30 J/cm² + UVB 100 J/m². Unterhalb der Western-Blots: densitometrische Auswertung von weiteren Experimenten unter Normalisierung auf den Phosphorylierungsgrad der Kontrolle C und Berücksichtigung der Ladekontrollen. Y-Achse: relative Signalintensität, X-Achse: Zeit nach Bestrahlung in min. n = 3 für P-ERK1/2, Fehlerbalken sind Standardabweichungen, n = 2 für P-p38 und P-JNK1/2 jeweils bei Verwendung von Zelllinien unterschiedlicher Spender.

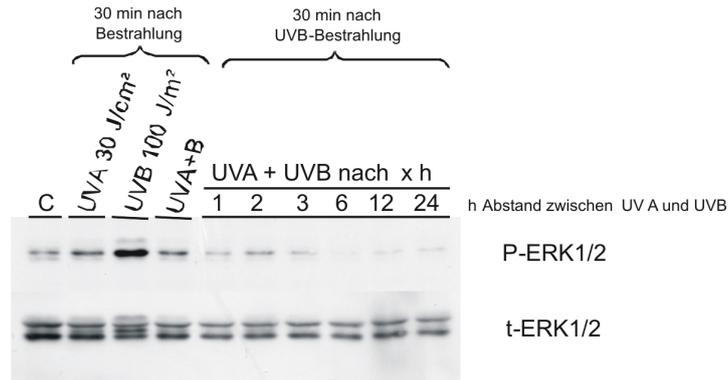


Abbildung 3.4: Refraktionszeit der UVB-induzierten Aktivierung von ERK1/2 nach vorausgehender Bestrahlung mit UVA in humanen dermalen Fibroblasten. Analyse des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 im Western-Blot. Gezeigt sind Western-Blots mit phosphospezifischen Antikörpern für P-ERK1/2, der Nachweis von t-ERK1/2 dient als Ladekontrolle. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosen: UVA 30 J/cm², UVB 100 J/m², UVA 30 J/cm² + UVB 100 J/m². n = 2, bei Verwendung von Zelllinien unterschiedlicher Spender.

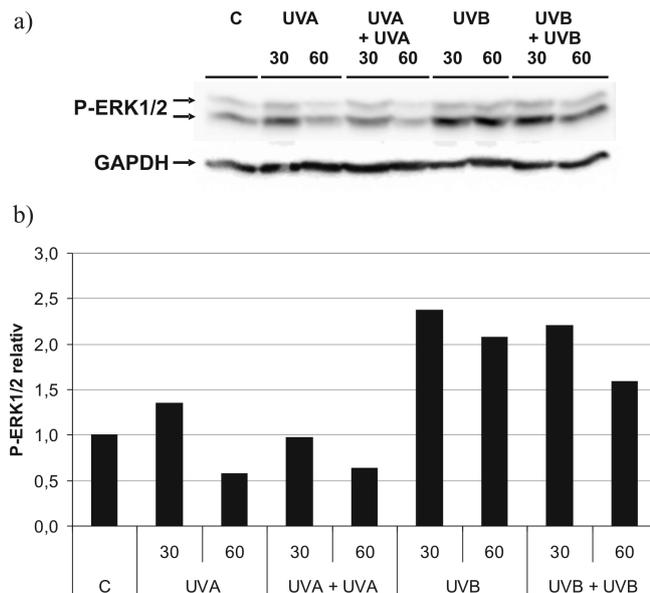


Abbildung 3.5: Aktivierung von ERK1/2 nach Bestrahlungssequenzen mit UVA und UVA sowie UVB und UVB. Analyse des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 im Western-Blot. a) Analyse des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 im Western-Blot. Gezeigt sind Western-Blots mit phosphospezifischen Antikörpern für P-ERK1/2, der Nachweis von GAPDH dient als Ladekontrolle. b) Desitometrische Auswertung des in a) gezeigten Western-Blots. Die Lyse der Zellen erfolgte pro Bestrahlungsmethode zu den Zeitpunkten 30 und 60 min nach Bestrahlung. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosen: UVA 30 J/cm², UVA 15 J/cm² + UVA 15 J/cm², UVB 100 J/m², UVB 50 J/m² + UVB 50 J/m². Die Doppelbestrahlungen mit je einer zweimaligen Dosis UVA und UVB erfolgten in etwa 1 min Abstand. n = 2, bei Verwendung von Zelllinien unterschiedlicher Spender.

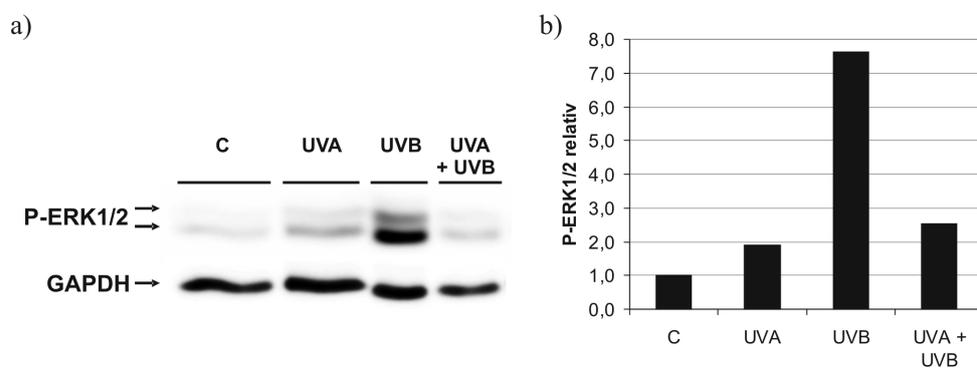


Abbildung 3.6: Durch UVA, UVB und Kombinationsbestrahlungen mit UVA + UVB induzierte Aktivierung von ERK1/2 24 h nach Bestrahlung. a) Analyse des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2 im Western-Blot. Gezeigt sind Western-Blots mit phosphospezifischen Antikörpern für P-ERK1/2, der Nachweis von GAPDH dient als Ladekontrolle. b) Desitometrische Auswertung des in a) gezeigten Western-Blots. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosen: UVA 30 J/cm², UVB 100 J/m², UVA 30 J/cm² + UVB 100 J/m². Die Lyse der Zellen erfolgte 24 h nach Bestrahlung. n = 2, bei Verwendung von Zelllinien unterschiedlicher Spender.

3.3 C₂-Ceramid als Mediator UVA-induzierter Signaltransduktion

Nach den in Kapitel 3.1 und 3.2 gezeigten Ergebnissen stellte sich die Frage nach den molekularen Mechanismen des Crosstalks zwischen UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion. Eine Möglichkeit der Wechselwirkung zwischen UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion könnte die durch UVA induzierte Ausschüttung von Ceramiden aus der Zellmembran sein. Die UVA-abhängige Freisetzung von C₂-Ceramid wurde von Grether-Beck *et al.* (2000) in Keratinozyten beobachtet. Ceramide sind bekannt als Aktivatoren von Phosphatasen (Law & Rossie, 1995). Eine Herabregulation der UVB-induzierten Aktivierung von ERK1/2 durch UVA-induzierte Prozesse wäre auf diesem Wege denkbar. Um die Wirkung von C₂-Ceramid auf die UVB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 zu testen, wurde der in Abbildung 3.7 dargestellte Versuch durchgeführt. Der Versuch vergleicht mit 30 μM C₂-Ceramid behandelte Keratinozyten mit UVB-bestrahlten Zellen und solchen, die 30 μM C₂-Ceramid ausgesetzt waren und mit 100 J/m² UVB bestrahlt wurden. Mit C₂-Ceramid behandelte Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung dem 30 μM C₂-Ceramid enthaltenden Medium ausgesetzt. Die Abbildung 3.7 stellt die MAPK-Aktivierung 1 h nach Bestrahlung dar. Die alleinige Behandlung mit C₂-Ceramid verursachte eine leichte

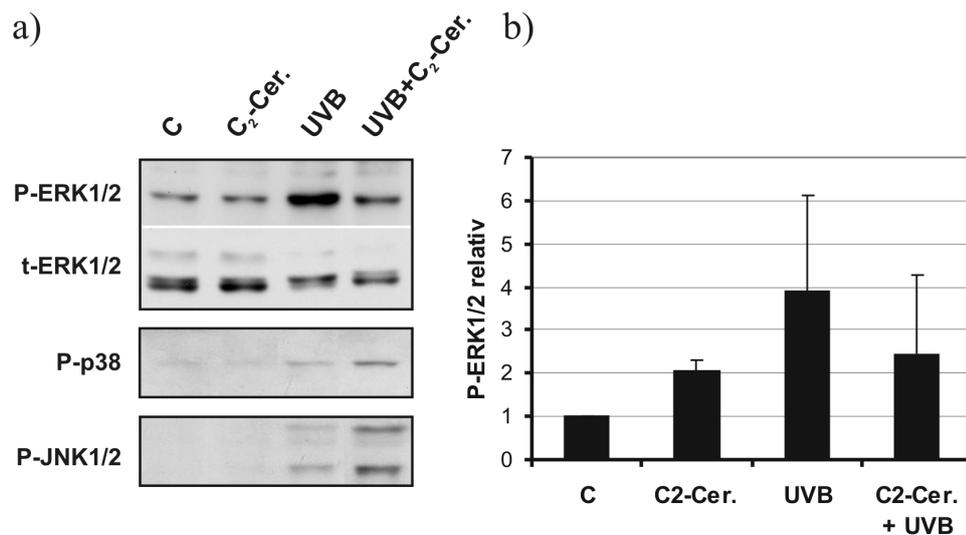


Abbildung 3.7: Wirkung von C₂-Ceramid auf UVB-induzierte Signaltransduktion auf Ebene der MAPKinasen in HNKs. a) Western-Blots mit phosphospezifischen Antikörpern für P-ERK1/2, P-p38 und P-JNK1/2 nacheinander durchgeführt auf der gleichen Membran. t-ERK1/2 dient als Ladekontrolle. Die Lyse der Zellen erfolgte 1 h nach Bestrahlung. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosis: UVB 100 J/m². C₂-Cer.: 30 μM C₂-Ceramid im Medium. n = 3 für P-ERK1/2, n = 2 für P-p38 und P-JNK1/2, bei Verwendung von Zelllinien verschiedener Spender. Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung auf das C₂-Ceramid enthaltende Medium umgestellt. Die Inkubationszeit nach Bestrahlung fand ebenfalls in diesem Medium statt.

b) Densitometrische Auswertung von drei unabhängigen, wie in a) gezeigten, Experimenten für P-ERK1/2. Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

ERK1/2-Aktivierung, während p38 und JNK1/2 unbeeinflusst blieben. 100 J/m^2 UVB wirkten, wie schon in Abbildung 3.1 gezeigt, stark aktivierend auf ERK1/2, aber nur minimal aktivitätssteigernd auf p38 und JNK1/2. Die Kombination von C_2 -Ceramid und Bestrahlung mit UVB senkte den Grad der Phosphorylierung von ERK1/2 etwa auf das Niveau der durch die alleinige Behandlung mit C_2 -Ceramid erreichten Phosphorylierung. Die Phosphorylierung von p38 und JNK1/2 wurde durch die Kombinationsbehandlung deutlich gesteigert. Damit entspricht das Bild des durch C_2 -Ceramid bewirkten Aktivierungsmusters auf Ebene der MAPKinasen ERK1/2, p38 und JNK1/2 exakt dem durch 30 J/cm^2 UVA hervorgerufenen.

3.4 Toxizität der eingesetzten UV-Dosen

Sowohl Apoptose als auch Nekrose können in Folge einer UV-Bestrahlung mit bestimmten Dosen auftreten. Um sicher zu stellen, dass die beschriebenen Signaltransduktionseffekte nicht auf der toxischen Wirkung der verschiedenen Bestrahlungen beruhte, wurde in den Experimenten der Abbildungen 3.8 und 3.9 die Toxizität der eingesetzten UV-Dosen überprüft.

Der MTT-Assay ist eine Methode zur Quantifizierung der Viabilität lebender Zellen. Er beruht auf der Reduktion eines Tetrazoliumsalzes an der Membran intakter Mitochondrien (Berridge *et al.*, 2005). Es entsteht ein Produkt, dessen Hauptbestandteil ein Formazanring ist. Dieses Ringssystem ist in Lösung intensiv gefärbt und colorimetrisch bestimmbar. Der MTT-Assay ist somit ein Nachweis für mitochondriale Aktivität. Abbildung 3.8 zeigt ein Experiment in dem der MTT-Assay zur Bestimmung der mitochondrialen Aktivität von Fibroblasten 24 h nach Bestrahlung genutzt wurde. Die Färbung unbehandelter Zellen (C) wurde 100 % Viabilität gleichgesetzt. Eine Bestrahlung mit 30 J/cm^2 UVA ergab keine Veränderung der Viabilität im Vergleich zur Kontrolle. Bestrahlungen mit 100 J/m^2 UVB und der Kombination von 30 J/cm^2 UVA und 100 J/m^2 UVB ergaben eine Reduzierung der Viabilität um ca. 20 %.

Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass im MTT-Assay lediglich die Stoffwechsellaktivität in Form der mitochondrialen Aktivität bestimmt wird. Eine Aussage über das längerfristige Überleben der Zellpopulation kann mit dieser Technik nicht getroffen werden. Dies ist nur möglich durch die Bestimmung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation. Eine solche Bestimmung ist mittels Färbung der Zellen durch Propidiumiodid (PI) und mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC markierten Protein Annexin V möglich. Annexin V ist ein Phospholipide bindendes Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin (PS). PS ist ein Phospholipid der Zellmembran welches im Laufe des Prozesses der Apoptose von der Innenseite der Membran auf die Außenseite klappt und dadurch von außen zugänglich wird. Früh- und spätapoptotische Zellen lassen sich durch diese Bindung an markiertes Annexin V anfärben. PI ist ein nicht membrangängiger Fluoreszenzfarbstoff, der nicht in der Lage ist, in eine intakte Zelle einzudringen. Nekrotische und spätapoptotische Zellen weisen jedoch eine löchrige Zellmembran auf, dadurch wird die DNS der Zellen für PI zugänglich, PI interkaliert in die doppelsträngige DNS und verursacht eine Färbung dieser Zellen (Zur Übersicht: Vermees *et al.* (1995)). Diese Doppelfärbung lässt sich durch Analyse im FACS für jede Zelle einer Population zeigen.

Abbildung 3.9 a) bis d) zeigt eine Doppelfärbung mit PI und Annexin V-FITC von Fibroblasten 24 h nach UV-Bestrahlung. Die Y-Achsen zeigen auf logarithmischer Skala die Intensität der PI-Färbung, die X-Achsen die Intensität der Annexin V-FITC-Färbung. Jeder Punkt entspricht einer Zelle, wobei jeweils 2000 zufällig gewählte Zellen von 20.000 aufgenommenen Zellen dargestellt sind. Der untere linke Quadrant beinhaltet die zweifach negative Zellen, diese Zellen sind intakt. Der obere linke Quadrant zeigt die für PI positiven Zellen, diese Zellen sind nekrotisch. Im oberen rechten Quadranten befinden sich doppelt positive, also spät apoptotische Zellen. Die früh apoptotischen Zellen sind nur für Annexin V-FITC positiv und befinden sich im unteren rechten Quadranten. Durch Bestimmung der Zellzahlen in den Quadranten kann der jeweilige prozentuale Anteil der verschiedenen Unterpopulationen an der Gesamtpopulation bestimmt werden. Dies ist in Abbildung 3.9 e) gezeigt, dort ist der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen als Summe von Annexin V-FITC positiven und der für Annexin V-FITC und PI positiven, also der früh- und der spätapoptotischen Zellen, gezeigt. Die Kontrollzellen beinhalten etwa 10 % apoptotische Zellen. Die Bestrahlung mit 30 J/cm^2 UVA erhöhte diesen Wert nicht signifikant. Bestrahlungen mit 100 J/m^2 UVB und einer Kombination aus 30 J/cm^2 UVA und 100 J/m^2 UVB verursachten 20 bis 25 % apoptotische Zellen. Diese Werte korrelierten gut mit den Daten des MTT-Assays aus Abbildung 3.8. Bestrahlungen mit UVB oder einer Kombination, welche UVB enthält, sind offensichtlich schädlicher als die Bestrahlung mit UVA allein. Das Ausmaß der Toxizität scheint durch die UVB-Dosis bestimmt zu sein. Es ist keine Korrelation mit dem auf Ebene der MAPKinasen zu beobachteten Signaltransduktionseffekten zu beobachten. Hier löste die Kombination von UVA und UVB immer ein von der alleinigen UVB-Bestrahlung verschiedenes Muster aus.

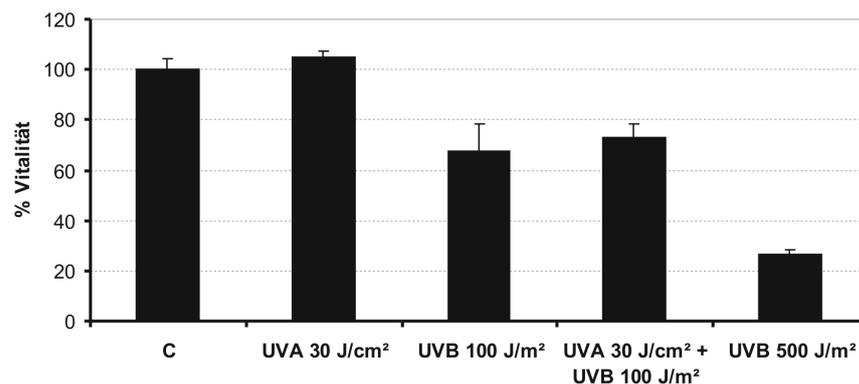


Abbildung 3.8: MTT-Assay als Viabilitätstest nach UV-Bestrahlung. MTT-Assay bestrahlter Fibroblasten 24 h nach Behandlung. Mittelwert unbestrahlter Zellen wurde auf 100 % normiert. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosen: UVA: 30 J/cm^2 , UVB: 100 J/m^2 , UVA+B: UVA 30 J/cm^2 + UVB 100 J/m^2 , UVB: 500 J/m^2 als Positivkontrolle. Gezeigt ist ein Experiment von zweien mit Zelllinien unterschiedlicher Spender. Fehlerbalken: Standardabweichung innerhalb eines Experimentes mit je vier Messwerten pro Behandlung.

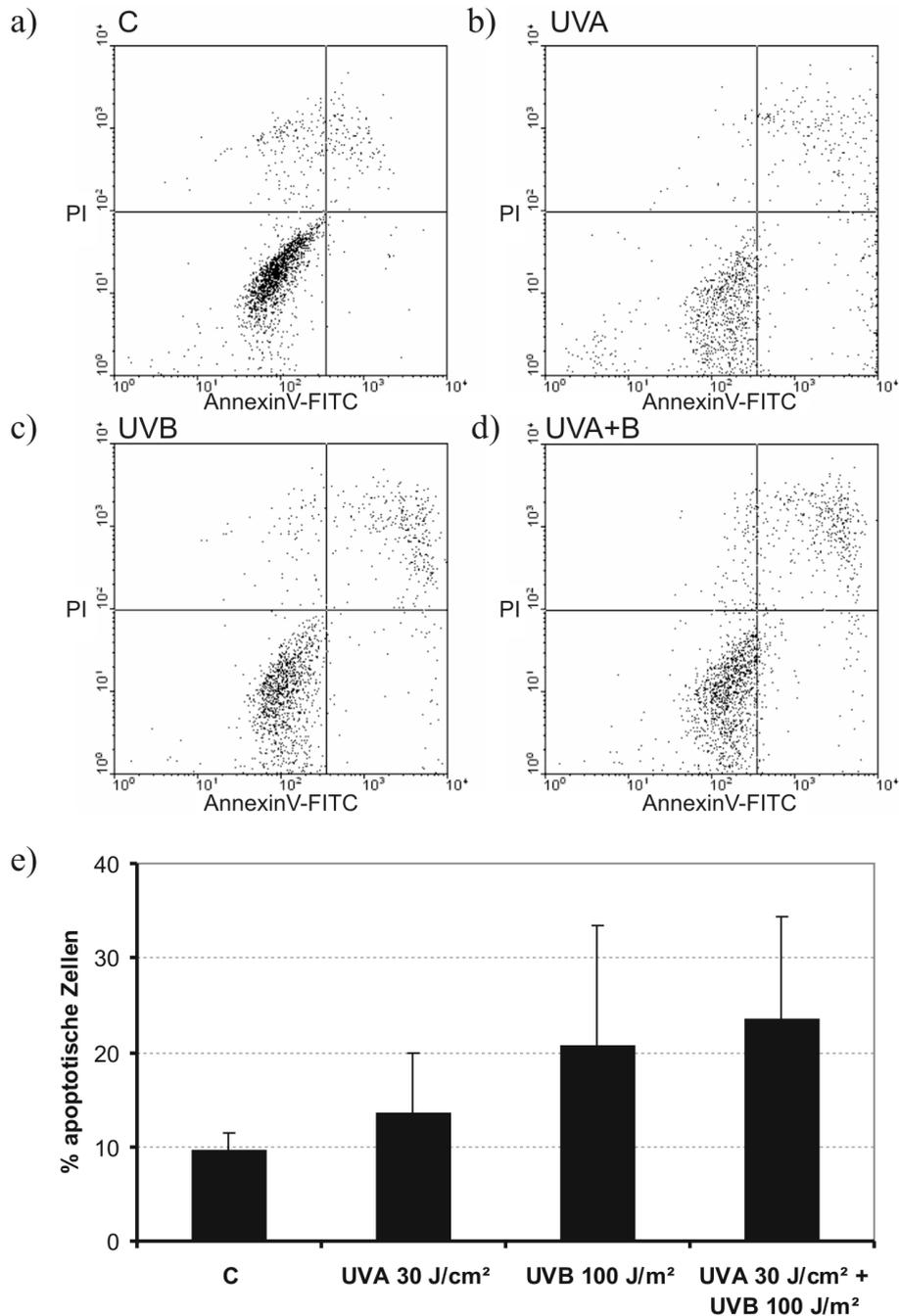


Abbildung 3.9: Apoptose in Fibroblasten 24 h nach UV-Bestrahlung. a) - d) Bestimmung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen 24 h nach Bestrahlung. Färbung mit Propidiumiodid (PI), AnnexinV-FITC-Antikörper. Oberer rechter Quadrant: PI- und FITC-positive Zellen (spät apoptotische Zellen). Unterer rechter Quadrant: FITC-positive Zellen (apoptotische Zellen). Unterer linker Quadrant: doppelt negative Zellen (nicht apoptotische Zellen). Oberer linker Quadrant: PI-positive Zellen (nekrotische Zellen). a) C: unbestrahlte Zellen. b) UVA: 30 J/cm². c) UVB: 100 J/m². d) UVA+B: UVA 30 J/cm² + UVB 100 J/m². e) Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten mit Zelllinien unterschiedlicher Spender. Auf der Y-Achse sind dargestellt % FITC-positiver Zellen + % FITC- und PI-positiver Zellen als Summe aller apoptotischen Zellen. Fehlerbalken: Standardabweichung bei n = 3.

3.5 Einfluss UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion auf die MMP1-Expression in vitro

UVA und UVB sind als ein starke Induktoren der Expression von MMP1 in der Dermis bekannt (Wlaschek *et al.*, 1994). Auf der Suche nach biologisch relevanten Endpunkten des beschriebenen Crosstalks zwischen UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion lag es daher nahe zu untersuchen, ob die durch UVA und UVB induzierte Expression von MMP1 durch diesen Crosstalk beeinflusst wird.

Die RT-PCR ermöglicht die relative Quantifizierung der MMP1-mRNS. Als Haushaltsgen dient hierbei die 18S-mRNS. Die Auswertung nach der $\Delta\Delta$ -CT-Methode ergibt ein relatives Maß für die auf die 18S-mRNS normierte Menge des Gehaltes an MMP1-mRNS. Diese Methode ist in Kapitel 2.9 beschrieben. In Abbildung ?? sind Beispiele für Rohdaten der RT-PCR und die Anwendung der $\Delta\Delta$ -CT-Methode gegeben.

In Abbildung 3.10 a) ist die dosisabhängige Induktion der MMP1-mRNS und die des MMP1-Inhibitors TIMP1 durch UVA-Dosen von 10 bis 30 J/cm² 24 h nach Bestrahlung dargestellt. Es ist notwendig die Veränderung der Menge von TIMP1-mRNS zu bestimmen, da eine parallel zu MMP1 erfolgende Regulation von TIMP1 eine enzymatische Aktivität von MMP1 verhindern würde. TIMP1 bleibt hier jedoch unbeeinflusst von der Bestrahlung mit UVA. Die Behandlung von mit 20 J/cm² UVA bestrahlten Zellen während der 24 h Inkubationszeit bis zur RNS-Präparation mit 10 μ M PD 98059 (2-Amino-3-Methoxyflavon) führt zu einer deutlichen Verringerung der MMP1-mRNS-Menge. PD 98059 ist ein membrangängiger Inhibitor von ERK1/2 (Dudley *et al.*, 1995). Da PD 98059 nur schlecht wasserlöslich ist, ist es erforderlich den Feststoff PD 98059 zunächst in DMSO zu lösen und dann das zum Erreichen der gewünschten Inhibitorkonzentration erforderliche Volumen dieser DMSO-Lösung zum Medium hinzuzugeben. Mit PD 98059 behandelte Zellen enthalten daher 0,05 % DMSO. Die Durchführung des identischen Ansatzes nur mit DMSO als Lösungsmittelkontrolle ist dadurch erforderlich. Es zeigt sich, dass mit 20 J/cm² UVA bestrahlte DMSO behandelte Zellen mit einer hohen Steigerung der MMP1-Expression reagieren.

Die Abbildungen 3.10 b) und c) zeigen den MMP1- und den TIMP1-mRNS-Gehalt 24 h nach der Bestrahlung mit 30 J/cm² UVA, 100 J/m² UVB und der Kombination von 30 J/cm² UVA + 100 J/m² UVB in primären Fibroblasten unterschiedlicher Spender. UVA verursachte in beiden Fällen wieder eine starke MMP1-Expression. Auch UVB verursachte diesen Effekt, allerdings weit weniger stark. Die Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB senkte die durch UVA hervorgerufene MMP1-Expression deutlich ab. Wie ausgeprägt dieser inhibitorische Effekt ist, scheint abhängig vom eingesetzten Spender zu sein.

In Abbildung 3.10 konnte die Regulation der Transkription des MMP1-Gens gezeigt werden. Nicht bewiesen ist damit jedoch die vollständige Translation, die Sekretion des Proteins in den extrazellulären Raum und die enzymatische Aktivität. Daher wurde mit Hilfe der Zymographie aktives MMP1 in den Zellkulturüberständen nachgewiesen. Bei dieser Technik werden die löslichen Proteine des Mediums stark konzentriert und durch SDS-Gelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die verwendete SDS-Page enthält dabei neben der üblichen Acrylamidmatrix 1 % Gelatine, welche wie Kollagen als Substrat für MMP1 geeignet ist (van Beurden & den Hoff, 2005). Nach der Auftrennung können die Proteine im Gel in mehreren Schritte renaturiert werden.

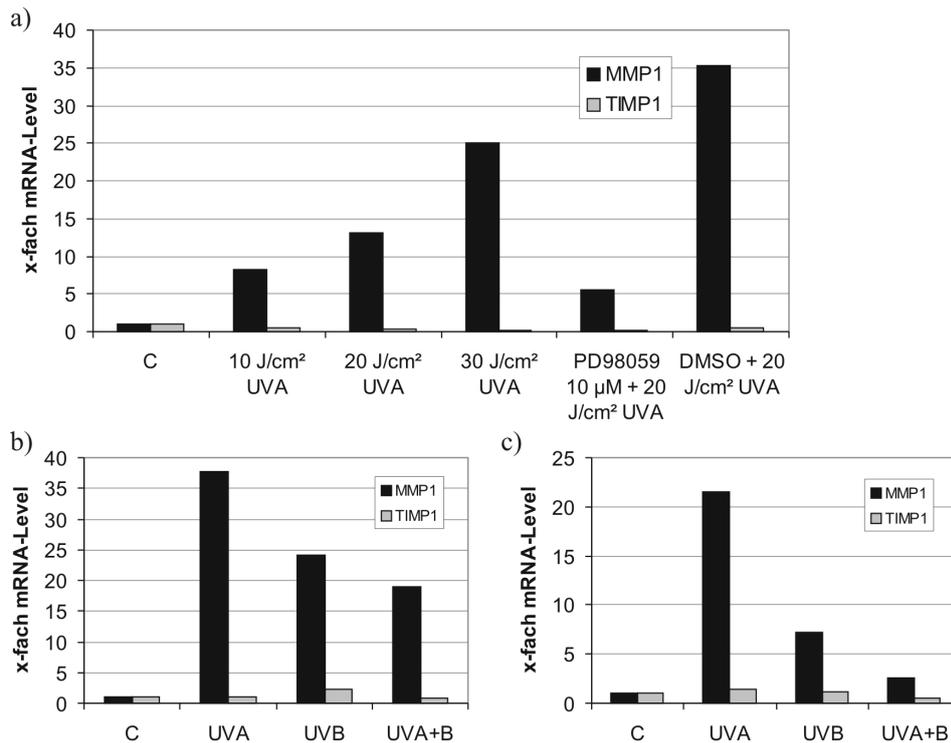


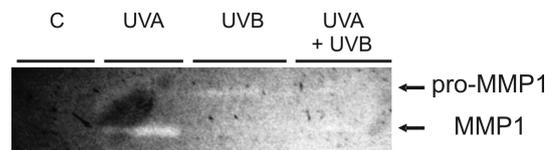
Abbildung 3.10: MMP1-Expression *in vitro* nach UV-Bestrahlung. Durch RT-PCR bestimmte relative mRNS-Mengen von MMP1 und TIMP1 24 h nach UV-Bestrahlung in primären Fibroblasten. Probeninterner Standard: 18S-RNS. mRNS-Mengen unbestrahlter Zellen (C) wurden als 1 definiert. a) Dosisabhängige Induktion von MMP1-mRNS durch UVA und die Wirkung des ERK1/2-Inhibitors PD98059. b) und c) Beispiele der Wirkung der Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB bei Fibroblasten verschiedener Spender. UV-Dosen: UVA: 30 J/cm², UVB: 100 J/m², UVA + UVB: UVA: 30 J/cm² + UVB: 100 J/m².

In einem geeigneten Puffersystem und unter Inkubation bei 37 °C kann MMP1 enzymatisch aktiv werden. Diese wird sichtbar nach der Comassie-Färbung des Gels in Form von weniger intensiv gefärbten Regionen auf der Höhe von MMP1. MMP1 liegt im extrazellulären Raum in zwei unterschiedlichen Formen vor, als MMP1 (45 kDa) und pro-MMP1 (55 kDa). Laut Varani *et al.* (2004) sind die beiden Proteine unter den eingesetzten Elektrophoresebedingungen bei 52 und 57 kDa zu detektieren. Beide Formen besitzen unter den gewählten Bedingungen katalytische Aktivität bezüglich des Abbaus von Gelatine.

Abbildung 3.11 zeigt eine Gelatinezymographie von Zellkulturüberständen 24 h zuvor bestrahlter Fibroblasten. Während in den Überständen der Kontrollzellen keine Enzymaktivität detektierbar war, zeigten die zuvor mit 30 J/cm² UVA bestrahlten Zellen eine deutliche Aktivität von MMP1. In den mit 100 J/m² UVB behandelten Zellen ist lediglich eine geringe Menge Aktivität von pro-MMP1 zu sehen. In der mit UVA und UVB behandelten Probe sind beide Formen MMP1 zu sehen, allerdings nur in minimalen Mengen.

Die starke Induktion der MMP1-mRNS durch UVA resultierte also in der Sekretion von gegenüber der Kontrolle hohen Mengen aktivem MMP1. Dies wurde durch die Kombination mit UVB weitgehend inhibiert.

Abbildung 3.11: Nachweis von aktivem MMP1 durch Zymographie. Zymogramm von konzentrierten Überständen aus der Kultur 24 h zuvor bestrahlter Fibroblasten. C: unbestrahlte Zellen. UV-Dosen: UVA: 30 J/cm², UVB: 100 J/m², UVA+UVB: UVA 30 J/cm² + UVB 100 J/m². Der Ausschitt zeigt das mit Comassie G250 gefärbte SDS-Gel im Bereich von 50 bis 65 kDa.



3.6 Einfluss UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion auf die MMP1-Expression *in vivo*

Zur Überprüfung, ob die in Kapitel 3.5 auf *in vitro*-Daten beruhenden Beobachtungen auch die Situation *in vivo* widerspiegeln, wurde eine *in vivo*-Studie mit drei männlichen Probanden durchgeführt. Zunächst wurde bei jedem Probanden die individuelle MED für UVA und UVB durch anfertigen einer Lichttreppe bestimmt. Die Bestrahlung erfolgte in drei markierten Felden des Gesäßes mit den bereits *in vitro* eingesetzten UV-Dosen. Diese Dosen entsprachen bei den Probanden einer 0,5 bis 1,3-fachen MED. 24 h später wurden in den drei bestrahlten und einem unbestrahlten Feld Hautbiopsien mit einem Durchmesser von 4 mm entnommen. Aus diesen Biopsien wurde die Gesamt-RNS präpariert und durch RT-PCR die Mengen an MMP1-mRNS und TIMP1-mRNS im Verhältnis zur Kontrolle bestimmt. Die hierbei gewonnenen Daten sind in Abbildung 3.12 zusammengestellt. Bezüglich der MMP1-m-RNS zeigte sich bei allen drei Probanden ein ähnliches Bild wie in den in Abbildung 3.10 dargestellten *in vitro*-Daten, d.h. eine starke Induktion durch UVA und ein deutlich niedrigerer Effekt durch UVB. Der durch die Kombinationsbestrahlung hervorgerufene inhibitorische Effekt ist nicht ganz so stark ausgeprägt wie *in vitro*, dennoch ist die Induktion der MMP1-mRNS immer unter dem Niveau der Induktion von UVA oder auf dem Niveau von UVB. Der entscheidende Unterschied zur Situation *in vitro* ist jedoch die Regulation von TIMP1. Eine Regulation von TIMP1 konnte *in vitro* nicht beobachtet werden, ist jedoch bei allen drei Probanden detektierbar. Ein eindeutiger Trend, welche Strahlungsart eine Induktion von TIMP1 auslöst, ist nicht feststellbar. Entscheidend für eine Aktivität von MMP1 in der extrazellulären Matrix *in vivo* ist das Verhältnis der Expression von MMP1 zum Inhibitor TIMP1. Auf der rechten Seite der Abbildungen 3.12 a) bis c) ist daher das Verhältnis der Induktion von MMP1-mRNS zu TIMP1-mRNS dargestellt. Diese Darstellung zeigt deutlich, dass UVA das Verhältnis von MMP1-mRNS zu TIMP1-mRNS zugunsten der MMP1-mRNS verschiebt, während die Ratio MMP1-mRNS

3 Ergebnisse

zu TIMP1-mRNS nach Bestrahlung mit UVB kleiner war. Nach Kombinationsbestrahlung ist dieser Faktor kleiner oder ähnlich hoch wie nach Bestrahlung mit UVB. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es auch *in vivo* betreffend der enzymatischen Aktivität von MMP1 zu einer ähnlichen Situation wie *in vitro* kommt.

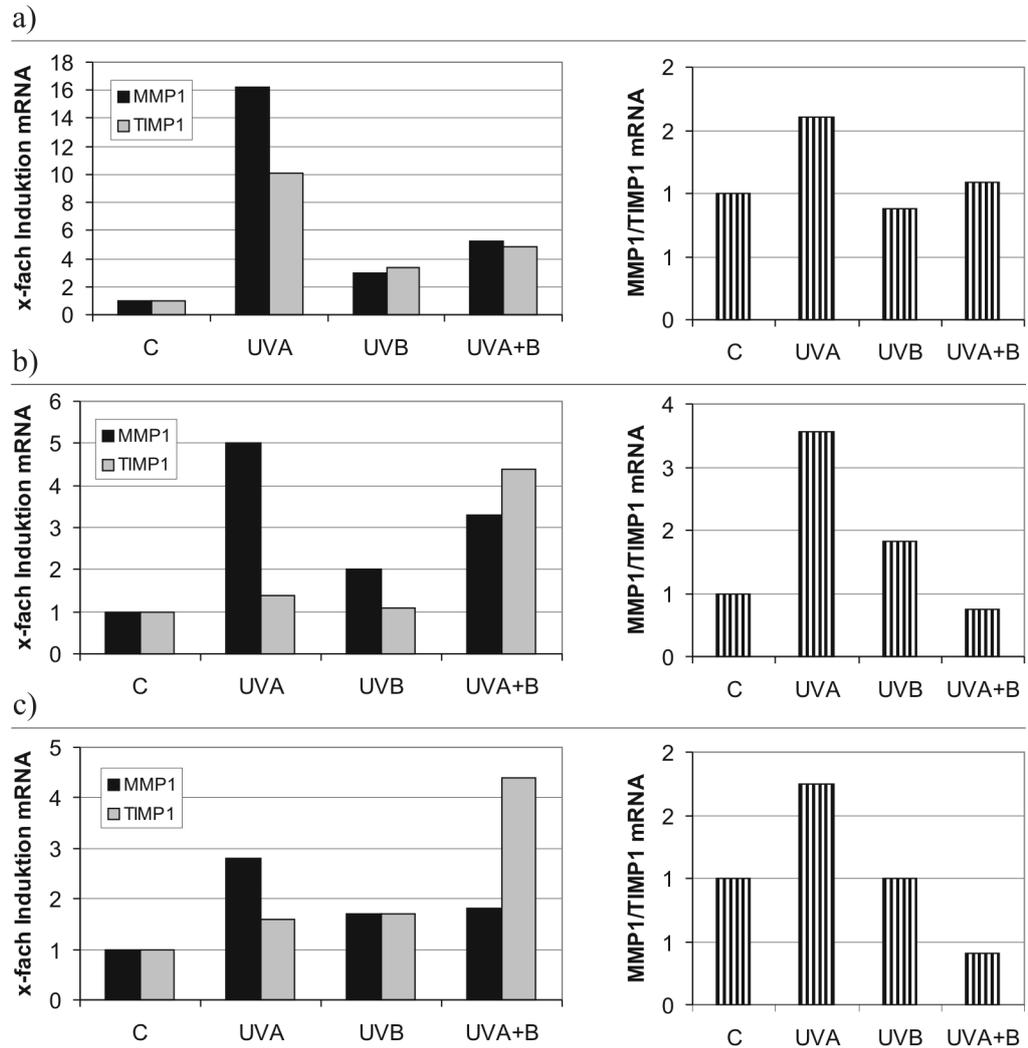


Abbildung 3.12: MMP1-Expression *in vivo* nach UV-Bestrahlung. Durch RT-PCR bestimmte relative mRNA-Mengen von MMP1 und TIMP1 24 h nach UV-Bestrahlung. Probeninterner Standard: 18S-RNS. mRNA-Mengen der Kontrolle wurden als 1 definiert. Auf der linken Seite sind jeweils die mRNA-Mengen von MMP1-mRNA und TIMP1-mRNA im Vergleich dargestellt. Rechts davon ist das Verhältnis von MMP1- zu TIMP1-mRNA des jeweiligen Datensatzes dargestellt. UV-Dosen: UVA: 30 J/cm², UVB: 100 J/m², UVA + UVB: UVA: 30 J/cm² + UVB: 100 J/m². Die den Probanden applizierte Dosis ist je nach individueller Hautsensitivität verschieden. In Vorversuchen wurde durch eine Lichttreppe für jeden Probanden die individuelle MED bestimmt, um sicher zu stellen, dass diese Dosen nicht einer mehrfachen MED entsprechen. a) Daten eines männlichen Probanden, 38 Jahre b) Daten eines männlichen Probanden, 23 Jahre c) Daten eines männlichen Probanden, 58 Jahre .

3.7 Durch UVA- und UVB-Strahlung induzierter Zellzyklusarrest

Seit langem ist bekannt, dass UV-Strahlung einen Zellzyklusarrest in den Zellen der menschlichen Haut über verschiedene Mechanismen zu induzieren vermag (Zur Übersicht: Hussein (2005)). Da diese Studien entweder mit UVA oder UVB allein durchgeführt wurden, sollte in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob die Kombination von UVA und UVB bezüglich Proliferation und Zellzyklusarrest eine andere Wirkung hat als sie sich bei der Untersuchung dieser Mechanismen mit UVA oder UVB alleine zeigt.

Die Färbung der doppelsträngigen DNS mit Propidiumiodid (PI) und die Aufzeichnung der PI-Fluoreszenz durch FACS (Fluorescence Associated Cell Sorting) ermöglicht eine exakte Bestimmung, in welcher Phase des Zellzyklus sich eine Zelle einer Population gerade befindet. Im Histogramm der PI-Fluoreszenzintensität erscheinen bei einer bestimmten Fluoreszenzintensität die Zellen, welche sich gerade in der G₀/G₁-Phase befinden. Bei der doppelten Fluoreszenzintensität erscheinen aufgrund des doppelten DNS-Gehaltes die Zellen der G₂/M-Phase. Zellen die eine Fluoreszenzintensität zwischen diesen beiden Extremen aufweisen befinden sich in der S-Phase, ihr DNS-Gehalt liegt zwischen dem der G₀/G₁-Zellen und dem der G₂/M-Zellen. Die Fläche unter der die G₀/G₁-Zellen markierenden Kurve entspricht der Zahl der in dieser Zellzyklusphase befindlichen Zellen. Die prozentuale Verteilung der Zellen einer Population auf die verschiedenen Zellzyklusphasen lässt sich so ermitteln. Dieses Verfahren ist in Kapitel 2.5 beschrieben. Abbildung 2.3 zeigt ein Beispiel für ein solches Histogramm und die Auswertung der Rohdaten.

Mit den in Abbildung 3.13 gezeigten Experimenten sollte gezeigt werden, wie sich die Bestrahlung von Fibroblasten mit UVA, UVB und der Kombination von UVA und UVB auf deren Proliferationsverhalten auswirkt. Ausgangsmaterial hierfür waren zu etwa 40 % konfluente Fibroblasten, welche für 24 h ohne die im Kälberserum enthaltenen Wachstumsfaktoren kultiviert wurden. Durch die Abwesenheit von Wachstumsfaktoren stellen die Zellen die Teilung ein und verbleiben in einem G₀/G₁-Arrest. Diese Synchronisierung ist nahezu vollständig, d.h. über 95 % aller Zellen dieser Populationen befinden sich in einem G₀/G₁-Arrest. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit 30 J/cm² UVA, 100 J/m² UVB und der Kombination aus 30 J/cm² UVA + 100 J/m² UVB. Nach der Bestrahlung erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen in Medium mit 10 % FCS (fötales Kälberserum). Die für weitere Zellteilungen erforderlichen Wachstumsfaktoren waren ab dem Zeitpunkt 0 h nach Bestrahlung wieder vorhanden. Von diesem Zeitpunkt an wurde alle 12 h eine Zellzyklusanalyse durchgeführt, um den Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus zu dokumentieren. Als Maß für die erfolgte Proliferation zum Messzeitpunkt diente der prozentuale Anteil der Summe aller Zellen in S- und G₂/M-Phase von der Gesamtpopulation. 12 h nach der Bestrahlung befanden etwa 90 % aller bestrahlten Zellen noch im G₀/G₁-Arrest. Unbehandelte Zellen und mit UVA bestrahlte Zellen zeigten 24 h nach Bestrahlung einen hohen Anteil proliferierender Zellen. Mit UVB und der Kombination von UVA und UVB bestrahlte Zellen befanden sich zu diesem Zeitpunkt noch im Zellzyklusarrest. Diese Zellpopulationen steigern die Proliferation nur langsam. Nach 48 h befanden sich etwa 20 % in S- und G₂/M-Phase, nach 60 h über 30 %. Unbehandelte und UVA-bestrahlte Zellen proliferierten nach der ersten Teilung nicht mehr stark, zu den Zeitpunkten 48 und 60 h lag der Prozentsatz sich teilender Zellen bei ca. 10 %. Nach 72 h erhöhte sich der Anteil sich teilender Zellen noch einmal. Zu diesem Zeitpunkt war allerdings ein hoher

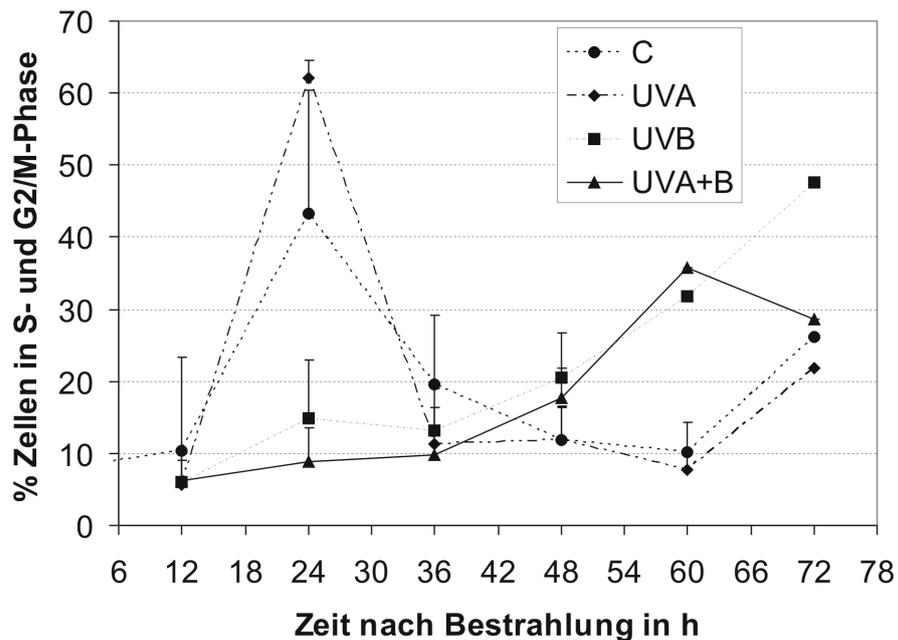


Abbildung 3.13: Proliferation von Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVA, UVB und UVA+B. Zusammenfassung einer Zellzyklusanalyse von UV-bestrahlten Fibroblasten über einen Zeitraum von 72 h nach Bestrahlung. Die Zellzyklusanalyse erfolgte durch Färbung der doppelsträngigen DNS mit Propidiumiodid und Aufzeichnen der DNS/Propidiumiodid-Histogramme im FACS. Auswertung der Histogramme und Bestimmung der prozentualen Anteile der verschiedenen Zellzyklusphasen erfolgte mit Hilfe der Fitsoftware ModFit LT. Als Maß für den Anteil proliferierender Zellen einer Population dient der prozentuale Anteil der Summe aller Zellen in S- und G2/M-Phase (Y-Achse). UV-Dosen: UVA: 30 J/cm², UVB: 100 J/m², UVA+B: UVA 30 J/cm² + UVB 100 J/m². C: unbestrahlte Zellen. Datenpunkte mit Standardabweichung sind Mittelwerte von n = 3, Datenpunkte ohne Standardabweichung sind Mittelwerte von n = 2. Verwendet wurden primäre, G0/G1-synchronisierte Fibroblasten verschiedener Spender .

Grad an Konfluenz in den Zellkulturschalen erreicht, vermutlich beeinflussten hier bereits Phänomene wie Kontaktinhibition das Wachstum der Zellen.

Eine Bestrahlung mit UVA verzögerte den Wiedereintritt G0/G1-synchronisierter in den Zellzyklus nur um einige Stunden. UVB und die Kombination von UVA und UVB verhielten sich vergleichbar und bewirkten eine Verlängerung des G0/G1-Arrests um über 24 h.

3.8 Regulation des durch UV-Strahlung induzierten Zellzyklusarrests durch Zyklin D1

Die Proliferation eukaryotischer Zellen unterliegt einer strikten Regulation. Diese Regulation wird durch verschiedene Kontrollpunkte im Zellzyklus ermöglicht. Einer dieser Kontrollpunkte ist der Übergang von Zellen der G1-Phase in die S-Phase. Während

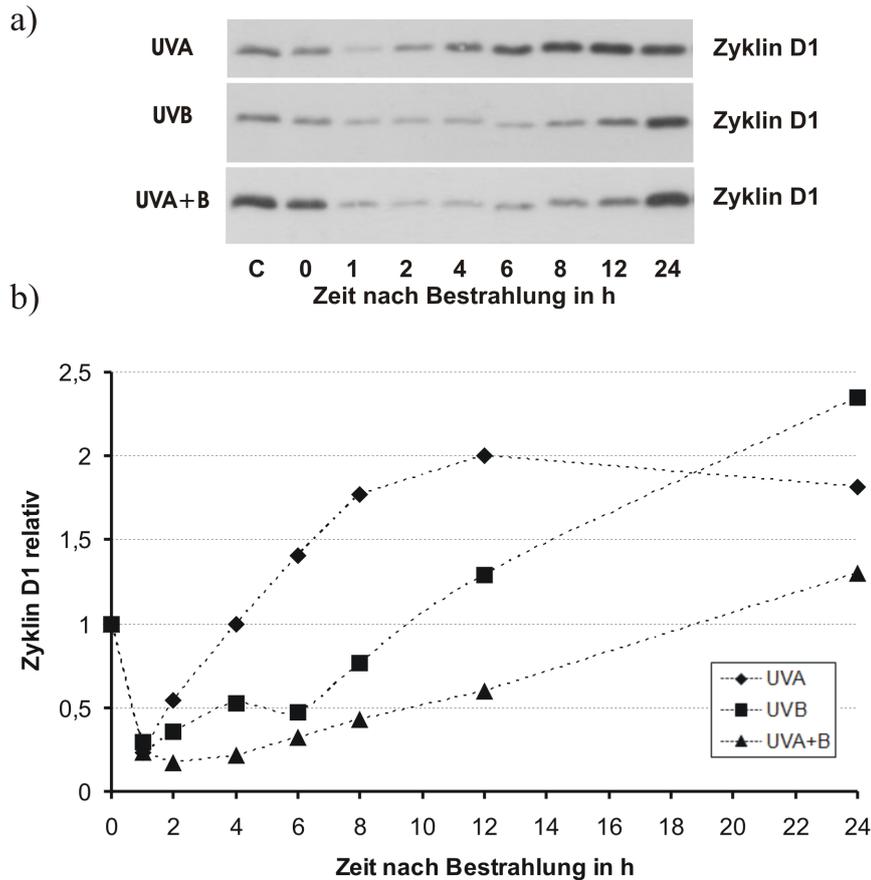


Abbildung 3.14: Zyklin D1 in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVA, UVB und UVA+B. a) Nachweis von Zyklin D1 im Western-Blot. Aufgetragen sind jeweils $20 \mu\text{g}$ Gesamtprotein aus Zelllysaten. UV-Dosen: UVA: $30 \text{ J}/\text{cm}^2$, UVB: $100 \text{ J}/\text{m}^2$, UVA+B: UVA $30 \text{ J}/\text{cm}^2$ + UVB $100 \text{ J}/\text{m}^2$. C: unbestrahlte Zellen zu Beginn der Zeitreihe. Die Lyse der Zellen erfolgte zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten. Zeitpunkt 0 h, bedeutet: unmittelbar nach Bestrahlung. b) Densitometrische Quantifizierung des Western-Blots aus a). $n = 3$, bei Verwendung von Zellen verschiedener Spender.

der G1-Phase liegen in der Zelle nur geringe Mengen des Zyklins D1 vor. Während des Überganges in die S-Phase steigt der Gehalt an Zyklin D1 stark an. Dieser Mechanismus wurde erstmals von Won *et al.* (1992) in humanen Fibroblasten beschrieben.

Hier wurde nun untersucht, ob die in Kapitel 3.7 und Abbildung 3.13 beschriebene Verschiebung des Zellzyklus nach Bestrahlung mit UVA, UVB oder der Kombination beider auf einer nach Bestrahlung veränderten Zyklin D1-Menge basiert. Das in Abbildung 3.14 dargestellte Experiment sollte dies überprüfen. Wie schon in Abbildung 3.13 sind G0/G1-synchronisierte Fibroblasten das Ausgangsmaterial, diese wurden zum Zeitpunkt 0 h bestrahlt und nach erfolgter Bestrahlung wieder in serumhaltigen Medium kultiviert. Im Western-Blot ist deutlich ein starker Abfall des Zyklin D1-Gehaltes nach Bestrahlung zu sehen, der bei allen drei Bestrahlungsarten nach einer Stunde etwa 80% beträgt. Bei den mit $30 \text{ J}/\text{cm}^2$ UVA bestrahlten Zellen stieg die Menge an Zyklin D1 schnell wieder

an und hatte nach 4 h wieder das Kontrollniveau erreicht. 12 h nach Bestrahlung hatte sich die Zyklin D1-Menge verdoppelt. Weniger schnell stieg die Menge an Zyklin D1 nach Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB an. Bis zum Erreichen der Kontrollniveaus vergingen hier etwa 10 h. Danach stieg auch hier die Zyklin D1-Menge auf mehr als das Doppelte des Wertes zum Zeitpunkt 0 h. Die am längsten anhaltende Absenkung der Zyklin D1-Menge verursachte die Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB, hier waren 16 bis 20 h nötig um das Ausgangsniveau wieder zu erreichen.

Die UV-Strahlung induzierte also eine Absenkung des Gehaltes an Zyklin D1. Bei Bestrahlung mit UVA war die Dauer dieses Effektes mit etwa 4 h relativ kurz, bei Bestrahlung mit UVB bereits doppelt so lang. Den stärksten Effekt hatte die Kombination von UVA und UVB. In allen drei Fällen kam es zu einem Wiederanstieg der Zyklin D1-Menge über das ursprüngliche Niveau hinaus. Obwohl sich in diesem Experiment die Auswirkungen von UVB und der Kombination von UVA und UVB stärker unterschieden als in der Zellzyklusanalyse aus Abbildung 3.13, korrelierten die beiden Abbildungen doch prinzipiell und die Beeinflussung der Zyklin D1-Menge durch UV-Strahlung erschien als Ursache für das bereits gezeigte Proliferationsverhalten aus Abbildung 3.13 wahrscheinlich.

3.9 Reparatur von durch UV-Strahlung induzierten DNS-Schäden

In Kapitel 1.4.3 wurde bereits erläutert, dass die Regulation des Zellzyklus eng an die DNS-Reparaturmechanismen gekoppelt ist, da es biologisch sinnvoll ist, die Replikation der Zelle nur mit einem unbeschädigten Genom zuzulassen. Die verschiedenen Kontrollpunkte des Zellzyklus bieten von der DNS-Reparatur abhängigen Signaltransduktionswegen die Möglichkeit einen Zellzyklusarrest einzuleiten. Wenn letztendlich UV-induzierte DNS-Schäden für den Abbau von Zyklin D1 und die Induktion eines Zellzyklusarrests verantwortlich sein sollten, so müsste sich das Ausmaß dieser Schäden mit den Daten zum Zellzyklusarrest aus den Abbildungen 3.13 und 3.14 korrelieren lassen.

Der Comet Assay ermöglicht die Quantifizierung UV-induzierter Einzel- und Doppelstrangbrüche. Die Grundlage ist hierbei die erhöhte Mobilität von geschädigter DNS während der Elektrophorese ganzer Zellkerne. Die aus dem Kern migrierte und mit Ethidiumbromid gefärbte DNS kann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Als Maß für die Mobilitätserhöhung, also DNS-Schädigung, lässt sich das sogenannte Tail Moment bestimmen. Exemplarische Rohdaten und das Prinzip der Berechnung des Tail Moments sind in Kapitel 2.8 und Abbildung 2.4 dargestellt.

In Abbildung 3.15 ist eine mit Hilfe des Comet Assays erstellte Kinetik der DNS-Reparatur von UV-bestrahlten Fibroblasten während der ersten Stunde nach Bestrahlung dargestellt. Der Zeitpunkt 0 min markiert dabei den technisch frühest möglichen Zeitpunkt der Fixierung der Zellen nach der Bestrahlung. In der Praxis waren dies etwa 3 min, weil die bestrahlten Zellen zunächst mit Trypsin behandelt, in Agarose eingebettet und die enzymatische Aktivität mit eiskaltem Lysispuffer gestoppt werden muss. Unbehandelte Zellen wiesen ein Tail Moment von ca. 0,4 auf. Die Bestrahlung mit 30 J/cm^2 UVA bewirkte keine deutliche Steigerung der DNS-Schädigung über das Niveau der Kontrollzellen. Bei Bestrahlung mit 100 J/m^2 UVB war ein deutlicher DNS-Schaden sichtbar. Das Tail Moment dieser Zellen lag während der ersten 40 min nach Bestrahlung etwa bei einem Wert

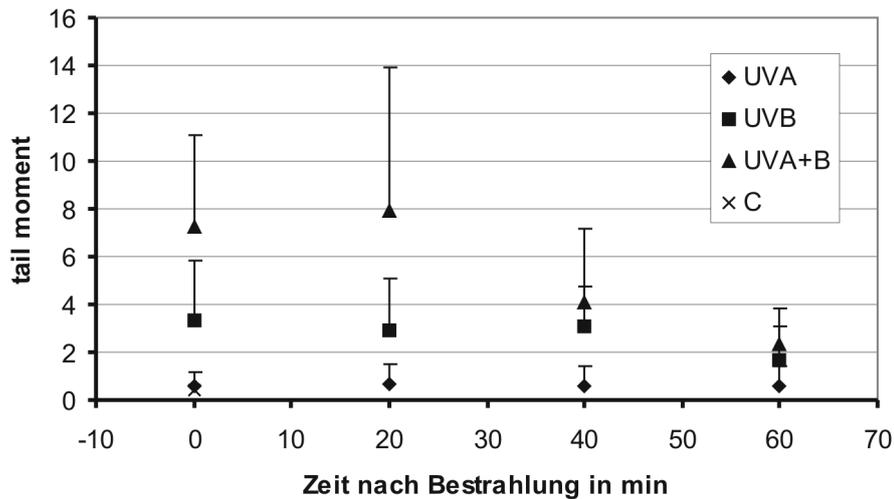


Abbildung 3.15: Reparaturkinetik von durch UV-Strahlung induzierten DNS-Schäden. Gezeigt ist die Auswertung eines Comet Assays von UV-bestrahlten Fibroblasten. Die Y-Achse zeigt in Form des Tail Moments das Ausmaß der DNS-Schäden in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen. UV-Dosen: UVA: 30 J/cm², UVB: 100 J/m², UVA+B: UVA 30 J/cm² + UVB 100 J/m². C: unbestrahlte Zellen zu Beginn der Zeitreihe. Zeitpunkt 0 min, bedeutet: unmittelbar nach Bestrahlung. Jeder Datenpunkt entspricht 50 zufällig von einem Objektträger gewählten Zellen. Fehlerbalken sind Standardabweichungen von 50 Zellen. Gezeigt ist ein exemplarisches Experiment von n = 2 bei Verwendung von Zelllinien verschiedener Spender.

von drei und sank danach wieder ab. Die Kombination von UVA und UVB verstärkte die die DNS schädigende Wirkung von UVB in synergistischer Weise. Bis zu 20 min nach Bestrahlung wurden Werte für das Tail Moment von ca. acht erreicht. Ab einem Zeitpunkt von 40 min nach Bestrahlung sank das Ausmaß der Schäden in ähnlicher Weise wie bei der Bestrahlung mit UVA. Nach einer Stunde war bei allen Bestrahlungsarten kein gegenüber der Kontrolle erhöhter DNS-Schaden mehr feststellbar. Das Ausmaß der beobachteten DNS-Schäden nach den verschiedenen Bestrahlungen korrelierte mit den in Abbildung 3.14 beobachteten Änderungen der Zyklin D1-Mengen der Zellen.

4 Diskussion

Die UV-induzierte Signaltransduktion und die dadurch hervorgerufenen Änderungen in der Genexpression sind in den vergangenen 20 Jahren Gegenstand intensiver Forschung gewesen. Die Summe der UV-induzierten Änderungen von Signaltransduktion und Genexpression werden als UV-Antwort bezeichnet. Diese UV-induzierte Antwort der Zelle ist deshalb von Interesse, weil bereits früh erkannt wurde, dass Signaltransduktion und Genexpression als Reaktion auf UV-induzierte Schädigung der DNS ein zentraler Mechanismus der UV-induzierten Kanzerogenese sein müssen (Setlow (1974) und Epstein (1978)). Mittlerweile sind viele verschiedene UVA- und UVB-spezifische UV-Antworten der Zelle auf Ebene von Signaltransduktion und Genexpression charakterisiert worden (zur Übersicht: Tyrrell (1996a); Tyrrell (1996b)).

Diese Arbeit zeigt erstmals, dass UVA- und UVB-spezifische Signaltransduktionsprozesse und Genexpression zwar existieren, aber die Kombination von UVA- und UVB-Strahlung eine dritte UV-induzierte Antwort der Zelle auslöst. Diese dritte UV-Antwort unterscheidet sich von den durch UVA und UVB allein ausgelösten Prozessen. Dies gilt sowohl für die Signaltransduktion auf Ebene der Aktivierung von MAPKinasen, als auch für die Genexpression.

4.1 Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion auf Ebene der MAPKinasen

Die Bestrahlung mit 30 J/cm^2 UVA löst sowohl in Keratinoyten als auch in Fibroblasten eine vorübergehende Aktivierung von ERK1/2 aus, während die Wirkung auf p38 und JNK1/2 nur minimal ist (Abb.: 3.1 und 3.3). Die Behandlung mit 100 J/m^2 UVB verursacht eine länger anhaltende Aktivierung von ERK1/2, während auch hier die Wirkung auf p38 und JNK1/2 nur minimal ist. Diese Aktivierung von ERK1/2 ohne Beeinflussung von p38 und JNK1/2 als Folge der Behandlung mit UVA wurde bereits von Yanase *et al.* (2001) für humane Melanozyten und von Kabuyama *et al.* (2001) für humane T Lymphozyten beschrieben. Die lang anhaltende Aktivierung von ERK1/2 durch UVB ist ebenfalls ein bereits beschriebenes Phänomen. Gezeigt werden konnte dies unter anderem von Iordanov *et al.* (2002) in humanen Keratinozyten. Allerdings wird in dieser und auch in anderen Arbeiten eine gleichzeitige Phosphorylierung von p38 und auch von JNK1/2 beobachtet (Nakamura *et al.* (2001) und Huang *et al.* (2000)). In den genannten Arbeiten werden UVB Dosen in einer Höhe von 250 bis 8000 J/m^2 eingesetzt. Die in dieser Arbeit eingesetzten 100 J/m^2 UVB lösen bereits bei 20 % der Zellen einen apoptotischen Tod aus (siehe Abb.: 3.9). Vor diesem Hintergrund erscheint es wahrscheinlich, dass die gleichzeitige Aktivierung von ERK1/2, p38 und JNK1/2 ein Phänomen ist, welches mit dem durch hohe UVB Dosen induzierten Zelltod einhergeht und somit der unspezifische Ausdruck einer massiven zellulären Stressreaktion ist.

In den Experimenten aus den Abbildungen 3.1 bis 3.3 wurde versucht, den UV-Anteil des natürlichen Sonnenlichts durch Kombination von 30 J/cm^2 UVA und 100 J/m^2 UVB nachzustellen. Es zeigt sich, dass auf Ebene der MAPKinasen die Antwort der Zellen auf diese Bestrahlung weder der durch UVA-induzierten, noch der durch UVB induzierten, entspricht. Vielmehr entsteht durch diese Behandlung eine dritte Art der UV-response, welche ein grundlegend anderes Aktivierungsmuster der MAPKinasen auslöst. Die durch UVB-induzierte starke Aktivierung von ERK1/2 wird durch vorherige Bestrahlung mit UVA wirkungsvoll inhibiert. Eine Reduktion UVB-induzierter Phosphorylierung von ERK1/2 wird experimentell *in vitro* und *in vivo* durch Kinaseinhibitoren erreicht. Solche Experimente hemmten nicht nur die MAPK-Aktivierung, sondern reduzierten auch die UV-induzierte Tumorentstehung *in vivo* (Abaseri *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass der Aktivierungsstatus von MAPK, wie ERK1/2, nicht nur kurzfristig das Proliferationsverhalten der Zelle reguliert, sondern auch für die Kanzerogenese von Bedeutung ist.

Die Aktivierung der MAPKinasen p38 und JNK1/2 verstärkt sich hingegen in synergistischer Weise bei Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB gegenüber der Bestrahlung mit UVA oder UVB allein. Dies gilt für Keratinozyten (Abb.: 3.2) und Fibroblasten (Abb.: 3.3) in gleicher Weise. Lediglich die Verstärkung der Aktivierung von p38 durch Kombination von UVA und UVB scheint in Fibroblasten nicht aufzutreten (Abb.: 3.3). Bezogen auf Keratinozyten sind diese Daten bereits in Schieke *et al.* (2005), einer Arbeit, die im Rahmen des hier vorgestellten Projektes entstand, veröffentlicht. Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass zwar wellenlängenspezifische Antworten der Zellen der Haut existieren, die jedoch physiologisch fragliche Relevanz haben, da die Signaleffekte der unterschiedlichen Wellenlängenbereiche miteinander wechselwirken. Diese Beobachtung ist neu und wurde auf Ebene der Signaltransduktion bislang noch nicht gemacht. Da die MAPKinasen verschiedene physiologische Prozesse, wie Proliferation und Apoptose steuern, ist diese hier gemachte Beobachtung grundlegend für das Verständnis der UV-induzierten Signaltransduktion und ihrer Konsequenzen in der Haut. Eine dieser Konsequenzen auf Ebene der Genregulation und Proteinexpression konnte mit der Regulation der MMP1-Expression gefunden werden (siehe Kapitel 4.3).

Aus technischen Gründen konnte die Bestrahlung mit der Kombination aus UVA und UVB nicht zeitgleich erfolgen, sondern musste als Bestrahlungsfolge von UVA und UVB durchgeführt werden. In Abbildung 3.2 wurde die Wirkung der Bestrahlungsreihenfolge UVA + UVB mit der Sequenz UVB + UVA verglichen. Da beide Vorgehensweisen das gleiche Ergebnis liefern, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den als Folge der Bestrahlung beobachteten Signaltransduktionsprozessen nicht um einen durch die Reihenfolge beeinflussten Prozess handelt. Trotzdem stellt sich die Frage, ob die gemachten Beobachtungen spezifisch für die Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion sind. Das in Abbildung 3.5 gezeigte Experiment testet die Wirkung von Bestrahlungssequenzen, die aus Folgen zweimaliger Bestrahlung mit jeweils 15 J/cm^2 UVA und 50 J/m^2 UVB bestehen, bezüglich der Phosphorylierung von ERK1/2. Da kein Unterschied zur einmaligen Bestrahlung mit 30 J/cm^2 UVA und 100 J/m^2 UVB besteht, kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Wechselwirkung spezifisch für die Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion ist.

Die Phosphorylierung von MAPKinasen als Folge UV-Exposition ist eine schnelle Reaktion, so konnte z.B. die Phosphorylierung von ERK1/2 nach UVA-Bestrahlung bereits nach einer Minute nachgewiesen werden (Kabuyama *et al.*, 2001) und kann bis zu 24 h andauern (Nakamura *et al.* (2001)). Eine Beeinflussung der Signaltransduktion über einen solchen

Zeitraum kann die Genexpression für mehrere Tage deutlich beeinflussen. In Abbildung 3.6 wird anhand der Phosphorylierung von ERK1/2 demonstriert, dass der inhibitorische Einfluss von UVA auf die UVB-induzierte ERK1/2-Aktivierung ebenfalls 24 h anhält. Dies lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass dieser inhibitorische Effekt auch Konsequenzen auf Genexpressionsebene hat.

Die densitometrischen Auswertung der Western blots der Abbildungen 3.1 bis 3.3 weisen eine relativ hohe Standardabweichung auf. Es ist zwar möglich die signifikante Absenkung der ERK1/2-Phosphorylierung nach Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB gegenüber der alleinigen Bestrahlung mit UVB mittels Student'schen t-Test zu zeigen, dies gilt jedoch nicht für alle Zeitpunkte der Kinetik und nur für die in Keratinozyten durchgeführten Experimente. Gleiches gilt für den Vergleich der Aktivierung von p38 und JNK1/2 nach Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB und der alleinigen Bestrahlung mit UVB. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die eingesetzten primären Zellen von verschiedenen Spendern stammen und damit genetisch verschieden sind. Bei der Sensitivität der Haut gegenüber UV-Strahlung gibt es genetisch bedingte große interindividuelle Unterschiede, welche sich beispielsweise durch das Auftreten von verschiedenen Hauttypen äußern. Diese Unterschiede im Ausmaß der UV-induzierten Effekte finden sich durch den Einsatz verschiedener Spender auch in den *in vitro* Experimenten wieder. Bei Einsatz einer Zelllinie wäre es sicherlich möglich häufiger statistisch signifikante Unterschiede in den durchgeführten Zeitreihen zu finden. Die Relevanz der gezeigten Daten für die Situation *in vivo* ist durch die Verwendung mehrerer Spender jedoch höher als es bei Einsatz lediglich einer Zelllinie der Fall wäre.

4.2 C₂-Ceramid als Mediator UVA-induzierter Signaltransduktion

Eine Möglichkeit der Regulation von aktivierten MAPKinasen ist deren Dephosphorylierung durch Phosphatasen. Auf Phosphorylierung basierende Signaltransduktionsprozesse sind also immer als Gleichgewicht zwischen phosphorylierenden Proteinkinasen und dephosphorylierenden Phosphatasen zu betrachten (zur Übersicht: Hunter (1995)). Die Phosphatasen unterteilen sich analog zu den Kinasen in Serin/Threonin Phosphatasen und Tyrosin Phosphatasen.

Von Bedeutung für die Regulation der Aktivität des ERK1/2-Weges ist die Proteinphosphatase-2A (PP2A). PP2A dephosphoryliert das aktivierende Phospho-Serin in MEK1/2, der ERK1/2 aktivierenden Kinase und reduziert dadurch die Phosphorylierung von ERK1/2 indirekt (Nakielny *et al.*, 1992). Außerdem vermag PP2A auch das für die Aktivierung ausschlaggebende Threonin-183 in ERK1/2 zu dephosphorylieren, was eine direkte Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad hat (Anderson *et al.*, 1990).

Ceramide sind als Aktivatoren verschiedener Phosphatasen bekannt. Sowohl kurzkettige Ceramide, wie zum Beispiel das C₂-Ceramid (Dobrowsky *et al.*, 1993) als auch längerkettige Ceramide (z.B. C₁₈-Ceramid) sind in der Lage die Aktivität von PP2A zu steigern (Chalfant *et al.*, 1999). Die Ausschüttung von diesen, als Second Messenger fungierenden Ceramiden aus der Zellmembran primärer Keratinozyten als Folge von UVA-Bestrahlung konnte von Grether-Beck *et al.* (2000) gezeigt werden. Diese Freisetzung von Ceramid erfolgt in einem nicht enzymatischen schnellen Prozess durch Hydrolyse von

Sphingomyelin. Erst im weiteren Verlauf der Reaktion auf UVA kommt es zur Neusynthese von Ceramid durch Ceramidsynthese. Mit 10 bis 50 μM C₂-Ceramid angereicherte Zellkulturmedien wirken sich inhibierend auf den EGFR-ERK1/2-Weg aus, auch wenn dieser mit EGF stimuliert wurde (Schieke *et al.*, 2004). Diese Daten legen nahe, dass die UVA-induzierte Freisetzung von Ceramid eine funktionelle Rolle in der Wechselwirkung zwischen UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion spielt. Diese These wurde in den in Abbildung 3.7 gezeigten Experimenten überprüft. Die Behandlung mit 30 μM C₂-Ceramid führt zum gleichen Aktivierungsmuster der MAPKinasen wie die Bestrahlung mit 30 J/cm² UVA (siehe Abb.: 3.7 und 3.1 a)). Die inhibitorische Wirkung von UVA auf die Aktivierung von ERK1/2, ausgelöst durch Bestrahlung mit UVB, lässt sich mit C₂-Ceramid mimikrieren. Auch die synergistische Verstärkung der Aktivierung von p38 und JNK1/2 wird deutlich sichtbar (siehe Abb.: 3.7 und 3.2 a)). Diese Beobachtungen legen nahe, dass es sich bei C₂-Ceramid um einen Mediator der UVA-induzierten Signaltransduktion handelt. Wenn durch UVA aus der Zellmembran freigesetzte oder neu synthetisierte Ceramide die Phosphatase PP2A aktivieren und diese einer länger anhaltenden Phosphorylierung von ERK1/2 entgegenwirkt, könnte dies der Mechanismus sein, durch welchen die UVA-Bestrahlung eine UVB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 inhibiert. Die in Abbildung 3.7 gezeigten Daten sprechen für dieses Modell. Die These, dass eine Aktivitätssteigerung von PP2A für die Dephosphorylierung von ERK1/2 verantwortlich ist, könnte durch die Bestimmung der Enzymaktivität von PP2A nach Behandlung mit C₂-Ceramid und den verschiedenen Bestrahlungen unterstützt werden.

Aus der Literatur sind auch Daten bekannt, welche alternative Mechanismen zu dem hier vorgestellten möglich erscheinen lassen. Maziere *et al.* (2003) stellten fest, dass durch UVA generierte ROS dosisabhängig zu einer Inhibierung des EGFR-ERK1/2-Weges führen. Es zeigte sich, dass UVA zwar zu einer kurzzeitigen und leichten Aktivierung von ERK1/2 führt, aber danach die Dimerisierung des EGFR und die Bindung von EGF inhibiert werden. Wenn die UVB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 vom EGFR ausgehen sollte, erscheint dieser Weg, als parallel zum auf der Ceramidfreisetzung basierenden Mechanismus, als möglich. Die Aktivierung und anschließende Internalisierung des EGFR durch UV-Strahlung ist ein zentraler Punkt der MAPK-Aktivierung. Gezeigt werden konnte dies durch Rosette & Karin (1996). Möglicher Weise geschieht diese Aktivierung jedoch für UVA und UVB auf unterschiedlichem Wege. Die durch UVA induzierte, ROS-abhängige, Aktivierung ist nach Maziere *et al.* (2003) nur eine transiente und könnte durch die gleichzeitige Freisetzung von Ceramiden in ihrer Wirkung zeitlich begrenzt sein. Die UVB-induzierte Aktivierung des EGFR könnte auf anderem Wege ablaufen. Wei *et al.* (1999) identifizierten die Aminosäure Tryptophan als ein mögliches Chromophor in der UVB-induzierten Signaltransduktion. Arbeiten von Fritsche *et al.* (2007) deuten darauf hin, dass zelluläres Tryptophan, UVB-abhängig, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu 6-Formylindolo[3,2-b]Carbazol (FICZ) dimerisiert. FICZ ist ein Ligand des Arylhydrocarbonrezeptors (AhR), dessen Aktivierung zur Bildung des Transkriptionsfaktors AP1 und zur verstärkten Expression von MMP1 führen kann (Murphy *et al.*, 2004). Fritsche *et al.* (2007) zeigten weiterhin, dass der durch FICZ aktivierte AhR seine Aktivierung auf den EGFR und damit den ERK1/2-Weg zu übertragen vermag. Dieser Prozess ist abhängig von der Kinase c-Src (Fritsche *et al.*, 2007), welche ein elementarer Bestandteil des aktivierten AhR-Komplexes ist (Enan & Matsumura, 1996). Diese Befunde werden unterstützt durch frühere Daten, welche belegen, dass die Bildung von AP1 aus Jun und Fos, was

als klassisches Ziel des EGFR-ERK1/2-Weges gilt, abhängig ist von c-Src (Devary *et al.*, 1992).

4.3 Die Expression von MMP1 unterliegt der Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion

In den vorhergehenden Kapiteln wurde die Wechselwirkung von UVA und UVB auf Signaltransduktionsebene beschrieben. Diese Prozesse finden alle auf Ebene der Signaltransduktion durch MAPKinasen statt und sagen noch nichts über mögliche Konsequenzen für die Genexpression aus. Im Folgenden wird diskutiert, auf welche Weise die Expression von MMP1 der Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion unterliegt.

Die erhöhte Expression von MMP1, induziert durch Exposition der Haut mit UVA, ist die Hauptursache für die strahlungsinduzierte vorzeitige Hautalterung (Wlaschek *et al.*, 1994). Das in Abbildung 3.10 a) eingesetzte *in vitro* Modell aus Fibroblasten bestätigt die Induzierbarkeit von MMP1 durch UVA. UVA verursacht 24 h nach der Bestrahlung eine dosisabhängige Induktion der MMP1-mRNS. Diese Induktion der MMP1-mRNS ist abhängig von der Aktivierung von ERK1/2 innerhalb der 24 h nach Bestrahlung. Die mit dem ERK1/2-Inhibitor PD98059 behandelten Zellen bilden nach Bestrahlung mit 20 J/cm² UVA über 60 % weniger MMP1-mRNS als die entsprechenden bestrahlten Zellen ohne den Inhibitor. Bei Bestrahlung des Mediums mit dem Lösungsmittel DMSO zeigt sich allerdings eine deutliche Steigerung der Menge an MMP1-mRNS über das Ausmaß der DMSO freien, bestrahlten Zellen hinaus. DMSO ist eine lichtempfindliche Substanz, möglicherweise kommt es unter Einfluss der Bestrahlung mit UVA zu einem radikalischen Zerfall von DMSO, was zur Entstehung weiterer ROS führen könnte. Laut Scharffetter-Kochanek *et al.* (1993) sind ROS eine Ursache der Induktion der MMP1-Expression. Vor diesem Hintergrund erscheint der in DMSO gelöste ERK1/2-Inhibitor PD98059 um so wirksamer, zumal er in einer niedrigen Konzentration (10 µM) eingesetzt wurde. PD98059 inhibiert nicht ERK1/2 direkt, sondern die ERK1/2 im EGFR-ERK1/2-Weg vorgeschaltete Kinasekinase MEK1 (Dudley *et al.*, 1995). Das Inhibitorexperiment zeigt also, dass eine über den EGFR-ERK1/2-Weg stattfindende Aktivierung von ERK1/2 notwendig ist, um eine Induktion der MMP1-mRNS-Expression auszulösen.

Auch UVB vermag die Expression von MMP1 *in vivo* zu induzieren (Brennan *et al.*, 2003). Die Abbildungen 3.10 b) und c) bestätigen dies. Die eingesetzte Dosis von 100 J/m² UVB ist bezogen auf die MMP1-Induktion allerdings weniger wirksam als 30 J/cm² UVA. Das hier eingesetzte Modell aus primären Fibroblasten verhält sich also bezüglich der Induzierbarkeit vom MMP1 durch UVA und UVB entsprechend der aus der Literatur bekannten Befunden. Versucht man allerdings das Verhältnis von UVA und UVB, wie es im Sonnenlicht enthalten ist, durch Kombination von UVA und UVB nachzustellen, zeigt sich, dass es nicht zu einer additiven Verstärkung der Induktion kommt, sondern, dass es zu einem inhibitorischen Effekt kommt. Die Induktion der MMP1-mRNS durch die Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB ist wesentlich geringer als die durch UVA oder UVB allein ausgelöste. Das Ausmaß dieser Reduktion der Induktion gegenüber der Induktion durch UVA allein beträgt je nach Spender zwischen 50 und 85 %. Eine Maß für diese

Reduktion in einer x-fachen mRNA-Menge anzugeben erscheint nicht sinnvoll, da die maximale Induzierbarkeit der MMP1-mRNA sehr stark vom Donor der eingesetzten Zellen abzuhängen scheint. Die Abbildungen 3.10 b) und c) zeigen lediglich zwei Beispiele für das Verhalten der Zellen zweier verschiedener Spender. Da die Sensitivität der Haut verschiedener Individuen gegenüber lichtinduzierten Prozessen je nach Hauttyp unterschiedlich ist, überrascht der Unterschied in der Induktion verschiedener Spenderzellen nicht. Allerdings ist dadurch das Zusammenfassen von Daten mehrerer genetisch verschiedener Spender nicht sinnvoll.

Es stellt sich die Frage, ob die Abnahme der MMP1-mRNA nach Bestrahlungen, die UVB enthalten, lediglich auf die toxische Wirkung der UVB-Strahlung zurückzuführen ist. Die toxische Wirkung der eingesetzten Strahlungsarten wurde mit den Experimenten der Abbildungen 3.8 (Viabilitätstest durch MTT-Färbung) und 3.9 (Bestimmung des Prozentsatzes apoptotischer Zellen durch Annexin V- und PI-Färbung) überprüft. Es zeigte sich zwar, dass die Folgen der Bestrahlungen mit UVB eine Reduktion der Stoffwechselaktivität und eine Steigerung des Anteiles apoptotischer Zellen zur Folge hat, aber mit UVB bestrahlte und solche die mit der Kombination von UVA und UVB bestrahlt wurden verhielten sich diesbezüglich immer in gleicher Weise. Die Behandlung mit UVB und auch die Kombination von UVA und UVB lösten eine 25 % Reduktion der Viabilität und eine Steigerung des Anteiles apoptotischer Zellen um etwa 10 % aus. Damit korreliert die toxische Wirkung der UV-Strahlung nicht mit dem Muster welches sie auf Ebene des MMP1-mRNA-Gehaltes auslöst, hier zeigt immer die Kombinationsbestrahlung den deutlich geringsten Gehalt an MMP1-mRNA. Für die Toxizität ist also die Dosis von 100 J/m^2 UVB von entscheidender Bedeutung, während die Konsequenzen auf Ebene der MMP1-mRNA-Regulation von der Wechselwirkung von UVA- und UVB-induzierten Prozessen abhängig sind. Da TIMP1 ein direkter Inhibitor von MMP1 ist, muss parallel zu den Expressionsänderungen von MMP1 auch die Induktion von TIMP1 bestimmt werden, um zu überprüfen ob sich diese Änderungen der Induktion der MMP1-mRNA auch tatsächlich in einer geänderten enzymatischen Aktivität vom MMP1 in der extrazellulären Matrix niederschlagen. In allen Experimenten der Abbildung 3.10 wurde daher auch die Induktion der TIMP1-mRNA bestimmt. Es ist deutlich ersichtlich, dass durch die verschiedenen Bestrahlungen keine Induktion von TIMP1 erfolgt. Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten. Zum Beispiel konnten Brenneisen *et al.* (1996) keine Induktion von TIMP1-mRNA nach UVB-Bestrahlung in Fibroblasten feststellen, obwohl UVB zu einer Induktion von MMP1 führte. Es ist also davon auszugehen, dass es *in vitro* auch auf Ebene der Enzymaktivität von MMP1 zu Änderungen kommt.

Die Expression von MMP1 ist überwiegend auf transkriptioneller Ebene reguliert (Mauch *et al.*, 1989). Dennoch ist es notwendig, die bereits diskutierten Effekte auf MMP1-mRNA-Ebene auch auf Konsequenzen auf Enzymaktivitätsebene im *in vitro* Modell zu überprüfen. Die Zymographie mit Gelatine als Substrat erlaubt den Nachweis von enzymatisch aktivem MMP1. In Abbildung 3.12 sind sowohl MMP1 als auch die unter physiologischen Bedingungen inaktive pro-Form von MMP1 zu erkennen. Dieses Phänomen wurde bereits von Varani *et al.* (2004) beschrieben. pro-MMP1 ist gegenüber MMP1 lediglich um ein Propeptid verlängert, besitzt aber das gleiche katalytische Zentrum wie MMP1. Dieses α -helikale Propeptid verdeckt laut der Röntgenstruktur das katalytische Zentrum des Enzyms (Nagase *et al.*, 2006). Bedingt durch die Denaturierung und anschließende schnelle Renaturierung im Verlauf der Zymographie (siehe Kapitel 2.10) kann diese Struktur anscheinend nicht wieder ausgebildet werden. Vermutlich sind deshalb sowohl

MMP1 als auch pro-MMP1 im Zymogramm sichtbar. Die Abbildung 3.12 zeigt exemplarisch ein Gelatinezymogramm von MMP1 welches aus Zellkulturüberstand aufkonzentriert wurde. Während in unbehandelten Zellen kein MMP1 nachweisbar ist, zeigen die Medien 24 h zuvor bestrahlter Zellen deutliche Aktivität von MMP1 und pro-MMP1. Die größte enzymatische Aktivität von MMP1 ist nach Bestrahlung mit UVA feststellbar. Die pro-Form tritt nach UVA-Bestrahlung nicht auf, möglicher Weise, weil nach der Bestrahlung mit UVA die pro-Form schnell in die aktive Form der MMP1 umgesetzt wird. Nach UVB-Bestrahlung und der Kombinationsbestrahlung sind schwache Banden pro-MMP1 detektierbar, aber nur sehr wenig MMP1. Mit diesem Befund entspricht das Ergebnis der Zymographie den aufgrund der RNS-Daten erwarteten Konsequenzen auf Proteinebene. UVB wirkt stark inhibierend auf die durch UVA ausgelöste Induktion von MMP1, dies gilt sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Ebene der Proteinexpression und Sekretion. Damit konnte gezeigt werden, dass Wechselwirkungen zwischen UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion Konsequenzen auf Ebene der Restrukturierung der extrazellulären Matrix haben.

Nach van Beurden & den Hoff (2005) ist die hier eingesetzte Methode der Zymographie mit anschließender Färbung mit Coomassie G250 nach Neuhoff *et al.* (1985) densitometrisch quantifizierbar. Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Zymogramme zeigten stets eine sehr geringe Signalintensität. Häufig waren die entfärbten Areale vor dem Hintergrund der Coomassiefärbung kaum zu identifizieren. Daher wurde auf eine densitometrische Auswertung verzichtet. Der Einsatz von Casein anstelle der hier verwendeten Gelatine bewirkt laut Fernandez-Resa *et al.* (1995) eine wesentlich verbesserte Nachweisgrenze auf wenig MMP. Bei ersten Versuchen konnte keine deutliche Verbesserung mit dieser Methode erzielt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Um in diesem Verfahren quantifizierbare Signale zu erhalten sind weitere Optimierungen notwendig.

Es stellt sich die Frage, ob die geschilderte Regulation der MMP1-Expression eine direkte Konsequenz der Aktivierung einer der drei dem Crosstalk der UVA- und UVB-induzierten Signaltransduktion unterliegenden MAPKinasen ist. Betrachtet man die Phosphorylierung der MAPKinasen nach den verschiedenen Bestrahlungen, stellt man fest, dass bei keiner Kinase die Aktivierung nach Bestrahlung mit der MMP1-Expression korreliert. Eine solche Korrelation wäre auch nicht zu erwarten gewesen, da ERK1/2, p38 und JNK1/2 an der Signaltransduktion verschiedenster Stimuli beteiligt sind. Es ist höchst unwahrscheinlich, dass eine einzelne MAPKinase für die Regulation eines Gens verantwortlich ist. Vielmehr ist es vermutlich die Kombination mehrerer Elemente verschiedener Signaltransduktionskaskaden, die in ihrer Kombination für Aktivierung eines Sets von Transkriptionsfaktoren, welches dann hoch spezifisch für die Transkription eines Gens ist, sorgt. Fest steht, dass die vorübergehende Aktivierung von ERK1/2 ein Teil dieses spezifischen Musters sein muss. Dies zeigt die Inhibition der MMP1-Expression in Präsenz der ERK1/2-Inhibitors PD98059. Es müssen aber weitere, hier noch nicht erfasste Faktoren beteiligt sein, da UVB zwar die mit Abstand höchste und am längsten anhaltende ERK1/2-Aktivierung auslöst, nicht aber die höchste MMP1 Expression. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression von MMP1 *in vitro* dem Crosstalk von UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion unterliegt, aber es kann aufgrund der bislang vorliegenden Daten nicht gesagt werden welche signalübertragenden Moleküle hieran beteiligt sind. Ein beteiligter Faktor muss jedoch die transiente Aktivierung von ERK1/2 sein.

Um zu untersuchen, ob die bereits beschriebenen *in vitro* gemachten Beobachtungen auch der tatsächlichen Situation *in vivo* entsprechen, wurde eine *in vivo* Studie mit menschlicher Gesäßhaut durchgeführt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 3.12 zusammengefasst. Bestrahlung mit UVA sorgt nach 24 h auch *in vivo* für eine deutliche Induktion der MMP1-mRNS. Dies ist bei allen drei *in vivo* Experimenten der Fall. Bestrahlungen mit UVB und der Kombination aus UVA und UVB erweisen sich als ebenfalls MMP1-mRNS induzierend. Die Faktoren der mRNS-Induktion sind hier jedoch kleiner als bei der alleinigen Bestrahlung mit UVA (Abb.: 3.12 a)-c) jeweils links). Es erscheint nicht sinnvoll genaue Faktoren der Induktion zu diskutieren, da *in vivo* im Unterschied zur Situation *in vitro* der Inhibitor von MMP1, TIMP1, einer starken Regulation unterliegt. Auch wenn für die Induktion von TIMP1-mRNS keine eindeutige Abhängigkeit von der Bestrahlungsart zu erkennen ist, so zeigt sich doch, dass UV-Strahlung je nach Spender eine hohe Induktion verursachen kann. MMP1 wird inhibiert durch die Bindung von TIMP1 in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1/1 (Nagase *et al.*, 2006). Für die enzymatische Aktivität von MMP1 in der extrazellulären Matrix ist also das Verhältnis von MMP1 zu TIMP1 entscheidend. Ob die Aktivität von MMP1 *in vivo* sich in gleicher Weise verhält wie *in vitro* kann aus der alleinigen Quantifizierung der verschiedenen mRNS mittels RT-PCR nicht ermittelt werden. Ein möglicher Ansatz ist es die Induktion der MMP1-mRNS auf die Induktion der TIMP1-mRNS zu normieren. Dies ist auf der rechten Seite der Abbildungen 3.12 a)-c) durchgeführt worden. Auf der Y-Achse ist das Verhältnis von auf 18S-mRNS normierter MMP1-mRNS zu auf 18S-mRNS normierter TIMP1-mRNS dargestellt. In dieser Darstellung findet sich in etwa die Situation *in vitro* wieder, hohe Faktoren nach UVA-, deutlich niedrigere nach UVB-Bestrahlung und Werte um das Kontrollniveau nach der Bestrahlung mit UVA und UVB. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass in dieser Darstellung keine relative Induktion einer mRNS dargestellt wird, sondern ein Quotient aus relativen Induktionsfaktoren gebildet wird. Die Aussagekraft dieser Darstellungsweise bleibt begrenzt und kann nicht die exakte Ratio von Molekülen MMP1-mRNS zu Molekülen TIMP1-mRNS wiedergeben. Da alle Primerpaare gleich große Produkte erzeugen, die durch Interkalieren von Sybr-Green also auch die gleiche Fluoreszenzintensität pro Molekül PCR-Produkt liefern, kann diese Normierung prinzipiell durchgeführt werden. Die Annealingtemperaturen wurden so gewählt, dass die PCR-Ansätze für MMP1, TIMP1 und 18S-RNS alle in einem Ansatz unter identischen Bedingungen auf einer 96-Loch-Platte durchführbar sind. Trotzdem ist es möglich, dass die PCR-Effizienz nicht für alle drei Primerpaare gleich ist. Angesichts des exponentiellen Verlaufes der Produktsynthese bei der PCR könnte eine unterschiedliche PCR-Effizienz die hier durchgeführte Normierung in Frage stellen. Weiterhin fließen auch mRNS-Struktur mRNS-Stabilität in die tatsächliche Translationsaktivität einer mRNS ein. Diese Faktoren können durch die hier durchgeführten Experimente nicht berücksichtigt werden. Da zur Beschreibung der Situation *in vivo* nur auf mRNS basierende Daten vorliegen, bleibt die gewählte Darstellung der auf die TIMP1-mRNS-Menge normierten MMP1-mRNS dennoch die einzige Möglichkeit der Analyse. Die ermittelten mRNS-Daten lassen vermuten, dass zwar entgegen der Situation *in vitro* TIMP1 reguliert ist, bezogen auf die enzymatische Aktivität von MMP1 aber *in vivo* wie *in vitro* der gleiche Trend vorzuliegen scheint.

Um dies zu beweisen wäre eine Zymographie erforderlich. Die bei den *in vitro* Experimenten angewendete Methode ist hier jedoch nicht einsetzbar, weil durch die Elektrophorese alle inaktiven Komplexe aus TIMP1 und MMP1 getrennt werden würden. In den *in vitro* Experimenten ist dieser Umstand zweitrangig, da in diesem System erwiesenermaßen kein TIMP1 exprimiert wurde. Kurschat *et al.* (2002) entwickelten ein System zur Zymographie

in situ. Durch dieses Verfahren wurde es möglich Zymogramme aus Schnitten eines Gewebes anzufertigen. Ziel dieser Untersuchungen war MMP2 in malignen Tumoren. Wenn sich dieses Verfahren auch für MMP1 in Schnitten humaner Haut nutzen ließe, könnte hiermit überprüft werden, ob *in vitro* und *in vivo* Systeme bezüglich der MMP1-Aktivität die gleiche Abhängigkeit von der Induktion der verschiedenen UV-Strahlungen aufweisen. Alternativ zur Zymographie *in situ* könnte auch die Kolo-kalisation von TIMP1 und MMP1 mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Hier für wären mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper notwendig, die eine Färbung in fixierten Schnitten einer Biopsie erlauben erforderlich. Allerdings könnte hiermit lediglich das gemeinsame Auftreten von TIMP1 und MMP1 nachgewiesen werden, nicht aber die enzymatische Aktivität. Problematisch bei diesem Ansatz könnte es sein, dass MMP1 und TIMP1 auch als membranständige Moleküle vorkommen, welche einen hohen Hintergrund verursachen können (zur Übersicht siehe: Baker *et al.* (2002)).

Fest steht, daß die durch UV-Strahlung induzierten Expressionmuster von TIMP1 *in vivo* und *in vitro* nicht identisch sind. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, daß sowohl *in vitro* als auch *in vivo* letztendlich die MMP1-Aktivität in beiden Fällen in gleicher Weise reguliert ist. Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Techniken ermöglichen es nicht die Frage nach der *in vivo* Aktivität von MMP1 nach UV-Bestrahlung zu beantworten. Die mRNS-Daten legen nahe, daß es *in vivo* zu dem gleichen inhibitorischen Effekt durch die Kombinationsbestrahlung kommt wie *in vitro*.

Ebenfalls offen bleiben muss die Frage warum sich das Modellsystem aus Fibroblasten bei der Induktion von TIMP1 anders verhält als die menschliche Haut. Zunächst muss berücksichtigt werden, daß die Biopsien aus Gesäßhaut eine Mischkultur vieler Hautzelltypen sind, während das *in vitro* Modell nur Fibroblasten enthält. Melanozyten und Langerhanszellen sind aufgrund ihrer geringen Anzahl vermutlich für die MMP1 und TIMP1 Sekretion vernachlässigbar. Keratinozyten exprimieren jedoch MMP1, sie benötigen es zur Remodellierung von Typ I Kollagen während der Migration durch *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* und kann auf immunohistochemischen Wege nachgewiesen werden (Zebrowska *et al.* (2005); zur Übersicht: Krutmann (2003)). Die mRNS-Daten aus Hautbiopsien stellen also einen Durchschnitt der mRNS aus Keratinozyten und Fibroblasten dar. Die erhöhte Expression von TIMP1 in Hautbiopsien könnte also auf die Keratinozyten zurückzuführen sein. Um dies zu überprüfen könnte versucht werden die Keratinozyten der Epidermis von den Fibroblasten der Dermis zu trennen, um Zelltypspezifische mRNS-Daten *in vivo* zu erhalten. Dies wäre z.B. durch Auflösen des *Stratum basale* mittels Verdauung durch Dispase, wie in Kapitel 2.1 beschrieben, möglich. Bis zur Etablierung derartiger Experimente kann die Frage nach der enzymatischen Aktivität von MMP1 *in vivo* nicht mit letzter Sicherheit beantwortet werden.

4.4 UVA- und UVB-induzierte Wechselwirkung auf Ebene der Zellzykluskontrolle

Während die Frage nach dem Chromophor für die DNS-unabhängige Signaltransduktion noch nicht mit letzter Sicherheit zu beantworten ist, so steht fest, dass die DNS ein Chromophor für UVB ist und auch UVA, zumindest indirekt, schädigende Wirkungen auf die DNS haben kann (siehe Kapitel: 1.4.3, zur Übersicht: Ravanat *et al.* (2001)). Diese

DNS-Schäden induzieren in der Zelle Signaltransduktionsprozesse, welche zur Aktivierung verschiedener Reparaturmechanismen (NER & BER) führen (Aboussekhra *et al.* (1995) und Wood (1996)). Um die Teilung von Zellen mit geschädigtem Erbgut zu vermeiden, führt die Detektion von DNS-Schäden auch zu einem Stop der Proliferation bzw. zu einem Zellzyklusarrest. Ein solcher Zellzyklusarrest kann sowohl durch das Auftreten von DNS-Schäden (Shackelford *et al.*, 1999), als auch durch oxidativen Stress verursacht werden (Shackelford *et al.*, 2000). Die in Abbildung 3.13 zusammengefassten Experimente untersuchen die Folgen einer einmaligen Bestrahlung von Fibroblasten mit UVA, UVB und der Kombination beider Strahlungen. Zum Zeitpunkt 0 h befinden sich über 95 % aller Zellen in einem G0/G1 Arrest. Das bedeutet, dass dieses Experiment nicht die Induktion eines Zellzyklusarrests bei proliferierenden Zellen zeigt, sondern den Wiedereintritt einer im G0/G1 Arrest befindlichen Kultur dokumentiert. Die Fibroblasten der Dermis teilen sich weit weniger häufig als die basalen Keratinozyten der Epidermis, die einem ständigen Erneuerungsprozess unterliegen, müssen um die bereits verhornten Keratinozyten des *Stratum corneum* permanent nachzubilden. Aus diesem Grund wurde das Experiment so gestaltet, dass der Wiedereintritt einer G0/G1 synchronisierten Kultur beobachtet werden konnte. Das Diagramm zur Darstellung der Proliferationsgeschwindigkeit innerhalb der drei Tage nach Bestrahlung zeigt, dass die Bestrahlung mit 30 J/cm² UVA die Geschwindigkeit des Wiedereintrittes in den Zellzyklus gegenüber den unbestrahlten Zellen nicht verlangsamt. Die Bestrahlung mit 100 J/m² UVB oder der Kombination aus UVA und UVB verursacht eine Verzögerung des Wiedereintrittes in den Zellzyklus um mehr als 24 h. Durch die UV-induzierten DNS-Schäden wird anscheinend der G0/G1 Arrest verlängert, was zu einem verzögerten Wiedereintritt in den Zellzyklus führt. Eine Bestrahlung mit UVB ist bezüglich dieses Effektes wirksamer als eine Bestrahlung mit UVA. Bei der Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB dominiert der durch UVB ausgelöste Effekt. Damit korreliert die UV-abhängige Induktion eines Zellzyklusarrests nicht mit dem Aktivierungsmuster einer der drei untersuchten MAPKinasen. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wird auch hervorgerufen durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren wie EGF und PDGF, welche über membranständige Rezeptoren wie den EGFR zur Aktivierung von ERK1/2 führen können (Minden *et al.* (1994) und Cowley *et al.* (1994)). Daher gilt die Aktivierung von ERK1/2 allgemein als pro proliferatives Signaltransduktionsereignis. Die Abbildungen 3.3 und 3.6 zeigen jedoch, dass UVB im Gegensatz zu UVA und der Kombinationsbestrahlung zur höchsten und am längsten anhaltenden Aktivierung von ERK1/2 führt. Die Aktivierung von ERK1/2 kann also nicht der alleinige, die Proliferationsgeschwindigkeit kontrollierende Faktor sein. Vielmehr muss man davon ausgehen, dass erst ein spezifisches Aktivierungsmuster von mehreren MAPKinasen für die Kontrolle des Zellzyklus verantwortlich ist.

Ein Zellzyklusarrest kann an mehreren verschiedenen Kontrollpunkten induziert werden. Sowohl ein G0/G1-Phase-, S-Phase- und G2-Kontrollpunkt sind im Zellzyklus vorhanden (zur Übersicht: Samuel *et al.* (2002) und Yang & Zou (2006)). Jede Phase des Zellzyklus ist mit dem Auftreten von charakteristischen Komplexen aus Zyklinen und CDKs verbunden. Zyklin D1 ist ein charakteristisches Zyklin der G1-Phase und erreicht seine höchste Konzentration im Zellkern gegen Ende dieser Zellzyklusphase (Matsushime *et al.*, 1991). Im Komplex mit CDK4 und CDK6 werden die D Zyklone aktiv (Won *et al.* (1992) und Meyerson & Harlow (1994)). Der exakte Wirkungsmechanismus dieses Proteinkinasekomplexes ist bislang unklar. Ein Ziel welches durch diesen Komplex phosphoryliert werden kann ist das Retinoblastomprotein (pRB), welches in seiner phosphorylierten

Form den Übergang in die S-Phase ermöglicht (Matsushime *et al.*, 1992). Diese Komplexe aus Zyklin D1, CDK4 und CDK6 ermöglichen der Zelle also die Transition aus der späten G1-Phase in die S-Phase. Die Zykline D2 und D3 verhalten sich in analoger Weise (Meyerson & Harlow, 1994).

Die in Abbildung 3.14 dargestellten Ergebnisse zeigen den Gehalt an Zyklin D1 in Fibroblasten nach Bestrahlung mit UV innerhalb der ersten 24 h nach der Bestrahlung. Sowohl die Bestrahlung mit 30 J/cm^2 UVA als auch die mit 100 J/m^2 UVB und die Kombination von UVA und UVB verursachen eine Reduzierung der Zyklin D1-Menge in den Zellen. Wie schon im vorherigen Experiment, welches sich mit der Proliferationsgeschwindigkeit beschäftigte, erweisen sich Bestrahlungen welche UVB enthalten als wirksamer die alleinige Bestrahlung mit UVA. Dieser Befund korreliert mit der Messung der Proliferationsgeschwindigkeit nach Bestrahlung (siehe Abb.: 3.13). UVA verursacht ein Absinken der Zyklin D1 Menge für lediglich 4 h. Vermutlich ist dieses Minimum an Zyklin D1 zu kurz um einen, bei der Proliferationsmessung feststellbaren, Zellzyklusarrest zu verursachen. UVB und die Kombination aus UVA und UVB senken die Zyklin D1 Menge für 10 bzw. 15 h deutlich unter das Ausgangsniveau. Diese Zeitspanne mit verringerter Zyklin D1 Menge scheint ausreichend zu sein, um eine Verlängerung des G0/G1-Arrests zu verursachen. Zyklin D1 ist ein instabiles Protein mit einer hohen Umsatzrate. Die Halbwertszeit des Zyklin D1 beträgt etwa 20 min (Matsushime *et al.*, 1991). Der Abbau der D Zykline erfolgt ubiquitinabhängig über das Proteasom (Alao *et al.*, 2006). Die relativ kurze Halbwertszeit und der aktive Abbau von Zyklin D1 erklären den schnellen Abbau nach der Bestrahlung. Der Befund, dass der UV-induzierte Zellzyklusarrest ein Zyklin D1 abhängiger G0/G1-Arrest ist, ist in dieser Form zuvor noch nicht beschrieben worden. Es ist jedoch nicht zulässig diesen Mechanismus für alle Zelltypen der Haut zu postulieren. Bei den hier vorgestellten Experimenten wird eine Verlängerung eines bereits bestehenden G0/G1-Arrests beschrieben. Für die sich selten teilenden Fibroblasten der Dermis ist dies ein zutreffendes Modell. Für die permanent proliferierenden basalen Keratinozyten der Epidermis kommen auch andere Mechanismen, wie verlangsamte S-Phase oder der G2/M-Arrest in Frage.

4.5 UVA- und UVB-induzierte DNS-Schäden als Ursache für den Zellzyklusarrest

Die vorhergehenden Kapitel diskutieren die Folgen von Bestrahlungen mit UVA und UVB auf das Proliferationsverhalten und die Kontrolle des Zellzyklus. Es stellt sich die Frage, warum UV-Strahlung einen Zellzyklusarrest induziert. Eine mögliche Ursache sind die durch die Bestrahlung induzierten DNS-Schäden. Um die Teilung von Zellen mit geschädigtem Genom zu verhindern, kann durch den Zellzyklusarrest die für die DNS-Reparatur erforderliche Zeit gewonnen werden. Ob die hier eingesetzten UV-Dosen DNS-Schäden induzieren und in ihrem Ausmaß mit den in Proliferationsexperimenten gemachten Beobachtungen korrelieren, wurde mittels der in Abbildung 3.15 gezeigten DNS-Reparaturkinetiken untersucht.

Der Comet Assay ist ein anerkanntes Verfahren um UV-induzierte Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS sichtbar zu machen. Das in Abbildung 3.15 gezeigte Experiment dient der Untersuchung der Frage, ob sich die Wirkungen von UVA und UVB bei der

Induktion von Strangbrüchen in der DNS wechselseitig beeinflussen. Da UVA lediglich durch die Erhöhung des oxidativen Stresses in der Zelle Einzelstrangbrüche zu induzieren vermag, sind die Folgen für die Mobilität der DNS im Agarosefilm weniger groß als es die durch UVB induzierten Doppelstrangbrüche sind. 30 J/cm² UVA verursachen keinen im Comet-Assay detektierbaren DNS-Schaden. Dieser Sachverhalt passt zu der Beobachtung, dass UVA allein den Zellzyklusarrest nicht verlängert. Die durch UVB applizierten DNS-Schäden lassen sich jedoch deutlich vom Hintergrund unterscheiden. In Kombination mit UVA ist die DNS-schädigende Wirkung der UVB-Bestrahlung deutlich größer. Die Reparatur verläuft zwar genauso schnell, aber das Ausmaß der induzierten Strangbrüche ist größer. Dieses Muster der durch UVA, UVB und der Kombinationsbestrahlung hervorgerufenen DNS-Schädigungen korreliert mit dem Abbau von Zyklin D1 (siehe Abb.: 3.14). Diese Daten legen nahe, dass der Zyklin D1 abhängige G₀/G₁-Arrest vom Ausmaß der UV-induzierten DNS-Schäden abhängt. Betrachtet man die Daten zur Proliferation und Degradation von Zyklin D1, so lässt sich feststellen, dass in der Regulation des Zellzyklus keine Wechselwirkungen auf Signaltransduktionsebene auftreten, wie sie am Beispiel der MAPKinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 gezeigt werden konnten, sondern ausschließlich die DNS und ihre Schädigung die Kontrolle des Zellzyklus bestimmen.

Ein interessanter Befund ist, dass UVA die DNS-schädigende Wirkung von UVB deutlich verstärkt. Über die Ursache hierfür kann nur spekuliert werden. Möglicherweise gibt es an der DNS-Reparatur beteiligte Proteinkomplexe die sensitiv auf die UVA-induzierten ROS reagieren. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente sind jedoch nicht geeignet diese Hypothese zu überprüfen. Weiterhin kann im Comet Assay nicht unterschieden werden, ob die Ursache der Erhöhung der DNS-Mobilität durch UVB-induzierte Doppelstrangbrüche sind, oder ob es sich um während der Reparatur stattfindende Öffnungen des DNS-Stranges sind. Die Aktivierung des Mechanismus der BER ist abhängig vom Auftreten erhöhter Mengen von ROS (Izumi *et al.*, 2003). Unklar ist jedoch bislang ob die ROS selbst zu einer Aktivierung dieser Reparaturmechanismen führen, oder ob erst die Detektion des DNS-Schadens durch Komplexe wie den MRN-Komplex (bestehend aus: Mre11, Rad50 und Nbs1) und die damit verbundene Aktivierung der Kinasen ATM und ATR die DNS-Reparatur startet. In wie fern der Prozess der NER abhängig ist vom Auftreten von ROS ist bislang nicht untersucht.

Zu berücksichtigen ist, dass der Comet Assay lediglich die Erhöhung der Mobilität der DNS, hervorgerufen durch Strangbrüche, detektiert. Die Folgen auf Mutationsebene bleiben unberücksichtigt. Ob das beschriebne Phänomen auch hier Einfluss hat, kann nur mit weiterführenden Experimenten geklärt werden.

4.6 Klinische Relevanz der beschriebenen Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion

4.6.1 Die Entwicklung der UV-Antwort als Reaktion auf UVA- und UVB-Exposition

Die menschliche Haut ist, wenn sie dem natürlichen Strahlungsspektrum der Sonne ausgesetzt ist, immer einer Kombination von UVA- und UVB-Strahlung ausgesetzt. Diese

beiden Strahlungsqualitäten haben jeweils spezifische Wirkungen auf die Zelle. Zum einen ist dies die Generierung von ROS, induziert durch UVA, was Lipid- und Proteinoxidation und indirekte DNS-Schäden zur Folge hat, zum anderen die durch UVB verursachten DNS-Schäden. Kanzerogenese und Hautalterung sind die mögliche Konsequenz dieser Prozesse. Die Zellen der Haut verfügen über verschiedenen Mechanismen um dem entgegen zu wirken. Dies sind die Reparatur der DNS, die permanente Erneuerung der Epidermis und die permanente Rekonstruktion der extrazellulären Matrix. Als eine Anpassung an die Exposition gegenüber UVA und UVB hat sich im Laufe der Evolution eine an genau diese Strahlungsexposition angepasste UV-Antwort der Zelle entwickelt. Ein Beispiel hierfür ist UVA-induzierte MMP1-Expression, welche unter physiologischen Bedingungen, also in Kombination mit UVB, weit geringer ist als bei einer alleinigen Bestrahlung mit UVA. Studien welche lediglich UVA oder UVB als schädigende Noxe einsetzen sind durchaus sinnvoll, da sie der Identifikation von an der Signaltransduktion beteiligten Faktoren dienen können. Sollen jedoch für das Gesamtsystem Haut relevante Endpunkte auf Ebene der Genexpression untersucht werden, muss die Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Prozesse berücksichtigt werden. Diese Erkenntnis ist der zentrale Befund dieser Arbeit und hat weitreichende Konsequenzen für das Verständnis UV-induzierter Kanzerogenese und Hautalterung.

4.6.2 UV-induzierte Kanzerogenese und Hautalterung

UVA und UVB sind zweifelsfrei als Kanzerogene und Ursache für die lichtinduzierte Hautalterung identifiziert worden (zur Übersicht: de Gruijl (1999) und Grether-Beck *et al.* (2005)). Diese Erkenntnisse stammen zum einen aus der Analyse epidemiologischer Studien und zum anderen aus Tierversuchen (Woodhead *et al.* (1999); Willis *et al.* (1981)). Die menschliche Haut verfügt über verschiedene Strategien um diese beiden Prozesse zu vermeiden bzw. hinauszuzögern. Dazu gehören die konstante Erneuerung der Epidermis und das apoptotische Absterben geschädigter Zellen. Ebenso dazu gehören die Reparatur der DNS und der extrazellulären Matrix. Diese Prozesse werden durch ein komplexes Netzwerk verschiedener Signaltransduktionsprozesse gesteuert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass UVA und UVB eben diese Signaltransduktionsprozesse in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Weiterhin stellte sich heraus, dass eine Kombination von UVA und UVB, wie sie dem UV-Anteil des Sonnenlichts entspricht, Signaltransduktionsereignisse auslöst, die weder der UVA- noch der UVB-induzierten Antwort der Zelle entsprechen. Die Expression von MMP1 ist ein biologischer Endpunkt dieser Prozesse. Das durch die Kombination von UVA und UVB nachgestellte natürliche UV-Spektrum induziert die MMP1-Expression weit weniger als dies UVA und UVB alleine vermögen. Dieser Befund wird dann besonders interessant, wenn man die Relevanz der MMP1-Aktivität für Tumorprogression und Hautalterung bedenkt und dabei berücksichtigt, dass das natürliche UV-Spektrum in verschiedenen Situationen stark verändert wird. Dies geschieht zum einen bei der Verwendung von Sonnenschutzmitteln, zum anderen bei UV-Strahlungsquellen für kosmetische oder medizinische Zwecke. In der Vergangenheit waren z.B. Sonnenschutzmittel weit verbreitet, welche effektive UVB-Filter enthielten, aber keinen Schutz vor dem UVA-Anteil des Sonnenlichts boten. Es stellte sich heraus, dass diese Produkte bei regelmäßiger Anwendung die Erythembildung zwar verhinderten, langfristig aber nicht zu einer Verminderung des Hautkrebsrisikos beitrugen (Gasparro *et al.* (1998); Gasparro (2000)). Dies wird zurückgeführt auf die mittlerweile anerkannte kanzerogene Wir-

kung der nicht durch den Sonnenschutz absorbierten UVA-Anteile (Runger, 1999). Modernere Sonnenschutzprodukte verwenden sowohl UVA- als auch UVB-Filter. Vor dem Hintergrund der hier vorgestellten Ergebnisse erscheint der Ansatz, das Verhältnis von UVA- zu UVB-Anteilen im wirksamen Spektrum nicht zu verändern, sondern die UV-Strahlungsbelastung durch den gleichzeitigen Einsatz von UVA- und UVB-Filtern zu senken, als sinnvoll. Langfristige Studien die die Wirksamkeit dieses Ansatzes bestätigen könnten stehen allerdings noch aus.

Eine weitere Situation in der die menschliche Haut hohen Dosen UVA ausgesetzt ist, ist die Nutzung von Sonnenbänken zur Bräunung aus kosmetischen Gründen. Die hierbei eingesetzten Strahlungsquellen emittieren ausschließlich UVA. Durch die hohe UVA-Dosis wird eine schnelle Pigmentierung der Haut erreicht ohne jedoch das Risiko einer schnellen UVB-bedingten Erythembildung einzugehen. Es existieren eine Vielzahl von Hinweisen dafür, dass die intensive Nutzung dieser Sonnenbänke zu einer Steigerung des Hautkrebsrisikos führt (Westerdahl *et al.* (2000); Bataille *et al.* (2005)). Trotz dieser und weiterer epidemiologischer Studien ist diese Theorie noch nicht eindeutig bewiesen und allgemein akzeptiert. Das Fehlen eindeutiger Daten zu dieser Problematik wird hauptsächlich dadurch verursacht, dass Studien dieser Art eine große Zahl von Studienteilnehmern über einen sehr langen Zeitraum erfordern. Vor dem Hintergrund der hier vorgestellten *in vitro* und *in vivo* Daten bezüglich der UVA-induzierten MMP1-Aktivität erscheint die regelmäßige Sonnenbanknutzung wegen des Risikos der vorzeitigen UVA-bedingten Hautalterung nicht empfehlenswert. Diese Arbeit eröffnet aber auch gleichzeitig die Perspektive, die Emissionsspektren der bislang üblichen Strahlungsquellen um geringe UVB-Anteile zu erweitern, um die UVA-induzierte MMP1-Expression auf ein Minimum zu reduzieren.

In dieser Arbeit konnte eine Wechselwirkung UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktionsprozesse nachgewiesen werden, die sich auch auf die Genexpression auswirkt. Die menschliche Haut ist aber auch hohen Energien elektromagnetischer Strahlung anderer Wellenlängen ausgesetzt, welche die Genexpression ebenfalls beeinflussen können. Die Expression von MMP1 kann in ERK1/2-abhängiger Weise auch durch IR-Strahlung induziert werden (Schieke *et al.*, 2002). Es können also auch andere Wellenlängenbereiche des elektromagnetischen Spektrums Einfluss auf die Genregulation der Haut haben. Ob es Wechselwirkungen zwischen den durch UVA, UVB, dem sichtbaren Licht oder dem IR-Spektrum induzierten Signaltransduktionsereignissen gibt ist bislang nicht untersucht. Angesichts der hier gezeigten Ergebnisse sollten solche Wechselwirkungen in zukünftigen Studien zur strahlungsinduzierten Signaltransduktion und Genexpression berücksichtigt werden.

4.6.3 Konsequenzen für zukünftige Hautmodellsysteme

In dieser Arbeit dienten Zellkulturen primärer dermaler Fibroblasten als Modellsystem für die Dermis und primäre Keratinozyten als Modell für die Epidermis. Der Einsatz primärer Zellen bietet verschiedene Vorteile gegenüber immortalisierten Zelllinien. Soll die Wirkung von UVA und UVB auf Mechanismen wie Zellzykluskontrolle, Apoptose und Proliferation untersucht werden, wie in dieser Arbeit, so ist es nicht sinnvoll zu diesem Zweck immortalisierte Zelllinien einzusetzen, welche sich durch eine defekte Zellzykluskontrolle auszeichnen. Genau dies ist in vielen Studien jedoch gängige Praxis. Weiterhin berücksichtigen primäre Zellen verschiedener Spender auch deren genetische Variabi-

lität und deren unterschiedliche Hauttypen. Insofern sind die hier eingesetzten gekom-
men Zellkultursysteme ein Fortschritt. Dennoch ist das Modell einer einlagigen primären
Zellschicht nicht ideal, wie sich am Beispiel der TIMP1-Induktion zeigt. Die Abbildun-
gen 3.10 und 3.12 zeigen deutlich, dass es *in vitro* nicht zu einer strahlungsinduzierten
TIMP1-Induktion kommt, *in vivo* ist dies jedoch der Fall. Solche Phänomene sind für
Keratinocyten bereits beschrieben worden. Enk *et al.* (2006) konnten mittels Microarray-
Analysen zeigen, dass sich die UVB-induzierte Genregulation primärer Keratinocyten
in vivo in verschiedenen Genen von der *in vitro* unterscheidet. Über die Gründe für die un-
terschiedliche Genregulation *in vitro* und *in vivo* kann momentan nur spekuliert werden.
Zu berücksichtigen ist auf jeden Fall, dass die Kommunikation zwischen den Keratinocy-
ten im *in vitro* Modell aufgrund der zweidimensionalen Struktur eingeschränkt ist. In
der Epidermis sind die Keratinocyten zusammen mit Langerhanszellen und Melanozyten
in einem dreidimensionalen Verband angeordnet. Dies ist im *in vitro* Modell vollkom-
men unberücksichtigt. Auch die Dermis ist *in vivo* eine dreidimensionale Struktur, welche
maßgeblich durch die extrazelluläre Matrix definiert ist. Diese Umstände scheinen einen
Einfluss auf die strahlungsinduzierte Genexpression zu haben. Daher erscheint es sinnvoll
in Zukunft Studien, die Rückschlüsse auf die Situation *in vivo* geben sollen, in dreidimen-
sionalen Hautmodellen durchzuführen. Solche Modellsysteme befinden sich derzeit in der
Entwicklung und werden bereits eingesetzt (Monteiro-Riviere *et al.* (1997); Zhao *et al.*
(1999)). Sie ermöglichen die Kultivierung einer differenzierten Epidermis, welche durch ei-
ne Basallamina mit der Dermis verbunden ist. In solchen Modellsystemen ist es möglich
die Wechselwirkungen zwischen Fibroblasten und Keratinocyten zu untersuchen. Erste
Transportmechanismen über die Basallamina hinweg konnten in diesen Modellsystemen
bereits nachgewiesen werden (Bernerd, 2005). Insgesamt erscheint der Einsatz solcher
Modellsysteme für zukünftige Studien empfehlenswerter als die Zellkultur epidermaler
oder dermaler Zellen. Dabei sollte aber wann immer möglich *ex vivo* Haut als verglichen-
de Kontrolle für die Situation *in vivo* hinzugezogen werden, um die *in vivo* Relevanz zu
überprüfen.

5 Zusammenfassung

Die menschliche Haut ist einem breiten Spektrum elektromagnetischer Strahlung ausgesetzt. Die energiereichsten Komponenten dieser Strahlung sind die UVA- und UVB-Anteile der Sonnenstrahlung. Sowohl UVA als auch UVB können in den Zellen der Haut Signaltransduktionsprozesse induzieren, die biologische Endpunkte wie Zellproliferation, Apoptose, Zellzyklusregulation und Genexpression beeinflussen. Diese Signaltransduktionsprozesse wurden bislang als spezifisch für die jeweilige Strahlungsqualität angesehen. Die menschliche Haut ist jedoch, wenn sie der natürlichen Sonnenstrahlung ausgesetzt ist, sowohl UVA als auch UVB exponiert. Diese Arbeit befasst sich daher mit der Frage, ob sich UVA- und UVB-induzierte Signaltransduktionsprozesse wechselseitig beeinflussen und ob dies von funktioneller Relevanz ist. Durchgeführt wurde diese Arbeit in humanen epidermalen Keratinozyten und humanen dermalen Fibroblasten.

Initial wurde die UVA- und UVB-induzierte Wechselwirkung auf Ebene der MAPKinase-Aktivierung untersucht, da diese sowohl durch UVA- als auch durch UVB-Strahlung verursacht werden kann. Die MAPKinase ERK1/2 ist durch UVA und durch UVB aktivierbar. Nach einer Kombinationsbestrahlung aus UVA und UVB kommt es allerdings zu einer über 24 h anhaltenden Inaktivierung von ERK1/2. Dieser inhibitorische Effekt tritt bei den MAPKinasen JNK1/2 und p38 nicht auf. Beide sind durch die eingesetzten UVA- und UVB-Dosen nur minimal aktivierbar. Nach der Kombinationsbestrahlung mit UVA und UVB kommt es jedoch zu einer mehr als additiven Verstärkung der Aktivierung. Das bedeutet, dass sowohl UVA als auch UVB verschiedene Aktivierungsmuster dieser drei MAPKinasen auslösen. Eine Bestrahlung die UVA- und UVB-Komponenten enthält löst jedoch eine dritte, von den jeweiligen Einzelbestrahlungen verschiedene Antwort der Zelle aus. Ein möglicher Mechanismus für diesen inhibitorischen Effekt auf die ERK1/2-Aktivierung ist die UVA-abhängige Freisetzung von membraneigenen Ceramiden, welche über die Aktivierung von Phosphatasen die UVB-induzierte Aktivierung von ERK1/2 verringern könnten. Ein Endpunkt dieser Prozesse ist die ERK1/2-abhängige Expression von MMP1. Sowohl UVA als auch UVB induzieren die Expression von MMP1. Die Kombination beider Strahlungsqualitäten löst jedoch eine geringere MMP1-Expression aus als UVA oder UVB allein. Dieser Effekt konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Enzymaktivitätsebene gezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Wechselwirkungen zwischen UVA- und UVB-induzierter Signaltransduktion existieren. Diese Wechselwirkungen betreffen die UVA-induzierte MMP1-Expression, welche durch UVB inhibiert wird. Die Expression von MMP1 ist von zentraler Bedeutung für die Degradation der extrazellulären Matrix und damit Voraussetzung für die lichtinduzierte Hautalterung und das invasive Wachstum von Tumoren. Daher hat dieser Effekt immer dann höchste Relevanz, wenn die Haut UV-Spektren ausgesetzt ist, deren Verhältnis von UVA- zu UVB-Anteilen nicht mehr dem Sonnenlicht entspricht. Dies ist bei der Anwendung von Sonnenschutzmitteln und in Solarien der Fall, da hier UVB-Komponenten gefiltert bzw. nicht emittiert werden.

6 Literatur

- Abaseri, T. B. El, Fuhrman, J., Trempus, C., Shendrik, I., Tennant, R. W. & Hansen, L. A. (2005). Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.*, 65(9), 3958–3965.
- Aboussekhra, A., Biggerstaff, M., Shivji, M. K., Vilpo, J. A., Moncollin, V., Podust, V. N., Protic, M., Hubscher, U., Egly, J. M. & Wood, R. D. (1995). Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell*, 80(6), 859–868.
- Abraham, R. T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.*, 15(17), 2177–2196.
- Alao, J. P., Stavropoulou, A. V., Lam, E. W., Coombes, R. C. & Vigushin, D. M. (2006). Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A induces ubiquitin-dependent cyclin D1 degradation in MCF-7 breast cancer cells. *Mol. Cancer*, 5, 8.
- Alem, E., Kiyokawa, H. & Kaldis, P. (2005). Cdc2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat. Cell Biol.*, 7(8), 831–836.
- Anderson, N. G., Maller, J. L., Tonks, N. K. & Sturgill, T. W. (1990). Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, 343(6259), 651–653.
- Angel, P. (1995). *Inducible Gene Expression*. Birkhauser, Boston.
- Autier, P. (2005). Cutaneous malignant melanoma: facts about sunbeds and sunscreen. *Expert. Rev. Anticancer Ther.*, 5(5), 821–833.
- Baker, A. H., Edwards, D. R. & Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J. Cell Sci.*, 115(Pt 19), 3719–3727.
- Bataille, V., Boniol, M., de Vries, E., Severi, G., Brandberg, Y., Sasieni, P., Cuzick, J., Eggermont, A., Ringborg, U., Grivegne, A. R., Coebergh, J. W., Chignol, M. C., Dore, J. F. & Autier, P. (2005). A multicentre epidemiological study on sunbed use and cutaneous melanoma in Europe. *Eur. J. Cancer*, 41(14), 2141–2149.
- Bell, S. P. & Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.*, 71, 333–374.
- Berneburg, M. & Krutmann, J. (2003). Xeroderma pigmentosum and related syndromes. *Hautarzt*, 54(1), 33–40.
- Berner, F. (2005). Human skin reconstructed in vitro as a model to study the keratinocyte, the fibroblast and their interactions: photodamage and repair processes. *J. Soc. Biol.*, 199(4), 313–320.
- Berridge, M. V., Herst, P. M. & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 11, 127–152.
- Bode, A. M. & Dong, Z. (2003). Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. *Sci. STKE*, 2003(167), RE2.
- Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, K. C., Bhagavathula, N., Kang, S., Fisher, G. J., Varani, J. & Voorhees, J. J. (2003). Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem. Photobiol.*, 78(1), 43–48.

- Brenneisen, P., Oh, J., Wlaschek, M., Wenk, J., Briviba, K., Hommel, C., Herrmann, G., Sies, H. & Scharffetter-Kochanek, K. (1996). Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts. *Photochem. Photobiol.*, 64(4), 649–657.
- Brenneisen, P., Sies, H. & Scharffetter-Kochanek, K. (2002). Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 973, 31–43.
- Brinckerhoff, C. E., Rutter, J. L. & Benbow, U. (2000). Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin. Cancer Res.*, 6(12), 4823–4830.
- Bruls, W. A., Slaper, H., van der Leun, J. C. & Berrens, L. (1984). Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem. Photobiol.*, 40(4), 485–494.
- Bruls, W. A., van Weelden, H. & van der Leun, J. C. (1984). Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose. *Photochem. Photobiol.*, 39(1), 63–67.
- Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B. & Siliciano, J. D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, 281(5383), 1677–1679.
- Chalfant, C. E., Kishikawa, K., Mumby, M. C., Kamibayashi, C., Bielawska, A. & Hannun, Y. A. (1999). Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 274(29), 20313–20317.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. & Loeb, L. A. (1992). 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G - T and A - C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 267(1), 166–172.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. & Marshall, C. J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, 77(6), 841–852.
- Daya-Grosjean, L., Dumaz, N. & Sarasin, A. (1995). The specificity of p53 mutation spectra in sunlight induced human cancers. *J. Photochem. Photobiol. B*, 28(2), 115–124.
- de Gruijl, F. R. (1999). Skin cancer and solar UV radiation. *Eur. J. Cancer*, 35(14), 2003–2009.
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Smeal, T. & Karin, M. (1992). The mammalian ultraviolet response is triggered by activation of Src tyrosine kinases. *Cell*, 71(7), 1081–1091.
- Dobrowsky, R. T., Kamibayashi, C., Mumby, M. C. & Hannun, Y. A. (1993). Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.*, 268(21), 15523–15530.
- Driscoll, C. M. H. (1992). Solar UV trends and distributions. *Natl Radiat Prot Board Bull.*, 137, 7–13.
- Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J. & Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(17), 7686–7689.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Brown, K., Kelly, K. & Siebenlist, U. (1997). Direct activation of the stress-activated protein kinase (SAPK) and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathways by an inducible mitogen-activated protein Kinase/ERK kinase kinase 3 (MEKK) derivative. *J. Biol. Chem.*, 272(5), 2668–2674.
- Enan, E. & Matsumura, F. (1996). Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.*, 52(10), 1599–1612.

- Enk, C. D., Jacob-Hirsch, J., Gal, H., Verbovetski, I., Amariglio, N., Mevorach, D., Ingber, A., Givol, D., Rechavi, G. & Hochberg, M. (2006). The UVB-induced gene expression profile of human epidermis in vivo is different from that of cultured keratinocytes. *Oncogene*, 25(18), 2601–2614.
- Epstein, J. H. (1978). Photocarcinogenesis: a review. *Natl. Cancer Inst. Monogr*, (50), 13–25.
- Fernandez-Resa, P., Mira, E. & Quesada, A. R. (1995). Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Anal. Biochem.*, 224(1), 434–435.
- Freedberg, I., Eisen, A., Wolff, K., Austen, K., Goldsmith, L. & Katz, S. (2003). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, Band 6th edition. Mc Graw - Hill, New York.
- Fritsch, P. (2004). *Dermatologie und Venerologie - Lehrbuch und Atlas*, Band 2. Auflage. Springer, Berlin.
- Fritsche, E., Schäfer, C., Bernsmann, T., Calles, C., Bernshausen, T., Wurm, M., Hajimiragha, H., Hübenthal, U., Cline, J.E., Schroeder, P., Rannug, A., Klotz, L.O., Fürst, P., Hanenberg, H., Abel, J. & Krutmann, J. (2007). Lightening up the UV response by identification of the arylhydrocarbon receptor as a cytoplasmatic target for ultraviolet B radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, in press.
- Gallagher, R. P., Spinelli, J. J. & Lee, T. K. (2005). Tanning beds, sunlamps, and risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 14(3), 562–566.
- Gasparro, F. P. (2000). Sunscreens, skin photobiology, and skin cancer: the need for UVA protection and evaluation of efficacy. *Environ. Health Perspect.*, 108 Suppl 1, 71–78.
- Gasparro, F. P., Mitchnick, M. & Nash, J. F. (1998). A review of sunscreen safety and efficacy. *Photochem. Photobiol.*, 68(3), 243–256.
- Gilchrest, B.A. & Krutmann, J. (2006). *Photoaging*. Springer, Heidelberg - New York.
- Girolamo, N. Di, Coroneo, M. & Wakefield, D. (2005). Epidermal growth factor receptor signaling is partially responsible for the increased matrix metalloproteinase-1 expression in ocular epithelial cells after UVB radiation. *Am. J. Pathol.*, 167(2), 489–503.
- Grether-Beck, S., Bonizzi, G., Schmitt-Brenden, H., Felsner, I., Timmer, A., Sies, H., Johnson, J. P., Piette, J. & Krutmann, J. (2000). Non-enzymatic triggering of the ceramide signalling cascade by solar UVA radiation. *EMBO J.*, 19(21), 5793–5800.
- Grether-Beck, S., Buettner, R. & Krutmann, J. (1997). Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: molecular and photobiological mechanisms. *Biol. Chem.*, 378(11), 1231–1236.
- Grether-Beck, S., Wlaschek, M., Krutmann, J. & Scharffetter-Kochanek, K. (2005). [photodamage and photoaging–prevention and treatment]. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 3 Suppl 2, S19–S25.
- Henderson, S.T. (1977). *Daylight and its spectrum*, Band 2nd edition. Wiley, New York.
- Hijova, E. (2005). Matrix metalloproteinases: their biological functions and clinical implications. *Bratisl. Lek. Listy*, 106(3), 127–132.
- Huang, C., Li, J., Chen, N., Ma, W., Bowden, G. T. & Dong, Z. (2000). Inhibition of atypical PKC blocks ultraviolet-induced AP-1 activation by specifically inhibiting ERKs activation. *Mol. Carcinog.*, 27(2), 65–75.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell*, 80(2), 225–236.
- Hussein, M. R. (2005). Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J. Cutan. Pathol.*, 32(3), 191–205.
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyo, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Tsuru, K. & Horikawa, T. (2003). UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1-2), 21–39.

- Iordanov, M. S., Choi, R. J., Ryabinina, O. P., Dinh, T. H., Bright, R. K. & Magun, B. E. (2002). The UV (Ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell Biol.*, 22(15), 5380–5394.
- Izumi, T., Wiederhold, L. R., Roy, G., Roy, R., Jaiswal, A., Bhakat, K. K., Mitra, S. & Hazra, T. K. (2003). Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. *Toxicology*, 193(1-2), 43–65.
- Kabuyama, Y., Homma, M. K., Sekimata, M. & Homma, Y. (2001). Wavelength-specific activation of MAP kinase family proteins by monochromatic UV irradiation. *Photochem. Photobiol.*, 73(2), 147–152.
- Kasai, H. & Nishimura, S. (1984). Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.*, 12(4), 2137–2145.
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J. & Ahnstrom, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, 363(2), 89–96.
- Krutmann, J. (2001). Photocarcinogenesis. *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.*, 90(8), 297–299.
- Krutmann, J. (2003). Vorzeitige Hautalterung durch ultraviolette Strahlung und andere Umwelttoxene. *Hautarzt*, 54(9), 803.
- Krutmann, J. & Elmetts, C.A. (1995). *Photoimmunology*. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Kurschat, P., Wickenhauser, C., Groth, W., Krieg, T. & Mauch, C. (2002). Identification of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as the main gelatinolytic enzyme in malignant melanoma by in situ zymography. *J. Pathol.*, 197(2), 179–187.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. & Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev. Oncol. Hematol.*, 49(3), 187–198.
- Lancaster, H. O. & Nelson, J. (1957). Sunlight as a cause of melanoma - a clinical survey. *Med. J. Aust.*, 44(14), 452–456.
- Latonen, L. & Laiho, M. (2005). Cellular UV damage responses—functions of tumor suppressor p53. *Biochim. Biophys. Acta*, 1755(2), 71–89.
- Law, B. & Rossie, S. (1995). The dimeric and catalytic subunit forms of protein phosphatase 2A from rat brain are stimulated by C2-ceramide. *J. Biol. Chem.*, 270(21), 12808–12813.
- Lemaitre, V. & D'Armiento, J. (2006). Matrix metalloproteinases in development and disease. *Birth Defects Res. C. Embryo. Today*, 78(1), 1–10.
- Li, L. & Zou, L. (2005). Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells. *J. Cell Biochem.*, 94(2), 298–306.
- Liebenlist, P., Borwn, K. & Franzoso, G. (1995). *Inducible Gene Expression*. Birkhauser, Boston.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1), 265–275.
- Mahns, A., Melchheier, I., Suschek, C. V., Sies, H. & Klotz, L. O. (2003). Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400 nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide. *Free Radic. Res.*, 37(4), 391–397.
- Matsushime, H., Ewen, M. E., Strom, D. K., Kato, J. Y., Hanks, S. K., Roussel, M. F. & Sherr, C. J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell*, 71(2), 323–334.

- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. & Sherr, C. J. (1991). Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 65(4), 701–713.
- Mauch, C., Adelmann-Grill, B., Hatamochi, A. & Krieg, T. (1989). Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen. *FEBS Lett.*, 250(2), 301–305.
- Maziere, C., Floret, S., Santus, R., Morliere, P., Marcheux, V. & Maziere, J. C. (2003). Impairment of the EGF signaling pathway by the oxidative stress generated with UVA. *Free Radic. Biol. Med.*, 34(6), 629–636.
- medOCT group (2006). Der Aufbau der Haut - medOCT-group at the Centre of biomedical Technology and Physics, Medical University Vienna, siehe: <http://www.medoct.at/>
- Meyerson, M. & Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol. Cell Biol.*, 14(3), 2077–2086.
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R. J., Johnson, G. L. & Karin, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, 266(5191), 1719–1723.
- Monteiro-Riviere, N. A., Inman, A. O., Snider, T. H., Blank, J. A. & Hobson, D. W. (1997). Comparison of an in vitro skin model to normal human skin for dermatological research. *Microsc. Res. Tech.*, 37(3), 172–179.
- Moon, H. I. & Chung, J. H. (2006). The effect of 2',4',7-trihydroxyisoflavone on ultraviolet-induced matrix metalloproteinases-1 expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, 580(3), 769–774.
- Murphy, K. A., Villano, C. M., Dorn, R. & White, L. A. (2004). Interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoic acid pathways increases matrix metalloproteinase-1 expression in keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 279(24), 25284–25293.
- Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.*, 69(3), 562–573.
- Nakamura, S., Takahashi, H., Kinouchi, M., Manabe, A., Ishida-Yamamoto, A., Hashimoto, Y. & Iizuka, H. (2001). Differential phosphorylation of mitogen-activated protein kinase families by epidermal growth factor and ultraviolet B irradiation in SV40-transformed human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, 25(2), 139–149.
- Nakielnny, S., Campbell, D. G. & Cohen, P. (1992). MAP kinase kinase from rabbit skeletal muscle. A novel dual specificity enzyme showing homology to yeast protein kinases involved in pheromone-dependent signal transduction. *FEBS Lett.*, 308(2), 183–189.
- Neel, B. G. & Tonks, N. K. (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9(2), 193–204.
- Neuhoff, N., Stamm, R. & Eibl, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamid gels: Asystemis analysis. *Electrophoresis*, 6, 427–448.
- Obaya, A. J. & Sedivy, J. M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol. Life Sci.*, 59(1), 126–142.
- Olive, P. L., Banath, J. P. & Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet assay". *Radiat. Res.*, 122(1), 86–94.
- Parrish, J. A., Jaenicke, K. F. & Anderson, R. R. (1982). Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem. Photobiol.*, 36(2), 187–191.
- Ravanat, J. L., Douki, T. & Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J. Photochem. Photobiol. B*, 63(1-3), 88–102.

- RKI, Robert Koch-Institut (2004). *Hautkrebs*, Band 22. Robert Koch-Institut, Berlin.
- Rosenstein, B. S. & Mitchell, D. L. (1987). Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.*, 45(6), 775–780.
- Rosette, C. & Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*, 274(5290), 1194–1197.
- Runger, T. M. (1999). Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer. A short review. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 15(6), 212–216.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual.*, Band second edition. Cold Spring harbor Laboratory, New York.
- Samuel, T., Weber, H. O. & Funk, J. O. (2002). Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell Cycle*, 1(3), 162–168.
- Samuel, T., Weber, H. O., Rauch, P., Verdoodt, B., Eppel, J. T., McShea, A., Hermeking, H. & Funk, J. O. (2001). The G2/M regulator 14-3-3sigma prevents apoptosis through sequestration of Bax. *J. Biol. Chem.*, 276(48), 45201–45206.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Briviba, K. & Sies, H. (1993). Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, 331(3), 304–306.
- Schieke, S., Stege, H., Kurten, V., Grether-Beck, S., Sies, H. & Krutmann, J. (2002). Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J. Invest Dermatol.*, 119(6), 1323–1329.
- Schieke, S. M., Ruwiedel, K., Gers-Barlag, H., Grether-Beck, S. & Krutmann, J. (2005). Molecular crosstalk of the ultraviolet A and ultraviolet B signaling responses at the level of mitogen-activated protein kinases. *J. Invest Dermatol.*, 124(4), 857–859.
- Schieke, S. M., von Montfort, C., Buchczyk, D. P., Timmer, A., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Holbrook, N. J. & Klotz, L. O. (2004). Singlet oxygen-induced attenuation of growth factor signaling: possible role of ceramides. *Free Radic. Res.*, 38(7), 729–737.
- Seger, R. & Krebs, E. G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.*, 9(9), 726–735.
- Setlow, R. B. (1974). The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer: a theoretical analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 71(9), 3363–3366.
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K. & Paules, R. S. (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ. Health Perspect.*, 107 Suppl 1, 5–24.
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K. & Paules, R. S. (2000). Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic. Biol. Med.*, 28(9), 1387–1404.
- She, Q. B., Chen, N. & Dong, Z. (2000). ERKs and p38 kinase phosphorylate p53 protein at serine 15 in response to UV radiation. *J. Biol. Chem.*, 275(27), 20444–20449.
- She, Q. B., Ma, W. Y. & Dong, Z. (2002). Role of MAP kinases in UVB-induced phosphorylation of p53 at serine 20. *Oncogene*, 21(10), 1580–1589.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175(1), 184–191.
- SLS, Statistisches Landesamt Saarland (1995). *Sonderberechnung der Hautkrebsinzidenz (Melanom, Basalzellkarzinom, Plattenepithelkarzinom) 1970-1992 auf der Basis der Jahresberichte des Saarl. Krebsregisters altersstandardisiert für die Bundesrepublik Deutschland.* Statistisches Landesamt Saarland, Saarbrücken.
- Tyrrell, R. M. (1996). Activation of mammalian gene expression by the UV component of sunlight—from models to reality. *Bioessays*, 18(2), 139–148.

- Tyrrell, R. M. (1996). UV activation of mammalian stress proteins. *EXS*, 77, 255–271.
- van Beurden, P. A. Snoek & den Hoff, J. W. Von (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, 38(1), 73–83.
- van der Leun, J. C. & de Gruijl, F. R. (2002). Climate change and skin cancer. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 1(5), 324–326.
- Varani, J., Schuger, L., Dame, M. K., Leonard, C., Fligel, S. E., Kang, S., Fisher, G. J. & Voorhees, J. J. (2004). Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J. Invest Dermatol.*, 122(6), 1471–1479.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods*, 184(1), 39–51.
- Vindelov, L. & Christensen, I. J. (1990). An integrated set of methods for routine flow cytometric DNA analysis. *Methods Cell Biol.*, 33, 127–137.
- Vindelov, L. L. (1977). Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. A new method for rapid isolation and straining of nuclei. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, 24(3), 227–242.
- Wei, Y. D., Rannug, U. & Rannug, A. (1999). UV-induced CYP1A1 gene expression in human cells is mediated by tryptophan. *Chem. Biol. Interact.*, 118(2), 127–140.
- Westerdahl, J., Ingvar, C., Masback, A., Jonsson, N. & Olsson, H. (2000). Risk of cutaneous malignant melanoma in relation to use of sunbeds: further evidence for UV-A carcinogenicity. *Br. J. Cancer*, 82(9), 1593–1599.
- WHO, World Health Organization (1994). Environmental HEALTH CRITERIA 160 - Ultraviolet Radiation, siehe: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc160.htm>
- Willis, I., Menter, J. M. & Whyte, H. J. (1981). The rapid induction of cancers in the hairless mouse utilizing the principle of photoaugmentation. *J. Invest Dermatol.*, 76(5), 404–408.
- Wlaschek, M., Heinen, G., Poswig, A., Schwarz, A., Krieg, T. & Scharffetter-Kochanek, K. (1994). UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem. Photobiol.*, 59(5), 550–556.
- Won, K. A., Xiong, Y., Beach, D. & Gilman, M. Z. (1992). Growth-regulated expression of D-type cyclin genes in human diploid fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89(20), 9910–9914.
- Wood, R. D. (1996). DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 135–167.
- Woodhead, A. D., Setlow, R. B. & Tanaka, M. (1999). Environmental factors in nonmelanoma and melanoma skin cancer. *J. Epidemiol.*, 9(6 Suppl), S102–S114.
- Yanase, H., Ando, H., Horikawa, M., Watanabe, M., Mori, T. & Matsuda, N. (2001). Possible involvement of ERK 1/2 in UVA-induced melanogenesis in cultured normal human epidermal melanocytes. *Pigment Cell Res.*, 14(2), 103–109.
- Yang, X. H. & Zou, L. (2006). Checkpoint and coordinated cellular responses to DNA damage. *Results Probl. Cell Differ.*, 42, 65–92.
- Zebrowska, A., Narbutt, J., Sysa-Jedrzejowska, A., Kobos, J. & Waszczykowska, E. (2005). The imbalance between metalloproteinases and their tissue inhibitors is involved in the pathogenesis of dermatitis herpetiformis. *Mediators. Inflamm.*, 2005(6), 373–379.
- Zhang, Y., Dong, Z., Bode, A. M., Ma, W. Y., Chen, N. & Dong, Z. (2001). Induction of EGFR-dependent and EGFR-independent signaling pathways by ultraviolet A irradiation. *DNA Cell Biol.*, 20(12), 769–779.

6 Literatur

Zhao, J. F., Zhang, Y. J., Kubilus, J., Jin, X. H., Santella, R. M., Athar, M., Wang, Z. Y. & Bickers, D. R. (1999). Reconstituted 3-dimensional human skin as a novel in vitro model for studies of carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254(1), 49–53.

7 Abkürzungen

6-4-PP	(6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukt
8-OHdA	8-Hydroxydeoxyadenosin
8-OHdC	8-Hydroxydeoxycytosin
8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosin
AhR	Arylhydrocarbonrezeptor
AP1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATM	Proteine Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	ATM-Rad3-related
BER	Base Excision Repair
BPE	Bovine Pituitary Extract
BSA	Bovine Serum Albumin
CDK	Cyclin-dependent Kinase
CHK	Serine/threonine-protein Kinase Chk
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
c-Src	Proto-oncogene Tyrosine-protein Kinase Src
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinases 1 + 2
FACS	Fluorescence Associated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FICZ	6-Formylindolo[3,2-b]Carbazol
FITC	Fluorescein
Fos	Proto-oncogene Protein c-fos
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
HBSS	Hanks' balanced Salt Solution
HNK	Humane Normale Keratinozyten
HRP	Horseradish Peroxidase
IR	infra rot, bzw. Infra Rote Strahlung
JNK1/2	c-Jun NH ₂ -terminale Kinasen 1 + 2
Jun	C-Jun-amino-terminal Kinase-interacting Protein
LMP-Agarose	Low melting Point Agarose
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase

MED	Minimale erythemale Dosis
MEEO-Agarose	Mittlere Elektroendosmose-Agarose
MEK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEKK	Mitogen-activated protein Kinase Kinase
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NER	Nucleotide Excision Repair
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
p21	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A
p38	Mitogen-activated Protein Kinase p38
p53	Tumor Protein 53
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PP2A	Proteinphosphatase-2A
pRB	Retinoblastoma Protein
PS	Phosphatidylserin
Rad3	DNA Repair Helicase Rad3
Raf	Raf Kinase
Ras	GTPase NRas
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Replication Protein A
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodiumdodekylsulfat
TBST	Trisgepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
UV	ultra violett, bzw. Ultra Violette Strahlung
UVA	ultra violett A, bzw. Ultra Violette Strahlung A (320 - 400 nm)
UVB	ultra violett B, bzw. Ultra Violette Strahlung B (280 - 320 nm)
UVC	ultra violett C, bzw. Ultra Violette Strahlung C (100 - 280 nm)
XP	Xeroderma Pigmentosum

Eidesstattliche Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Schieke *et al.* (2005) veröffentlicht.

Düsseldorf, August 2007

Karsten Ruwiedel