
Mechanismen der Induktion der
Expression der Cyclooxygenase-2 durch
ultraviolette Strahlung in künstlicher
Epidermis

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

André Mahns

aus

Hamburg

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. Dr. Sies

Korreferent: Prof. Dr. Alfermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.05.2004

Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens
endet nicht mit einem Schlusspunkt,
sondern mit Fragezeichen.

«*Hermann Hesse*»

**Für meine Familie
und Maïke**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Haut	1
1.1.1 Die Haut als Organ	1
1.1.2 Die Morphologie der Haut	1
1.2 Ultraviolette Strahlung	5
1.3 Wechselwirkung von UV-Strahlung mit der Haut	7
1.3.1 DNA-Schäden und ihre Reparatur	7
1.3.2 UV als Stimulus für zelluläre Signaltransduktionskaskaden	9
1.3.3 Der Sonnenbrand	11
1.3.3.1 Die Cyclooxygenasen (COX)	14
1.3.4 Oxidativer Stress	18
1.3.4.1 Das Antioxidans-System	20
1.4 Ziele der Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Materialien	24
2.2 Methoden	26
2.2.1 Photobiologische Methoden	26
2.2.1.1 Bestrahlungsquellen	26
2.2.1.2 Dosimetrie	26
2.2.2 Proteinchemische Methoden	28
2.2.2.1 Erstellen der Proteinlysate	28
2.2.2.2 BCA-Proteinbestimmung	30
2.2.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung	30
2.2.2.4 Western-Blot	32
2.2.2.5 Immundetektion	33
2.2.2.6 Elution gebundener Antikörper von der Nitrocellulose-Membran	36
2.2.2.7 Bestimmung der Aktivität von c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK)	36
2.2.2.8 Densitometrische Auswertung	37
2.2.3 Analytische Methoden	37
2.2.3.1 Fluorimetrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid	37
2.2.3.2 Oxygraphische Bestimmung von Wasserstoffperoxid	40
2.2.3.3 Bestimmung der PGE ₂ -Konzentration	41

2.2.4 Zellbiologische Methoden	42
2.2.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen	42
2.2.4.2 Kultur der EpiDerm-Modelle	42
2.2.4.3 Isolierung humaner dermaler Fibroblasten	43
2.2.4.4 Einfrieren von Fibroblasten	44
2.2.4.5 Auftauen und Kultur der Fibroblasten	44
2.2.4.6 Passagieren der Fibroblasten	46
2.2.4.7 Zellzahlbestimmung	47
2.2.4.8 Bestimmung der Vitalität	47
2.2.4.9 Fixierung und Kernfärbung der Fibroblasten	49
2.2.4.10 Anfertigen von Paraffinschnitten	50
2.2.4.11 Anfertigen von Kryostatschnitten	52
2.2.4.12 Histologische Färbungen	52
2.2.4.12.1 Immunhistologische Detektion der Cyclooxygenase-2	52
2.2.4.12.2 Immunhistologische Detektion der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere	53
2.2.4.12.3 Hämatoxilin/Eosin Färbung	55
2.2.5 Molekularbiologische Methoden	55
2.2.5.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA)	55
2.2.5.2 Quantifizierung der isolierten RNA	56
2.2.5.3 Auftrennung der Ribonukleinsäuren im Agarosegel	56
2.2.5.4 Real-Time TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion	58
2.2.5.4.1 Design von Sonde und Primern	59
2.2.5.4.2 Optimierung der Real-Time TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion	60
2.2.5.4.3 Durchführung der Real-Time TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion	61
2.2.5.4.4 Auswertung und Quantifizierung der COX-2 mRNA	62

3. Ergebnisse **65**

3.1 Darstellung der Versuchsgrundlagen	65
3.1.1 Das EpiDerm-Modell als Zellsystem	65
3.1.2 UV-Spektren des Sonnensimulators	66
3.2 UV-Licht als Stimulus der Entzündungsreaktion	66
3.2.1 Wellenlängenabhängigkeit der COX-2 Expression	68
3.2.2 Wellenlängenabhängigkeit der PGE ₂ -Synthese	72
3.3 Aktivierung von Signalwegen durch UV im EpiDerm-Modell	72
3.3.1 Aktivierung des p38 ^{MAPK} -Signalweges	73
3.3.2 Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2	73
3.3.3 Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK)	76
3.4 Die Rolle der MAP-Kinasen in der Induktion der Cyclooxygenase-2	78
3.4.1 Induktion der Cyclooxygenase-2 durch simuliertes Sonnenlicht	78
3.4.2 Induktion der Cyclooxygenase-2 durch UVA-Licht	79

3.5 UV-Licht, reaktive Sauerstoffspezies und die Schädigung der Desoxyribonukleinsäuren (DNA).....	80
3.5.1 UV-Licht und reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	80
3.5.2 UV-Licht und die Schädigung der Desoxyribonukleinsäuren (DNA)	84
3.6 Die Rolle des oxidativen Stresses bei der durch UV-Licht induzierten COX-2 Expression.....	86
3.6.1 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Expression der COX-2	86
3.6.2 4-Hydroxynonenal und COX-2 Expression	87
3.6.3 Modulation der durch UV-Licht induzierten COX-2 Expression durch Antioxidantien	89
3.6.4 Einfluss von Antioxidantien auf die UV-bedingte MAP-Kinasen Aktivierung	92
4. Diskussion	95
<hr/>	
4.1 Abhängigkeit der Wirkung von UV-Licht von seiner Wellenlänge.....	95
4.1.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	95
4.1.2 Aktivierung der MAP-Kinasen	100
4.2 Expression der Cyclooxygenase-2 im EpiDerm-Modell.....	102
4.2.1 Wellenlängenabhängigkeit der Induktion der Cyclooxygenase-2 durch UV	102
4.2.2 Welcher Signalweg vermittelt die UV-induzierte COX-2 Expression? Gibt es Unterschiede hinsichtlich der SSL- und der reinen UVA-induzierten COX-2 Expression?	105
4.2.3 Die COX-2 Expression als alleinige Ursache des Sonnenbrandes?	108
4.3 Reaktive Sauerstoffspezies und COX-2 Expression.....	112
5. Zusammenfassung	117
<hr/>	
6. Literatur	118
<hr/>	

7. Anhang	133
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	133
7.2 Sequenzen.....	135
7.3 Curriculum vitae.....	139
7.4 Danksagung.....	140
7.5 Schriftenverzeichnis.....	141
7.6 Erklärung.....	142

1. Einleitung

1.1 Die Haut

Im Folgenden wird eine Übersicht über den Aufbau der Haut sowie ihrer Funktionen gegeben [CHUONG *et al.*, 2002; SPORNITZ, 1996; FRITSCH, 1998; LEONHARDT, 1990].

1.1.1 Die Haut als Organ

In der Lage der Haut, nämlich als ein den Organismus abgrenzendes Gewebe, liegt schon eine Vielzahl ihrer Funktionen begründet. Sie übt für den Körper eine Schutzfunktion vor verschiedensten Einflüssen chemischer, mechanischer, biologischer oder thermischer Natur aus, wobei insbesondere die äußerste Hautschicht (Epidermis), die in unmittelbarem Kontakt zur Außenwelt steht, zu diesen Schutzfunktionen beiträgt. Desweiteren fungiert die Haut als Träger der Vater-Pacinischen Tastkörperchen, Meissnerschen Körperchen, Merkelzellen und der freien Nervenendigungen als Sinnesorgan und dient darüber hinaus der Regulation von Körpertemperatur und Wasserhaushalt. Daneben gibt es noch eine Vielzahl weiterer Funktionen, wie die Beteiligung am Gasaustausch (Atmung) sowie der Regulation des Elektrolythaushaltes.

1.1.2 Die Morphologie der Haut

Mit einer Größe von ca. 1.5 m² bis 1.8 m² ist die Haut das größte Organ des menschlichen Körpers. Generell lässt sich die Haut in drei Bereiche gliedern, nämlich in die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Lederhaut, Corium) und die Subkutis (Unterhaut), wobei die letztere nicht mehr zur eigentlichen Haut gehört, aber dennoch mit ihr funktionell verbunden ist. Die Epidermis und Dermis werden auch unter dem Begriff Kutis zusammengefasst, wohingegen die Kutis zusammen mit der Subkutis die Hautdecke (*Integumentum commune*) bildet. Eine Übersicht ist in Abbildung 1-1 gegeben.

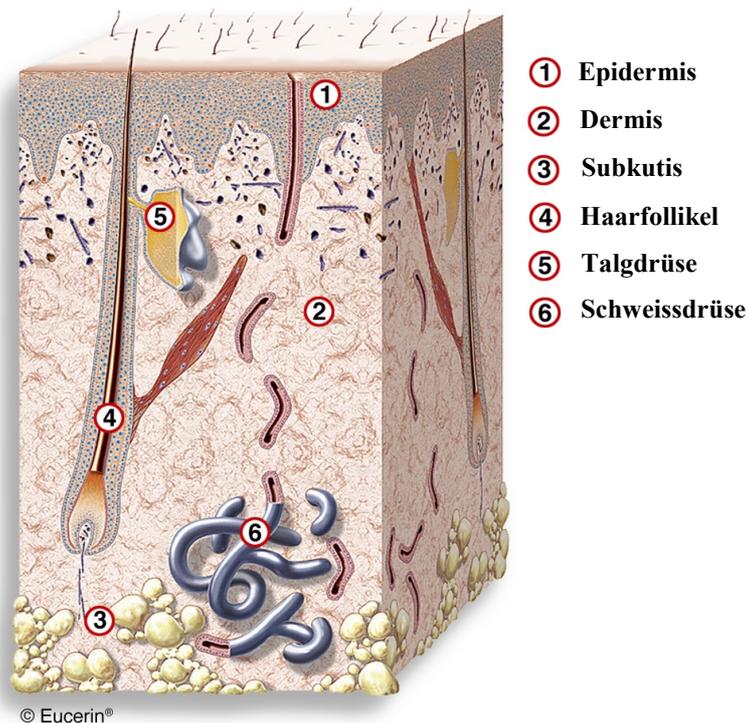


Abb. 1-1: Schematische Darstellung eines Hautquerschnittes (Informationsprospekt Eucerin®, Beiersdorf AG, Hamburg).

Bei der Epidermis handelt es sich um ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das in Abhängigkeit vom Hautareal eine Dicke von 0.04 mm bis 1.2 mm, in Schwielen sogar über 2 mm aufweist. Die prominenten Zellen der aus vier bis fünf lichtmikroskopisch unterscheidbaren Schichten aufgebauten Epidermis sind die Keratinozyten (Abb. 1-2). Diese Schichten spiegeln die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Keratinozyten wider. Wie fast alle Epithelien ist auch die Epidermis nicht vaskularisiert und wird durch das unter der Epidermis liegende Bindegewebe versorgt. Die am weitesten basal liegende epidermale Schicht wird als *Stratum basale* bezeichnet. Diese Schicht besteht aus hochprismatischen Zellen, die untereinander über Desmosomen und stellenweise durch Hemidesmosomen oder Zellausläufer (Wurzelfüßchen) mit der Basalmembran verbunden sind. Das Charakteristikum des *Stratum basale* ist die starke mitotische Aktivität dieser Zellen, die zur ständigen Erneuerung dieser Hautschicht beiträgt. Von den beiden Tochterzellen einer Mitose wandert eine als Keratinozyt in etwa 30 Tagen zur Oberfläche, dem *Stratum corneum*, während die andere im Kontakt mit der Basalmembran bleibt und sich erneut teilt. Die darauffolgende Schicht, das *Stratum spinosum*, ist durch vergrößerte runde oder polygonale Zellen charakterisiert, die durch stachelförmige Fortsätze über Desmosomen miteinander kommunizieren. Zwischen den einzelnen Zellen werden Interzellularspalten sichtbar. Im

Zytoplasma bilden intermediäre Filamente Tonofibrillen aus, die die Zugfestigkeit erhöhen. Auch im *Stratum spinosum* laufen noch Mitosen ab, so dass das *Stratum basale* und das *Stratum spinosum* auch als Regenerationsschicht (*Stratum germinativum*) bezeichnet werden. Die Keratinozyten des *Stratum granulosum* werden flacher und man beobachtet große Mengen der basophilen Keratohyalinkörner. Intrazellulär sind lamellierte, membranumschlossene 0.1 µm bis 0.5 µm große Granula vorhanden, deren lipidhaltiger Inhalt gemeinsam mit den Zellen der Hornschicht eine teils membranartige Barriere ausbildet, die verhindert, dass Körperflüssigkeit über den Interzellularraum verloren geht [ELIAS, 1983]. Desweiteren treten in dieser Schicht der Verlust von Zellorganellen sowie degenerative Kernveränderungen auf. Das darauffolgende *Stratum lucidum* läßt weder Zellkerne noch Zellgrenzen erkennen. Diese Schicht ist nur in einer sehr hohen Epidermis als durchgängige Schicht zu erkennen. Diese Schicht ist außerdem durch die starke Azidophilie gekennzeichnet. Die Epidermis wird von der Hornschicht, dem *Stratum corneum*, nach außen hin begrenzt. Diese Schicht zeigt keine Merkmale lebender Zellen und besteht aus mehreren Lagen extrem abgeflachter (ca. 0.5 µm dick und 30 µm lang) Hornzellen (Korneozyten). Im *Stratum corneum disjunctum* zerfällt die Hornschicht durch intakt gebliebene Enzyme, was zum Abschilfern der Hornzellen führt. Dabei werden täglich die 2-3 obersten Zellschichten abgestoßen.

Weitere Zelltypen, die überwiegend im *Stratum basale* und *Stratum spinosum* der Epidermis vorkommen, sind die Melanozyten, Langerhans-Zellen und die Merkelzellen. Die Langerhans-Zellen und die Melanozyten sind durch ihren stark dendritischen Charakter gekennzeichnet. Die Melanozyten haben die Aufgabe, durch die Synthese von Pigmenten die Regenerationsschicht zu schützen. Auf 4-12 basale Keratinozyten kommt ein Melanozyt. Die Ausläufer der Langerhans-Zellen können bis unter die Hornschicht reichen. Die Langerhans-Zellen kommen in ähnlicher Anzahl wie die Melanozyten in der Epidermis vor und stellen akzessorische Zellen des Immunsystems dar. Die Merkelzellen sind am Tastsinn beteiligt, indem sie synapsenartige Kontakte zu ummarkten afferenten Neuronen ausbilden. Die Merkelzellen kommen hauptsächlich an empfindlichen Hautstellen wie der Nasenspitze oder den Fingerbeeren vor.

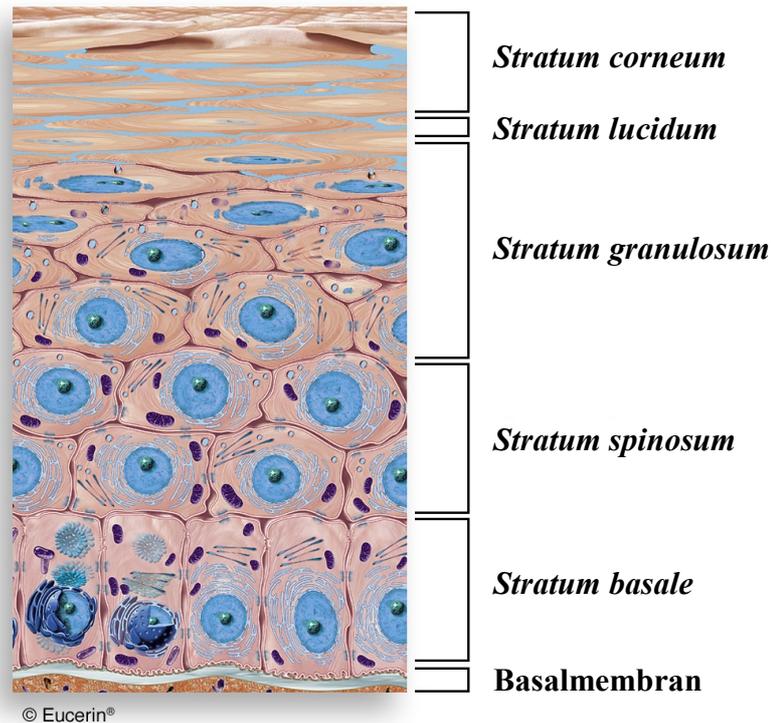


Abb. 1-2: Schematischer Querschnitt durch die Epidermis (Informationsprospekt Eucerin[®], Beiersdorf AG, Hamburg).

Die Anhangsgebilde der Haut, wie die Haare, die Nägel und die Drüsen, stellen Bildungen der Epidermis dar, an denen sich aber auch das Bindegewebe beteiligt.

Unter der Epidermis liegt die bindegewebige Dermis, die in Abhängigkeit vom Hautareal eine Dicke von bis zu 3 mm erreichen kann. In der Dermis, deren prominenter Zelltyp der Fibroblast darstellt, sind die meisten Sinneszellen lokalisiert, und sie ist der Ursprung der Körperhaare. Die Dermis, die sich aufgrund der Faseranordnung in die Bereiche *Stratum papillare* und *Stratum reticulare* untergliedern lässt, ist stark innerviert und vaskularisiert. Hinsichtlich der Zell- und Faserdichte verhalten sich beide Schichten reziprok, denn das *Stratum papillare* ist reich an Zellen und enthält weniger Fasern, wohingegen das *Stratum reticulare* wesentlich mehr Fasern bei einer geringeren Zelldichte aufweist. Zudem ist das *Stratum papillare* reich an Blutkapillaren und bildet papillenartige Ausstülpungen gegen die Epidermis. Dies führt zu einer Vergrößerung der Kontaktfläche zwischen Dermis und Epidermis und leistet damit einen Beitrag zur besseren Versorgung epidermaler Zellen. Die Papillen tragen zusätzlich zu einer stabilen Verzahnung von Epidermis und Dermis bei, so dass die Dichte der Papillen stark von der mechanischen Beanspruchung der Haut abhängig ist. Beide dermale Schichten weisen einen hohen Gehalt an wasserbindenden

Glykosaminoglykanen (Hyaluronsäure) auf. Neben den ortsständigen Fibroblasten befinden sich in der Dermis weitere Bindegewebszellen sowie Zellen der Immunabwehr (Leukozyten, Plasmazellen, Makrophagen und Mastzellen)

Die Subkutis ist ein fettgewebsreiches Bindegewebe, das die Verbindung zwischen der Haut (Kutis) und der oberflächlichen Körperfazie herstellt. Die Subkutis ermöglicht die Verschiebbarkeit der Haut. Diese Schicht dient im wesentlichen der Speicherung von Bau- oder Depotfett sowie der Isolation. In der Subkutis liegt der Ursprung der Terminalhaare.

1.2 Ultraviolette Strahlung

Das auf die Erdoberfläche treffende Sonnenlicht lässt sich in ultraviolettes, sichtbares und Infrarotlicht untergliedern. Dabei wird die elektromagnetische Strahlung der Wellenlängen zwischen 290 nm und 400 nm als ultraviolettes (UV) Licht bezeichnet. Das Licht geringerer Energie und mit größerer Wellenlänge (400 nm bis 740 nm) kann vom menschlichen Auge wahrgenommen werden und wird daher als sichtbares Licht bezeichnet. Als Infrarotlicht bezeichnet man schließlich das Licht größerer Wellenlängen ab 740 nm und kann vom menschlichen Körper nur als Wärmestrahlung wahrgenommen werden [ATKINS, 1993; ECKERT, 1993]. Die prozentuale Verteilung dieser drei auf die Erdoberfläche treffenden Bereiche am Gesamtspektrum des Sonnenlichtes ist in Tabelle 1-1 wiedergegeben.

Tab. 1-1: Darstellung der prozentualen Anteile der spektralen Bereiche am Gesamtspektrum des auf die Erde treffenden Sonnenlichtes.

(100% = ca. 1.1 kW/m², nach FINKEL, 1995)

<i>Spektraler Bereich</i>	<i>Anteil an der Gesamtstrahlung (%)</i>
Sichtbares Licht	52
Infrarotlicht	42
UV-Licht	6
UVA-Licht	5.6
UVB-Licht	0.4

1. Einleitung

Die ultraviolette Strahlung umfasst die elektromagnetische Strahlung eines Bereiches von ungefähr 30 nm bis 400 nm. Dieser Bereich lässt sich wiederum in das Vakuumultraviolette (30 bis 180 nm), das UVC- (180 bis 290 nm), das UVB- (290 bis 320 nm) und das UVA-Licht (320 bis 400 nm) untergliedern. Das Vakuumultraviolette Licht existiert nur im Weltraum und das gesamte UVC-Licht sowie ein Teil des UVB-Lichtes werden von der Ozonschicht der Stratosphäre absorbiert, so dass natürlicherweise nur ein Teil des UVB und UVA die Erdoberfläche erreichen. Diese beiden UV-Qualitäten machen zusammen nur ca. 6% der auf die Erde treffenden Intensität aus, wobei 5,6% davon innerhalb des UVA-Bereiches liegen. Eine Übersicht des elektromagnetischen Spektrums ist in Abbildung 1-3 gegeben.

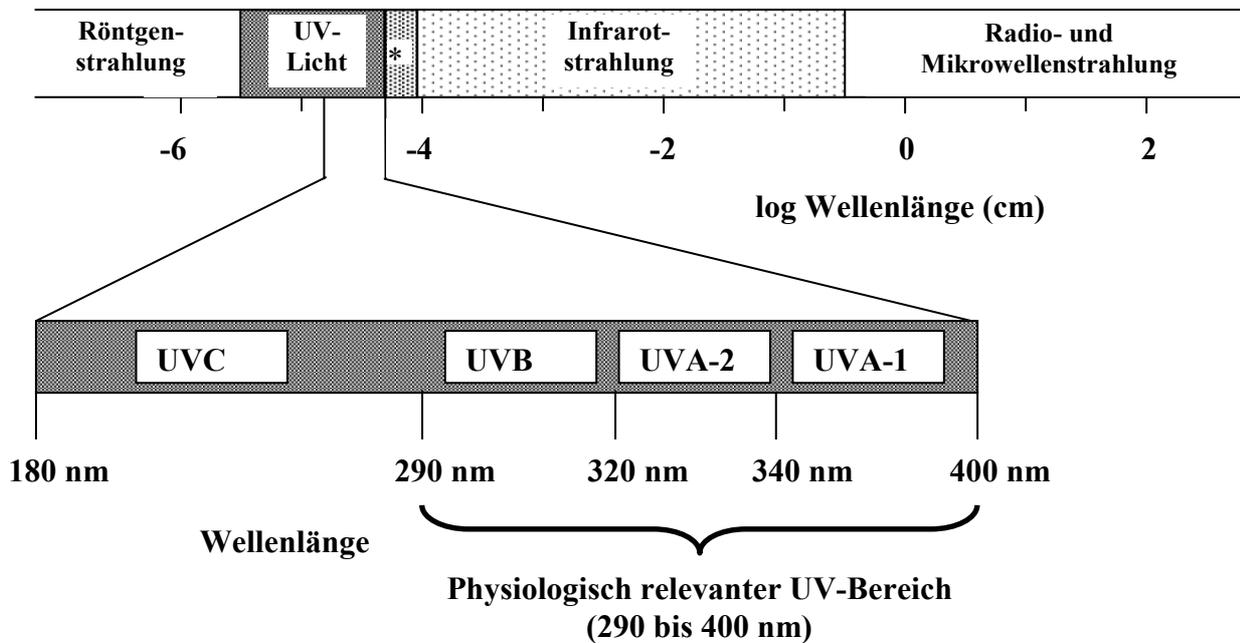


Abb. 1-3: Darstellung des elektromagnetischen Spektrums. *) Bereich des sichtbaren Lichtes

1.3 Wechselwirkung von UV-Strahlung mit der Haut

Das die Erdoberfläche erreichende UV-Licht wird zu einem Anteil von ca. 5% von der menschlichen Haut reflektiert [EICHLER und SEILER, 1991], und die verbleibenden 95% dringen, in Abhängigkeit ihres Energiegehaltes, unterschiedlich stark in die Haut ein. Die UVB-Strahlung dringt dabei nur in die Schichten der Epidermis ein und wird in ihr vollständig absorbiert, wohingegen das langwelligere UVA-Licht sogar bis in die Bereiche der reticulären Dermis vordringt [BRULS *et al.*, 1984]. Im Energiegehalt und damit in der unterschiedlichen Eindringtiefe beider UV-Qualitäten liegen auch die Unterschiede hinsichtlich ihrer physiologischen Wirkung auf die Haut begründet. Neben einer Reihe pathophysiologischer Wirkungen des UV-Lichtes, die mit einer akuten oder chronischen Exposition einhergehen, aktiviert das UV-Licht auch eine Reihe physiologisch wichtiger Vorgänge, wie z. B. die Biosynthese von Vitamin D₃ (Cholecalciferol), das durch UV-Licht aus dem Provitamin D₃ (7-Dehydrocholesterin) entsteht. Das Cholecalciferol wird durch Hydroxylierung in das aktive Hormon Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) umgewandelt, das zusammen mit dem Parathormon und dem Calcitonin den Calcium-Stoffwechsel steuert [STRYER, 1995]. Im Folgenden wird auf einzelne pathophysiologische Wirkungen des UV-Lichtes eingegangen.

1.3.1 DNA-Schäden und ihre Reparatur

Verschiedene Umweltfaktoren, wie z.B. chemische Agenzien, Zigarettenrauch und das UV-Licht, führen zu Veränderungen der Erbinformation und wirken daher mutagen. Typische DNA-Schäden reichen von Strangbrüchen und Strangverknüpfungen über kovalente Verknüpfungen benachbarter Basen bis zu oxidativen Veränderungen der Basen. Die Schädigung der DNA führt unmittelbar zu eingeschränkter Transkription und über die Aktivierung bestimmter Sensoren für DNA-Schäden (DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK), Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) und p53) werden letztendlich Reparaturmechanismen aktiviert oder die Apoptose eingeleitet.

Der wohl wichtigste Umweltfaktor, der in der Haut zu DNA-Schädigungen führt, ist das UV-Licht. Die schädigende Wirkung beruht entweder auf einer direkten Absorption von Lichtenergie aus dem UVB-Bereich durch die DNA oder auf oxidativen Veränderungen durch

reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Die DNA absorbiert Lichtenergie aus einem Bereich von unter 200 nm bis ungefähr 300 nm, wobei die Lichtenergie unter 200 nm vom DNA-Rückgrat absorbiert wird und die Basen mit einem Maximum bei 260 nm Lichtenergie der Wellenlänge zwischen 200 nm und 300 nm absorbieren. Typische DNA-Veränderungen, die mit der direkten Absorption der Lichtenergie einhergehen, sind neben Strangbrüchen und Strangverknüpfungen die kovalenten Verknüpfungen benachbarter Pyrimidinbasen, die zur Ausbildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) und Pyrimidin-(4-6)-Pyrimidon Photoaddukten führt [FREEMAN *et al.*, 1989; DOUKI *et al.*, 1999; ROSENSTEIN UND MITCHELL, 1987]. Die energieärmeren UVA-Strahlen können nicht direkt einen DNA-Schaden auslösen, sondern wirken über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) DNA-schädigend [CADET *et al.*, 1992]. Dabei wird die Lichtenergie zunächst von endogenen Chromophoren, wie Porphyrinen, Flavinen und bestimmten Chinonen absorbiert und schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen, aus dem reaktive Sauerstoffspezies entstehen [KLOTZ *et al.*, 2001; MAHNS *et al.*, 2003]. Diese ROS können dann schädigend auf zelluläre Makromoleküle, wie beispielsweise die DNA wirken, so dass präferentiell das modifizierte Nukleosid 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8-oxodG) entsteht [ZHANG *et al.*, 1997; KIELBASSA *et al.*, 1997]. Die Wirkung beider UV-Qualitäten zeigt Überschneidungsbereiche, und so kann auch das UVB-Licht über die Bildung von ROS zu oxidativen Veränderungen der Erbinformation führen [STEWART *et al.*, 1996]. Auf der anderen Seite ist auch unter der energieärmeren UVA-Strahlung die Bildung von CPD beobachtet worden [ROCHETTE *et al.*, 2003].

Verschiedene Reparaturmechanismen, wie die Reparatur über die homologe Rekombination, der Basenaustausch über spezifische Enzyme („base excision repair“ (BER)) sowie der Austausch ganzer Nukleotidsequenzen durch Multienzymkomplexe („nucleotide excision repair“ (NER)) dienen dem Erhalt der Erbinformation. Entgehen die DNA-Veränderungen der Reparatur, so werden die daraus folgenden Basenveränderungen durch nachfolgende Replikationen manifest, und es entstehen Mutationen.

Verschiedene humane Syndrome, wie z.B. Xeroderma Pigmentosum (XP) und das Cockayne Syndrom (CS) zeigen die hohe Bedeutung der DNA-Reparatur. In beiden Fällen haben Mutationen dazu geführt, dass der Multienzymkomplex für den Austausch ganzer Nukleotidsequenzen (NER) nur noch eingeschränkt oder gar nicht mehr funktioniert [DE BOER und HOEIJMAKERS, 2000]. Die Folge sind eine erhöhte UV-Empfindlichkeit und im Falle des XP-Syndroms ein 1000fach erhöhtes Risiko, Hauttumore (Basalzell- und

Plattenepithelkarzinom sowie Melanom) auszubilden. Die Beobachtung, dass Patienten, die an CS leiden, eine höhere UV-Empfindlichkeit aufweisen als XP-Patienten, zeigt, dass insbesondere die Bildung von CPD und/oder (4-6)-Photoaddukten in Bereichen hoher transkriptioneller Aktivität zu einer gesteigerten UV-Sensitivität führt. Der menschliche Organismus verfügt über zwei verschiedene Wege des Nukleotidaustausches, der eine wird durch die Bindung des Proteins HHR23B („human homolog of Rad23“) sowie des Proteins XPC („Xeroderma Pigmentosum Protein C“) an den DNA-Schaden eingeleitet und dient der Reparatur von Schäden innerhalb des gesamten Genoms („global genome NER“, GG-NER). Ein zweiter Weg wird durch die RNA-Polymerase II selbst initiiert, wenn sie während der Transkription auf einen DNA-Schaden trifft und dieser die Transkription inhibiert. Zusammen mit der RNA-Polymerase II vermitteln weitere Proteine („Cockayne Syndrom Protein A“ (CSA) oder „Cockayne Syndrom Protein B“ (CSB)) den Austausch entsprechender Nukleotidsequenzen. Diese Art der Reparatur ist folglich nur auf die transkribierten Bereiche beschränkt und wird daher als TC-NER („transcription-coupled NER“) bezeichnet. Bei CS ist durch Mutationen innerhalb der für CSA und/oder CSB codierenden Gene die TC-NER eingeschränkt oder ausgeschaltet, wohingegen beim Xeroderma Pigmentosum Syndrom Mutationen innerhalb der sieben XP-Gene (XPA bis XPG) beide Wege der NER einschränken oder gar ausschalten [DE BOER und HOEIJMAKERS, 2000]. XPC-defiziente Mäuse, bei denen ausschließlich die GG-NER inhibiert ist, TC-NER jedoch uneingeschränkt funktioniert, zeigen eine normale UV-Empfindlichkeit, so dass diese Ergebnisse zusammen mit der beobachteten erhöhten UV-Empfindlichkeit im Cockayne Syndrom, in dem ausschließlich die TC-NER eingeschränkt ist, darauf hinweisen, dass eine UV-Empfindlichkeit auf der Hemmung transkriptionell aktiver Gene beruht [BERG *et al.*, 1998].

1.3.2 UV als Stimulus für zelluläre Signaltransduktionskaskaden

Die Übertragung extrazellulärer Signale in das Zellinnere wird als Signaltransduktion bezeichnet. Sie dient dem vielzelligen Organismus neben der intrazellulären Steuerung einer Reihe von physiologischen Vorgängen auch der interzellulären Kommunikation und ist daher ein essentieller Mechanismus, veränderte Umweltbedingungen wahrzunehmen und darauf im Sinne der Entwicklung und Erhaltung des gesamten Organismus zu reagieren. Gerade die Haut ist als ein den Körper umschließendes Organ ständig veränderten Umwelteinflüssen, wie Temperatur, UV-Licht, mechanischen Einflüssen oder dem Befall von Pathogenen ausgesetzt,

also physikalischen, chemischen und biologischen Noxen, auf die die Haut im Sinne einer Anpassung oder Abwehr reagieren muss. Die Signaltransduktion dient also der Wahrnehmung, Verarbeitung und Reaktion auf veränderte Bedingungen und umfasst eine Vielzahl von Proteinen, die sich in ihrer enzymatischen Aktivität netzwerkartig beeinflussen, wobei am Ende die Reaktion, etwa im Sinne einer modulierten Genexpression, steht.

Eine Gruppe von Proteinkinasen, die als MAP-Kinasen („mitogen-activated protein kinases“) bezeichnet werden, sind an der Vermittlung von UV-Effekten in der Haut beteiligt [KLOTZ *et al.*, 2001; BRENNISEN *et al.*, 2002]. Zu den drei wichtigsten Familien von MAP-Kinasen gehören die ERK („extracellular signal regulated protein kinases“), JNK („c-Jun N-terminale protein kinases“) und p38^{MAPK}, wobei jede Familie aus einer unterschiedlichen Anzahl von Subtypen besteht. Die Aktivierbarkeit der JNK und p38^{MAPK} durch Stressoren, wie osmotischen Schock, Hitzeschock, UV-Licht und inflammatorische Cytokine, führte zu ihrer Bezeichnung als Stress-aktivierte Proteinkinasen. Bei den MAP-Kinasen handelt es sich um Serin/Threonin-Kinasen, die ihrerseits durch doppelte Phosphorylierung an Threonin- und Tyrosinresten aktiviert werden. Dabei ist ihnen ein Thr-X-Tyr-Motif in der Aktivierungsregion gemeinsam. Die Signalwege der MAP-Kinasen sind in gleicher Art hierarchisch gegliedert und umfassen zwei weitere Arten von Kinasen, die ihnen bezüglich der Regulation vorangestellt sind und als MAP-Kinase Kinase (MKK) und MAP-Kinase Kinase Kinase (MKKK) bezeichnet werden. Die MAP-Kinasen selbst werden auch als nukleäre Shuttle-Kinasen bezeichnet, da sie nach Aktivierung im Kern eine Reihe unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und damit schließlich die Antwort im Sinne der veränderten Genexpression induzieren (Abb. 1-4). Die Fähigkeit der unterschiedlichen MAP-Kinasen, gleiche Ziele zu aktivieren und das Vorhandensein von Brückenproteinen zeigen zudem eine große Vernetzung, die zwischen den Wegen der MAP-Kinasen besteht. Aufgrund der Breite an unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren, die durch die MAP-Kinasen aktiviert werden, unterliegen Vorgänge der Differenzierung und Entwicklung, Apoptose, Entzündung und Aktivierung der Immunabwehr der Regulation durch MAP-Kinasen.

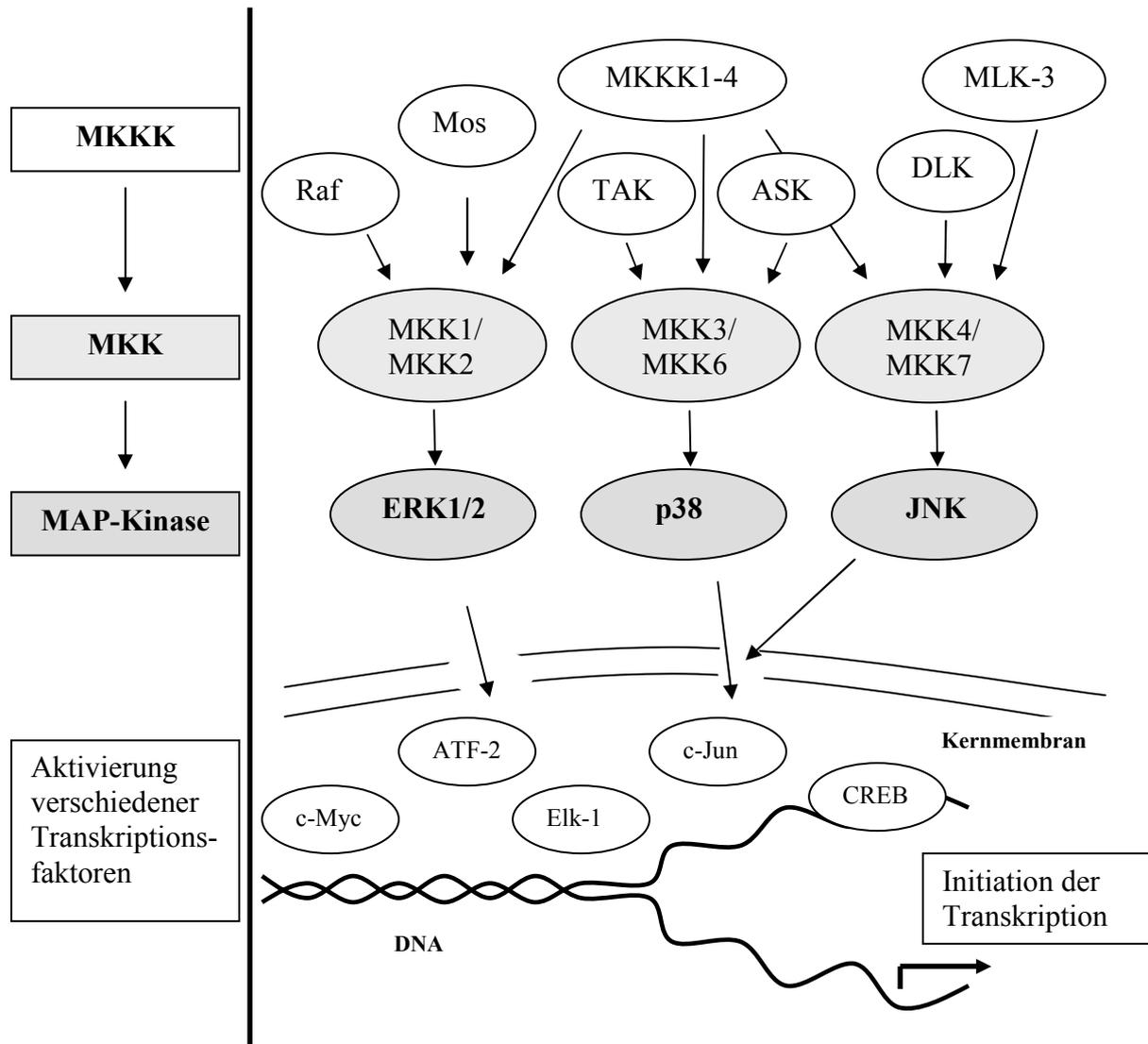


Abb. 1-4: Schematische Darstellung der drei bekanntesten MAP-Kinasewege. Verschiedene MKKK aktivieren durch Phosphorylierung die MAP-Kinasen Kinasen (MKK). Diese wiederum sind hierarchisch den MAP-Kinasen übergeordnet. Durch die doppelte Phosphorylierung der MAP-Kinasen an Threonin-/Tyrosinresten durch die MEK werden diese aktiviert und können im Zellkern verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren, die die Zellantwort über die Genexpression steuern.

1.3.3 Der Sonnenbrand

Das UV-Licht ist in der Lage, unterschiedliche Reaktionen in der Haut hervorzurufen. So kann die akute Exposition neben der Stimulierung der Hautbräune (Pigmentierung), der Immunsuppression und der epidermalen Hyperplasie (Lichtschwielen) ebenfalls zur Ausbildung eines Erythems (Sonnenbrand) führen. Daneben führt eine chronische UV-

Exposition zu Hautalterungen und zur Entstehung von Hautkarzinomen [SOTER, 1990; HAWK und PARRISH, 1983]. Der Sonnenbrand wird auch als UV-induzierte Dermatitis (Dermatitis solaris) bezeichnet und ist durch eine Reihe physiologischer, biochemischer und histologischer Veränderungen in der Haut gekennzeichnet. Die Merkmale sind eine mit der verstärkten Durchblutung einhergehende Rötung (Erythema solare), verbunden mit Wärmegefühl und Schmerz, wobei im akuten Fall noch das Auftreten eines Ödems oder Juckreiz hinzukommen. Die UV-Dosis, die 24 Stunden nach Bestrahlung zur Ausbildung einer gerade sichtbaren Rötung der Haut führt, ist individuell verschieden und wird als minimale erythemale Dosis (MED) bezeichnet.

Als biochemische Grundlage dieser typischen Merkmale sieht man die UV-induzierte Entzündungsreaktion in der Haut, da anti-inflammatorische Medikamente (NSAID), wie z. B. Indomethacin, in der Lage sind, die Ausbildung eines UV-Erythems zu reduzieren [SNYDER, 1975]. Die Schlüsselenzyme der Entzündungsreaktion stellen die Cyclooxygenasen dar, die in einer zweistufigen Reaktion aus dem Arachidonsäurepool der Membranen einen Vorläufer der Prostaglandine und Thromboxane, das PGH_2 , synthetisieren [RUZICKA und PRINTZ, 1984; NEEDLEMAN *et al.*, 1986]. Eine schematische Darstellung der Metabolisierung der Arachidonsäure in die Prostaglandine ist in Abbildung 1-5 gegeben. Die entstehenden Prostaglandine werden für die Ausbildung eines Erythems verantwortlich gemacht, da sie dessen Ursache, nämlich die Erweiterung der Blutgefäße sowie die Erhöhung ihrer Permeabilität, bewirken. Das Resultat ist eine Durchblutungssteigerung und Ödembildung infolge erhöhter Filtration. Durch die intradermale Injektion von sowohl gereinigter Phospholipase A_2 als auch von Arachidonsäure und der Prostaglandine I_2 , E_2 und D_2 konnte ihre Relevanz hinsichtlich der Entstehung eines Erythems bestätigt werden [VADAS *et al.*, 1981; FLOWER *et al.*, 1976]. Andererseits ist auch die UV-abhängige Aktivierung der Phospholipase A_2 [COHEN und DELEO, 1993] und der Cyclooxygenase-2 [BUCKMAN *et al.*, 1998], also des Entzündungsweges, der zur Bildung der Prostaglandine führt, bestätigt. Als Schlüsselenzyme dieser Entzündungsreaktion spielen die Cyclooxygenasen eine wichtige Rolle, so dass auf ihre Eigenschaften und Funktionen gesondert unter 1.3.3.1 eingegangen wird.

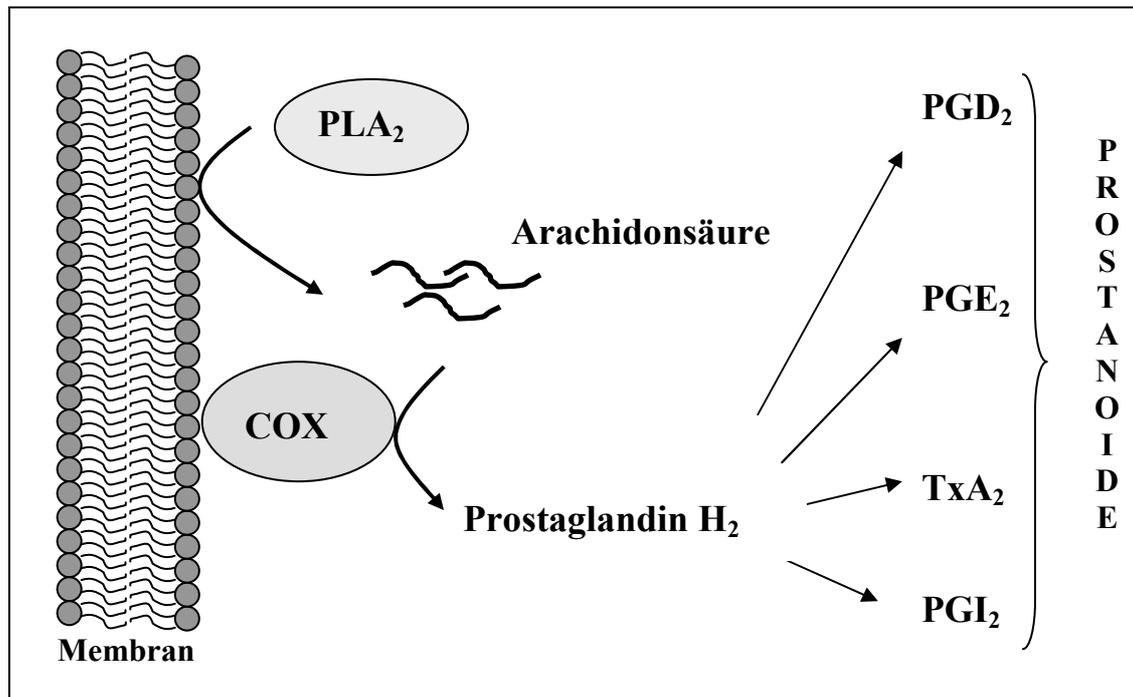


Abb. 1-5: Schematische Darstellung der Entzündungsreaktion. Die Arachidonsäure wird durch die Phospholipase A₂ (PLA₂) aus Membranlipiden freigesetzt und steht dann der Cyclooxygenase (COX) als Substrat zur Verfügung. Die Cyclooxygenasen setzen die Arachidonsäure in einer zweistufigen Reaktion in das frei lösliche Prostaglandin H₂ um, das wiederum Substrat für die in Abhängigkeit vom Zelltyp exprimierten Prostaglandin-Synthasen und Thromboxan-Synthasen ist. Die gebildeten Prostaglandine und Thromboxane (PGE₂, PGD₂, TxA₂ und PGI₂) werden auch unter dem Begriff Prostanoiden zusammengefasst.

Zu den histologischen Veränderungen zählen insbesondere die Bildung sogenannter „sunburn cells“ in der Epidermis. Bei diesen Zellen handelt es sich um UV-geschädigte Keratinozyten, die zytoplasmatisch vergrößert sind und innerhalb von 24-72 Stunden der Apoptose unterliegen. Solche „sunburn cells“ sind überwiegend im basalen bis suprabasalen Bereich der Epidermis zu finden. Ein weiteres Charakteristikum neben dem Auftreten der „sunburn cells“ und der sukzessiven Verringerung der Anzahl an Langerhans-Zellen ist das Auftreten eines interzellulären Ödems [GILCHREST *et al.*, 1981]. In der Dermis kommt es ebenfalls zur Bildung von interzellulären Ödemen und zur Aktivierung und Vergrößerung von Endothelzellen, Erscheinungen, die sogar durch die reticuläre Dermis bis in die Subkutis sichtbar werden. Zudem kommt es zur Einwanderung immunkompetenter Zellen [GILCHREST *et al.*, 1981].

Auch bezüglich des Sonnenbrandes sind Unterschiede zwischen dem UVB- und UVA-Licht vorhanden. Klassischerweise schrieb man ausschließlich dem UVB-Licht zu, einen

Sonnenbrand, definiert durch die Ausbildung sogenannter „sunburn cells“ in der Epidermis, auszulösen [WILLIS und CYLUS, 1977]. Doch wurden diese Zellveränderungen, wenn auch deutlich abgeschwächt, ebenfalls nach reiner UVA-Exposition beobachtet [KUMAKIRI *et al.*, 1977]. Weitere histologische Unterschiede treten infolge einer UVB- oder UVA-Exposition auf [GILCHREST *et al.*, 1983]. Betrachtet man hingegen die physiologischen Grundlagen des Sonnenbrandes im Sinne einer erhöhten Prostaglandinsynthese, so ist die Initiierung einer UV-induzierten Entzündungsreaktion sowohl infolge einer UVA-Exposition [HAWK *et al.*, 1983] als auch einer reinen UVB-Exposition bestätigt [BLACK *et al.*, 1976]. Ein großer Unterschied beider UV-Qualitäten liegt jedoch in ihrer Effizienz, ein Erythem auszulösen. Das UVB-Licht wirkt nämlich ungefähr 1000fach stärker erythematogen als das UVA-Licht [WARIN, 1978], und auch die zeitlichen Verläufe der unterschiedlich ausgelösten Erytheme unterscheiden sich [BACHEM, 1954].

1.3.3.1 Die Cyclooxygenasen (COX)

Die Cyclooxygenasen (COX), auch Prostaglandin-Endoperoxid-Synthasen (E.C. 1.14.99.1) genannt, sind die Schlüsselenzyme für die Biosynthese der Prostanoiden. Es handelt sich bei diesen Enzymen um Dioxygenasen, die in einem ersten Schritt zwei Sauerstoffmoleküle an Position C11 und C15 der Arachidonsäure einfügen. Dabei entsteht das enzymgebundene Zwischenprodukt PGG₂. In der Folgereaktion wird durch die Peroxidaseaktivität dieser Enzyme die 15-Hydroperoxygruppe über die Aufnahme zweier Elektronen zur 15-Hydroxylgruppe reduziert. Das daraus entstehende PGH₂ ist frei löslich und stellt das Substrat weiterer PGH₂ metabolisierender Enzyme dar [RUZICKA und PRINTZ, 1984].

Die Entdeckung, dass die Cyclooxygenaseaktivität eine Schlüsselfunktion in der Entzündungsreaktion ausübt, geht bis in das Jahr 1971 zurück, in dem Vane publizierte, dass die Wirkung der anti-inflammatorischen Medikamente, wie Aspirin, auf die Inhibierung der Prostaglandinsynthese zurückzuführen sei [VANE, 1971]. Tatsächlich ist der zugrundeliegende Wirkmechanismus aller therapeutisch eingesetzten nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs) gleich, indem sie die Cyclooxygenaseaktivität inhibieren [SIMON, 1996]. Im Jahre 1976 wurde die Cyclooxygenase erstmals aufgereinigt [MIYAMOTO *et al.*, 1976], und dreizehn Jahre später wurde die humane Cyclooxygenase kloniert [YOKOYAMA und TANABE, 1989]. Weitere drei Jahre später wurde eine humane Isoform der Cyclooxygenase kloniert, die im

Gegensatz zur bereits bekannten Isoform durch verschiedene Stimuli induzierbar ist und sich auch in vielen anderen Punkten von dieser unterscheidet [HLA und NEILSON, 1992; O'BANION *et al.*, 1992]. Um beide Isoformen voneinander zu unterscheiden, wurde die Erstentdeckte als Cyclooxygenase-1, die 1992 klonierte und induzierbare Isoform als Cyclooxygenase-2 bezeichnet. Beide Isoformen sind membrangebundene Glykoproteine, die sich in ihrer Sequenz sehr ähnlich sind und die gleichen katalytischen Eigenschaften zeigen. Eine Aminosäuresubstitution (Ile⁵²³ zu Val) in der Substratbindungstasche ist zum einen für die Selektivität der COX-Inhibitoren und zum anderen für die Eigenschaft der COX-2, neben der Arachidonsäure die Umsetzung weiterer Carbonsäuren zu katalysieren, verantwortlich [LUONG *et al.*, 1996; GARAVITO und MULICHAK, 2003]. Die COX-1 ist in nahezu allen Geweben konstitutiv vorhanden, wohingegen unter normalen Umständen die COX-2 in den meisten Geweben nicht detektierbar ist [VANE *et al.*, 1998].

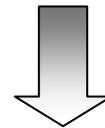
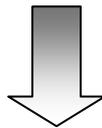
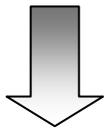
Die Tatsache, dass die Stimuli, die neben Wachstumsfaktoren zur transienten COX-2 Induktion führen, hauptsächlich aus dem Bereich der Entzündungsreaktion kommen (Lipopolysaccharid (LPS), pro-inflammatorische Cytokine sowie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und Interferon- γ (IFN- γ)), macht die COX-2 Aktivität neben der Kontrolle des Zellwachstums auch für die beobachteten entzündlichen Vorgänge verantwortlich. Auf der anderen Seite führen anti-inflammatorische Cytokine sowie Kortikosteroide zur Reduktion der COX-2 Expression, was die Bedeutung der COX-2 vermittelten Prostanoidsynthese in entzündlichen Prozessen unterstützt. Eine Reihe von transkriptionell regulatorischen Sequenzen (NF- κ B-, AP-2-, SP1-, Ets-1- und CRE-Bindungsstellen), die dem Cox-2 Gen vorgeschaltet sind, regulieren die starke Induzierbarkeit dieses Enzyms [APPLEBY *et al.*, 1994]. Neben der pathophysiologischen Bedeutung der COX-2 vermittelten Prostanoidsynthese im Bereich der Entzündungsreaktion zeigten weitere Untersuchungen einen starken Zusammenhang zwischen einer chronischen COX-2 Expression und der Entstehung und Entwicklung von Tumoren. Dabei ist zum einen in malignen Tumoren die COX-2 stark exprimiert [BUCKMANN *et al.*, 1998] und zum anderen führt die selektive Inhibition der (i) COX-2 Expression und der (ii) COX-2 Aktivität zu einer starken Reduktion des Wachstums von epidermalen Tumorzellen [HIGASHI *et al.*, 2000]. Ebenfalls konnte durch die Einnahme eines nicht-selektiven NSAID (Sulindac) sowohl die Anzahl als auch die Größe entstehender Polypen in Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) verringert werden [GIARDIELLO *et al.*, 1993]. Es wird vermutet, dass ein unkontrolliertes Tumorstadium mit nachfolgender Metastasierung in der COX-2 vermittelten Inhibition

der Apoptose sowie der Stimulierung der Angiogenese begründet liegen [LIU *et al.*, 1998; NEUFANG *et al.*, 2001]. Neben der pathophysiologischen Bedeutung der induzierbaren COX-2 Expression (Entzündung, Morbus Alzheimer und Krebs) ist aber auch zunehmend die physiologische Bedeutung der COX-2 Aktivität in einigen Bereichen, wie der Niere, der Reproduktion sowie der Wundheilung beschrieben worden [VANE *et al.*, 1998; HINZ und BRUNE, 2002]. Über die beobachteten Nebenwirkungen (z.B. Ulceration und Störung der Thrombozytenaggregation) bei der längeren Einnahme nicht-selektiver NSAIDs schloss man auf die Rolle der konstitutiven COX-1 Aktivität, die über die stetige Prostanoidsynthese der Aufrechterhaltung einiger physiologischer Vorgänge dient und eine Art „house-keeping enzyme“ darstellt. [VANE *et al.*, 1998; CROFFORD, 1997].

Die Beobachtung, dass Paracetamol ausschließlich antipyretisch und analgetisch, aber nicht antiphlogistisch wirkt, erklärte sich im Jahre 2002 mit der Entdeckung einer weiteren COX Isoform, der COX-3 sowie zwei kleineren COX-1 Varianten (pCOX-1a und pCOX-1b) [CHANDRASEKHARAN *et al.*, 2002]. Es zeigte sich nämlich, dass das Paracetamol präferentiell diese neu entdeckte und überwiegend im zentralen Nervensystem und Herzmuskel exprimierte Isoform hemmt und die entzündungsvermittelte COX-2 Aktivität nur wenig beeinflusst. Die Eigenschaften der drei Isoformen sowie die Wirkung ihrer Hemmung durch NSAIDs wurden in der Abbildung 1-6 zusammengefasst.

COX-1	COX-2	COX-3
<p><u>Eigenschaften</u></p> <p>Gen: Chromosom 9, 22kb Protein: 71kDa Sonstiges: konstitutiv exprimiert</p>	<p><u>Eigenschaften</u></p> <p>Gen: Chromosom 1, 8.3kb Protein: 71kDa Sonstiges: induzierbar</p>	<p><u>Eigenschaften</u></p> <p>Gen: Chromosom 9, 22kb Protein: 65kDa Sonstiges: konstitutiv exprimiert, Variante der COX-1</p>
<p><u>Funktion</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Schutz der Mukosa • Thrombozytenaggregation • Renaler Blutfluss 	<p><u>Funktion</u></p> <p>a) pathophysiologisch</p> <ul style="list-style-type: none"> • Morbus Alzheimer • Entzündungsreaktionen, Schmerz und Fieber • Tumorigenese <p>b) physiologisch</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nierenfunktion • Wundheilung • Reproduktion 	<p><u>Funktion</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Schmerz und Fieber, weiteres noch ungeklärt.

Hemmung durch NSAIDs



<p>Das breite Spektrum der beobachteten Nebenwirkungen, wie:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Blutungen, Ulceration und Perforation im Gastrointestinaltrakt • Störung der Thrombozytenaggregation 	<ul style="list-style-type: none"> • Antiphlogistisch • Analgetisch • Antipyretisch • Protektiv gegenüber der Tumorigenese • Protektiv gegenüber der Ausbildung von Morbus Alzheimer <p>Nebenwirkungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Störungen im Bereich der Reproduktion 	<ul style="list-style-type: none"> • Analgetisch • Antipyretisch
--	---	--

Abb. 1-6: Darstellung einiger Eigenschaften und Funktionen der Cyclooxygenasen sowie die Wirkung ihrer Hemmung durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs).

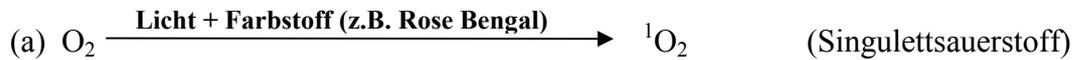
1.3.4 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress wird als Verschiebung des Fließgleichgewichtes von Prooxidantien und Antioxidantien zugunsten des Ersteren definiert [SIES, 1985]. Der Sauerstoff, der in unserer aeroben Welt über die biologische Oxidation von Energielieferanten die Gewinnung eines Vielfachen an Energie mit sich brachte, kann unter bestimmten Umständen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen, die den Organismus schädigen können. Der molekulare Sauerstoff ist aufgrund seiner Elektronenverteilung relativ unreaktiv, zwei ungepaarte Elektronen liegen mit parallelem Spin im äußersten π^* -Niveau vor. Eine Änderung dieser Elektronenverteilung in der p-Schale führt zur Aktivierung des Sauerstoffs [HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1985]. Die Sauerstoffaktivierung kann sowohl auf physikalischem als auch auf chemischem Wege erfolgen, wobei die physikalische Sauerstoffaktivierung unter Beibehaltung der Elektronenzahl, aber unter Veränderung ihres Spins zur Bildung von Singulett-Sauerstoff führt. Biologisch relevant ist der Singulett-Sauerstoff, bei dem sich beide Elektronen mit antiparallelem Spin gepaart in einem Orbital befinden ($^1\text{O}_2(^1\Delta_g)$), während derjenige, bei dem die Elektronen zwar einen antiparallelen Spin besitzen, aber in zwei unterschiedlichen Orbitalen lokalisiert sind ($^1\text{O}_2(^1\Sigma_g^+)$), zu kurzlebig ist. Die Reduktion des Sauerstoffmoleküls führt zur Bildung des Superoxidanionradikals und des Peroxidanions. Gebildetes Superoxidanion reagiert als Base im sauren Milieu schnell zum sehr reaktiven Hydroperoxylradikal. Andererseits führt die Dismutation von Superoxid zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Das Wasserstoffperoxid kann auch enzymatisch über zelluläre Oxidasen gebildet werden, die einen bivalenten Elektronenübergang auf molekularen Sauerstoff katalysieren. Unter der Oxidation von Eisen(II) oder Semichinonen kann aus Wasserstoffperoxid das sehr reaktive Hydroxylradikal gebildet werden [ELSTNER, 1990]. Eine Übersicht über diese Vorgänge ist in der Tabelle 1-2 gegeben.

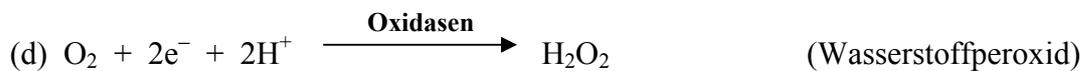
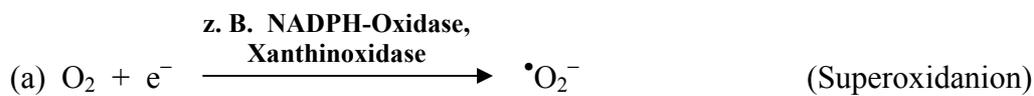
Tab. 1-2: Darstellung der physikalischen und chemischen Sauerstoffaktivierungen (modifiziert nach ELSTNER, 1990).

Reaktive Sauerstoffspezies

I) Physikalische Sauerstoffaktivierung



II) Chemische Sauerstoffaktivierung



Wann entstehen reaktive Sauerstoffspezies im Organismus? Die endogenen Quellen reaktiver Sauerstoffspezies im Organismus können zelluläre Prozesse, wie beispielsweise die mitochondriale Atmungskette [NOHL und JORDAN, 1980], das P-450 Elektronentransportsystem [PUNTARULO und CEDERBAUM, 1998] oder im Bereich der Entzündung die Lymphozyten und Makrophagen sein. Auch die enzymkatalysierte Sauerstoffaktivierung beispielsweise durch Oxidasen birgt immer das Risiko einer unvollständigen Reduktion des Sauerstoffs, so dass ROS entweichen. Einen weiteren Aspekt in der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, bilden die exogenen Umweltfaktoren, unter denen die ultraviolette Strahlung immer mehr an Bedeutung gewinnt. Gerade in der Haut, die als einziges Organ der ultravioletten Strahlung unmittelbar ausgesetzt ist, besitzt das UV-Licht als exogener Stimulus reaktiver Sauerstoffspezies eine große Bedeutung [KLOTZ *et al.*, 2001; MASAKI *et al.*, 1995; JURKIEWICZ und BUETTNER, 1994]. Die gebildeten ROS initiieren

eine Schädigung, indem sie Folgereaktionen mit weiteren Biomolekülen (Proteine, DNA und Membranlipide) eingehen, so dass organische Sauerstoffverbindungen, wie Alkoxy-, Peroxylradikale und Hydroperoxide entstehen. Diese Verbindungen wiederum können eine Radikalkettenreaktion initiieren, die den bereits gesetzten oxidativen Schaden potenziert. Beobachtete Schäden, die durch UV-Licht in der Haut ausgelöst werden, sind die Modifikationen von DNA-Basen und die oxidative Schädigung von Proteinen, was mit ihrem Aktivitätsverlust (Enzyme) oder Funktionsverlust (Strukturproteine) einhergeht. Schließlich führt die oxidative Schädigung von Membranlipiden im Rahmen der Lipidperoxidation zur Störung der Membranintegrität und zur Bildung weiterer Signalmoleküle, wie beispielsweise dem 4-Hydroxynonenal [CADET *et al.*, 1992; BULTEAU *et al.*, 2002].

Da die Haut als ein den Körper umschließendes Gewebe sowohl den natürlichen, endogenen Quellen reaktiver Sauerstoffspezies als auch den exogenen Quellen, unter denen das UV-Licht die wichtigste Rolle spielt, ausgesetzt ist, ist der Schutz vor ROS hier besonders wichtig. Übersteigt die UV-vermittelte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies die antioxidative Kapazität in der Haut, so entsteht oxidativer Stress, der eine Reihe von pathophysiologischen Veränderungen, wie Hautalterung, Entzündungen und Tumorigenese zur Folge hat [WENK *et al.*, 2001; KATIYAR *et al.*, 1999; SINGH und AGARWAL, 2002]. Aus diesem Grunde ist der Schutz vor ROS entweder durch deren direkte Eliminierung über das Antioxidans-System oder durch das Verhindern ihrer Entstehung, d.h. durch den UV-Schutz (Pigmentierung oder Lichtschwiele), physiologisch essentiell.

1.3.4.1 Das Antioxidans-System

a) Niedermolekulare, nicht-enzymatische Antioxidantien

Wichtige Antioxidantien, die in diese Klasse fallen, sind das α -Tocopherol (Vitamin E), das Ubichinon (Coenzym Q₁₀), Flavonoide (z. B. Epicatechin und α -Glucosylrutin), β -Carotin, Ascorbinsäure (Vitamin C), das Glutathion (GSH) und die Harnsäure. Der Schutz durch diese Moleküle basiert darauf, dass sie selbst mit den reaktiven Sauerstoffspezies reagieren, um deren schädigende Wirkung einzudämmen. Dabei zeichnen sich wirkungsvolle Verbindungen dadurch aus, dass sie einerseits zu einem unreaktiven Produkt reagieren und andererseits der Fähigkeit unterliegen, durch andere Antioxidantien in ihrer antioxidativen Kapazität regeneriert zu werden (Abb. 1-7). In der Haut ist daher die Abnahme einiger dieser

Antioxidantien nach UV-Exposition zu verzeichnen [THIELE *et al.*, 1998; PODDA *et al.*, 1998]. Andererseits erhöht die Verminderung der antioxidativen Kapazität durch beispielsweise die GSH Depletion den UV-vermittelten oxidativen Stress, gekennzeichnet durch höhere Mutationsraten und Apoptose [TYRRELL und PIDOUX, 1986, 1988]. Innerhalb dieser Klasse unterscheidet man zwischen fettlöslichen und wasserlöslichen Antioxidantien, wobei die wasserlöslichen Antioxidantien (wie z. B. Vitamin C, Flavonoide und GSH) die zytosolischen ROS abfangen, wohingegen die fettlöslichen Antioxidantien (wie z. B. Vitamin E und β -Carotin) aufgrund ihrer Lokalisation in den Membransystemen der Zelle überwiegend der Lipidperoxidation entgegenwirken. Die Antioxidantien werden durch ihre Reaktion mit radikalischen ROS selbst zum Radikal, wobei diese durch Recyclingsysteme wieder reduziert und damit hinsichtlich ihrer Wirkung regeneriert werden. Ein Beispiel einer solchen „Antioxidans-Regeneration“ ist in Abbildung 1-7 dargestellt. Auf der Basis dieser Regenerationsketten ist der kooperative Effekt verschiedener Antioxidantien hinsichtlich ihrer Protektion vor ROS und ROS-vermittelten Ereignissen (z. B. Lipidperoxidation) zu verstehen [LEUNG *et al.*, 1981]. Nicht nur die durch reduktive Sauerstoffaktivierung entstandenen ROS, sondern auch der Singulett-Sauerstoff kann mit diesen niedermolekularen Antioxidantien reagieren. Typische Singulett-Quencher sind z. B. das α -Tocopherol und das β -Carotin.

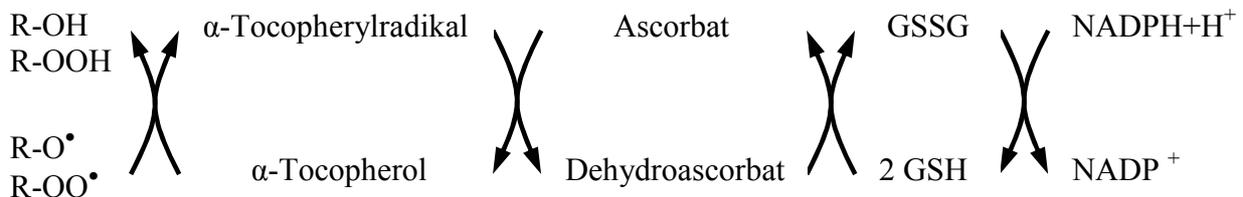


Abb. 1-7: Nichtstöchiometrische Darstellung des Recyclingsystems zur Regeneration oxidierter niedermolekularer Antioxidantien [nach SHINDO *et al.*, 1994].

b) Enzymatische Antioxidantien

Bei den enzymatischen Antioxidantien unterscheidet man wiederum zwei Klassen. In der ersten Klasse werden die Enzyme zusammengefasst, die die ROS katalytisch eliminieren und umfasst Enzyme wie die Katalase, Superoxiddismutasen (SOD), Glutathion-S-Transferasen (GST) und Glutathion-Peroxidasen (GPx). Die Katalase dient der enzymatischen Detoxifikation von Wasserstoffperoxid, wobei Wasser und molekularer Sauerstoff entstehen.

Die Glutathionperoxidasen besitzen für Wasserstoffperoxid eine um sechs Größenordnungen niedriger liegende Michaelis-Menten Konstante (K_M) als die Katalase und spielen daher für den Wasserstoffperoxidabbau eine größere Rolle als die Katalase, insbesondere in H_2O_2 -sensitiven Bereichen wie den Mitochondrien. Wasserstoffperoxid entsteht nach UV-Bestrahlung in der menschlichen Haut, insbesondere der Epidermis [KATIYAR *et al.*, 2001], so dass eine schnelle Detoxifikation dieser relativ stabilen ROS erfolgen muss, bevor aus ihr über die Fenton-Reaktion hochreaktive Hydroxylradikale generiert werden (vgl. Reaktion (e) in Tabelle 1-2). Neben dem Abbau von Wasserstoffperoxid katalysieren die Glutathionperoxidasen auch den Abbau von organischen Hydroperoxiden (R-OOH). Das Glutathion spielt in beiden Ebenen des Antioxidants-Systems (nicht-enzymatisch und enzymatisch) eine wichtige Rolle, da es neben seiner antioxidativen Wirkung durch die direkte Interaktion mit den ROS ebenfalls als Kofaktor in der enzymatischen ROS Detoxifikation fungiert. Die Aktivität der Glutathionperoxidasen und Glutathion-S-Transferasen ist mit der gleichzeitigen Oxidation von Glutathion verbunden. Sowohl die direkte Reaktion des Glutathions mit den ROS als auch die enzymatische Oxidation im Zuge der ROS Detoxifikation führt zur Abnahme seiner zellulären Konzentration nach UV-Bestrahlung in der menschlichen Haut [KATIYAR *et al.*, 2001]. Glutathiondisulfid (GSSG) wird unter der Aktivität der Glutathionreduktase durch die Reduktionsäquivalente aus $NADPH + H^+$ wieder reduziert. Die Superoxiddismutasen katalysieren die auch spontan ablaufende Dismutation der Superoxidanionradikale zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Oxidative Einflüsse können vorübergehend die katalytische Aktivität dieser enzymatischen Antioxidantien reduzieren, doch wird dann eine Induktion ihrer Expression beobachtet [LECCIA *et al.*, 2001; POSWIG *et al.*, 1999; MEEWES *et al.*, 2001].

In der zweiten Klasse der enzymatischen Antioxidantien fasst man solche Enzyme zusammen, die gezielt einen oxidativen Schaden an Biomolekülen (Proteine, DNA oder Membranlipide) erkennen und zu seiner Eliminierung bzw. Reparatur beitragen. Hier spielen ebenfalls, neben einer ganzen Reihe von DNA-Reparaturenzymen und Proteasen, die Glutathionperoxidasen und Glutathion-S-Transferasen eine wichtige Rolle, da sie auch organische Hydroperoxide reduzieren.

1.4 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die durch UV-Strahlung hervorgerufene Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) an einem kommerziell erhältlichen Epidermis-Modell untersucht werden. Dabei waren folgende Fragestellungen von besonderem Interesse:

- (i) In welchem zeitlichen Rahmen nach UV-Exposition kommt es zur Induktion der COX-2 und gibt es Unterschiede hinsichtlich der Induktion auf mRNA- und Proteinebene?
- (ii) Welche Wellenlängenbereiche des UV-Lichtes können für die Induktion der COX-2 verantwortlich gemacht werden?
- (iii) Durch welche Signaltransduktionswege wird die UV-vermittelte Induktion der COX-2 stimuliert? Wenn die COX-2 durch unterschiedliche UV-Bereiche stimulierbar ist, sind Unterschiede hinsichtlich der Signaltransduktion vorhanden?
- (iv) Inwieweit spielen oxidativer Stress bzw. reaktive Sauerstoffspezies bei der COX-2 Induktion durch UV-Licht eine Rolle? Lässt sich die UV-vermittelte Entzündungsreaktion durch niedermolekulare, nicht-enzymatische Antioxidantien inhibieren? Welche Art von Antioxidantien (fettlösliche oder wasserlösliche) ist dabei besonders effektiv?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Soweit nicht anders ausgewiesen, handelt es sich bei den verwendeten Substanzen, Flüssigkeiten und Lösungen um handelsübliche Chemikalien, die in höchst erhaltlicher Reinheit bei Sigma-Aldrich/Fluka (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) bezogen wurden. Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser (ddH₂O) hergestellt, welches auf einer Milli-Q académic Anlage (Millipore, Eschborn) aufbereitet worden war.

Die verwendeten Antikörper sowie ihre Bezugsquellen sind in Tabelle 2-1 zusammengestellt.

Die Inhibitoren zur Unterbrechung bestimmter MAP-Kinasen-Signalwege wurden von Merck Biosciences (Darmstadt) („JNK-Inhibitor I“ sowie SP600125) oder Alexis Biochemicals (Schweiz) (SB203580 sowie U0126) bezogen.

Hautbiopsien zur Isolierung humaner, dermaler Fibroblasten wurden im Rahmen von Kooperationsprojekten mit universitären und klinischen Partnern (Hamburg) bezogen, die EpiDerm-Modelle (EPI-200) wurden von der Firma MatTek (Ashland, USA) erworben.

Die Zellkulturmedien wurden von Sigma (Deisenhofen) (DMEM (A) und DMEM (B)), PAA Laboratories GmbH (Österreich) (DMEM (C)) oder Biochrom AG (Berlin) (modifiziertes DMEM-Medium mit geringem Bicarbonat-Anteil; DMEM (D)) bezogen. Die EpiDerm-Modelle wurden in dem Maintenance-Medium (EPI-100-MM) der Firma MatTek (Ashland, USA) kultiviert. Weitere Reagenzien für die Zellkultur wie Glutamax I, Penicillin/Streptomycin und Trypsin-EDTA (1x) wurden von Life Technologies (Eggenstein) bezogen, das fetale Kälberserum (FKS) wurde von PAA Laboratories GmbH (Österreich) erworben.

Tab. 2-1: Zusammenfassung der verwendeten Antikörper sowie ihrer Bezugsquellen.

<i>Antikörper</i>	<i>Firma</i>
Anti phospho-Akt (polyklonal)	Cell signaling Technology, Beverly (USA)
Anti Akt (polyklonal)	Cell signaling Technology, Beverly (USA)
Anti COX-2 (polyklonal)	Santa Cruz, Santa Cruz (USA)
Anti Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer (CPD)	Kamiya Biomedical Company, Seattle
Anti GAPDH (monoklonal)	BioTrend, Köln
Anti 4-Hydroxynonenal (polyklonal)	Alpha Diagnostics (USA)
Anti phospho-p38 (polyklonal)	Merck Biosciences, Darmstadt
Anti p38 (polyklonal)	Cell signaling Technology, Beverly (USA)
Anti phospho-ERK1/2 (polyklonal)	Cell signaling Technology, Beverly (USA)
Anti ERK1/2 (polyklonal)	Cell signaling Technology, Beverly (USA)
Anti phospho-c-Jun (SAPK/JNK Assay Kit)	Cell signaling Technology, Beverly (USA)
Anti c-Jun (polyklonal)	Cell signaling Technology, Beverly (USA)
Anti Maus (Alexa Fluor 488)	MoBiTec, Göttingen
Anti Maus-POD	Sigma, Deisenhofen
Anti Kaninchen-POD	Sigma, Deisenhofen
Anti Ziege (Alexa Fluor 488)	MoBiTec, Göttingen
Anti Ziege-POD	Sigma, Deisenhofen

2.2 Methoden

2.2.1 Photobiologische Methoden

2.2.1.1 Bestrahlungsquellen

Für die Bestrahlungsversuche wurden als UVA-Quellen der UVA-700 (Waldmann Lichttechnik, Villingen) und der Dermalight 2002 (Dr. Hönle, Planegg) verwendet. Zusätzlich wurden Bestrahlungen unter Verwendung eines Sonnensimulators (Oriol Instruments, Stratford, USA) durchgeführt. Durch den Einsatz des Attenuators (Oriol Instruments, Stratford, USA) in den Sonnensimulator entsprach das simulierte Sonnenspektrum der COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Industry). Weitere UV-Filter ermöglichen die Bestrahlungen unter Ausschluss des UVB- (290 bis 320 nm) (BC-Block; Oriol Instruments, Stratford, USA) bzw. des UVB/UVA2- (290 bis 350 nm) (WG360; AMP Dünnschichttechnik, Tornesch) Anteils. Die Intensitäten des sichtbaren Lichtes sowie des Infrarotlichtes sind beim Sonnensimulator im Vergleich zum Sonnenlicht reduziert, so dass ausschließlich das Spektrum des UV-Bereichs dem des Sonnenlichtes entspricht.

2.2.1.2 Dosimetrie

Die UV-Dosen wurden unter Verwendung eines IL-1700 (International Light, Newburyport, USA) sowie einer UVA- und einer UVB-Messsonde (International Light, Newburyport, USA) bestimmt. Im Falle der UVA-Bestrahlungen mittels des UVA-700 wurde die im Gerät integrierte UVA-Messsonde verwendet. Die UVA-Strahlungsquellen wurden unter Einsatz der Intensitäten von $4.0 \times 10^{-2} \text{ W/cm}^2$ (UVA-700) und $2.0 \times 10^{-2} \text{ W/cm}^2$ (Dermalight 2002) eingesetzt. Bezüglich des Sonnensimulators wurde eine Intensität von $1.0 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$ (gemessen am UVB-Anteil des simulierten Sonnenlichtes) gewählt. Die Bestrahlungsdosis für simuliertes Sonnenlicht (SSL) wurde immer durch die Dosis der enthaltenen UVB-Strahlung angegeben. Die Bestrahlungen mit unterschiedlichen UV-Dosen wurden unter Veränderung der UV-Expositionszeiten bei gleich bleibender Einstellung der Intensität erzielt. Im

Folgendes wird der Einfachheit halber das SSL ohne UVB-Anteil (d.h. ohne 290 bis 320 nm) als UVA und das SSL ohne UVB/UVA2-Anteil (d.h. ohne 290 bis 350 nm) als UVA1 bezeichnet, obwohl zusätzlich noch Anteile des sichtbaren Lichtes sowie des Infrarotbereichs enthalten sind. Um Effekte zu untersuchen, die durch unterschiedliche UV-Qualitäten ausgelöst werden, wurden UVA- und UVA1-Dosen verwendet, wie sie im SSL enthalten sind. Dazu wurde zunächst die im SSL enthaltene UVA-Dosis bestimmt. Nach Einsatz des UVB-Filters (BC-Block) in den Sonnensimulator wurde die zuvor bestimmte UVA-Dosis eingestellt. Um Bestrahlungen mit UVA1 durchzuführen, wurde der UVB-Filter (BC-Block) gegen den UVB/UVA2-Filter (WG360) ohne Veränderung der Intensität ausgetauscht. Das Einstellen einer genauen UVA1 Intensität ist nicht möglich, da der optimale Messbereich der UVA-Sonde in einem Bereich von 310 nm bis 390 nm und damit zu 50% im UVA2-Bereich liegt. Die verwendeten UV-Dosen und die damit verbundenen UV-Expositionszeiten unter Einstellung angegebener Intensitäten wurden in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

Tab. 2-2: Darstellung des Zusammenhanges zwischen der verwendeten Intensität, Bestrahlungsdauer und Bestrahlungsdosis. Unter Veränderung der Bestrahlungsdauer bei angegebener Intensität wurden weitere UV-Dosen erhalten.

<i>UV-Quelle</i>	<i>UV-Qualität</i>	<i>Intensität (W/cm²)</i>	<i>Bestrahlungsdauer</i>	<i>UV-Dosis</i>
Oriel	SSL	1x10 ⁻⁴	15 min	90 mJ/cm ² UVB
Oriel	SSL	1x10 ⁻⁴	22.5 min	135 mJ/cm ² UVB
Oriel	UVA	2.2 ± 0.37 x 10 ⁻³ ; *)	15 min	1.98 ± 0.33 J/cm ² UVA
Oriel	UVA	2.2 ± 0.37 x 10 ⁻³ ; *)	22.5 min	2.97 ± 0.5 J/cm ² UVA
Dermalight 2002	UVA	2x10 ⁻²	8.33 min	10 J/cm ² UVA
UVA-700	UVA	4x10 ⁻²	12.5 min	30 J/cm ² UVA

*) Für die Dosimetrie der im simulierten Sonnenlicht enthaltenen UVA-Dosis ergeben sich Schwankungen, da für die Gesamtheit aller UV-Bestrahlungen im Laufe der Zeit vier unterschiedliche UVA-Sonden des gleichen Herstellers verwendet wurden. Dargestellt sind die gewichteten Mittelwerte ± Standardabweichung.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Erstellen der Proteinlysate

a) Lyse von Fibroblasten

Um adhärenente Fibroblasten zu lysieren, wurden die Zellen einer 3 cm Petrischale zunächst durch die Zugabe von 2 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des Puffers wurden 100 µl Probenauftragspuffer (2x) für die SDS-Gelelektrophorese hinzugegeben und die Zellen mittels Zellschaber vom Plattenboden gelöst. Diese Proteinlysate wurden ohne vorherige Proteinbestimmung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei wurden gleiche Volumina auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und eine visuelle Relativierung durch die abschließende Detektion des „housekeeping“-Proteins Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Über diese Art der Relativierung konnten verschiedene aufgetrennte Proben eines Western-Blots vergleichbar gemacht werden.

Verwendete Puffer:

<i>PBS</i>		<i>Probenauftragspuffer (2x)</i>	
NaCl	137 mM	Tris/HCl, pH 6.8	125 mM
KCl	2.7 mM	SDS	4% (w/v)
Na ₂ HPO ₄	6.5 mM	Glycerin	20% (v/v)
KH ₂ PO ₄	1.5 mM	DTT (Serva, Heidelberg)	100 mM
<u>Der pH-Wert wurde auf 7.4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.</u>		Bromphenolblau	0,02% (w/v)

b) Lyse der EpiDerm-Modelle

Die EpiDerm-Modelle wurden nach erfolgter Postinkubation nach Behandlung zur Lyse aus ihren Inserts mittels einer Pinzette vorsichtig herausgezogen. Sollten neben der proteinchemischen Untersuchung zusätzlich noch molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden, wurden die EpiDerm-Modelle in Hälften geschnitten, wobei die eine Hälfte zum Zwecke der Herstellung von Proteinlysaten und die andere zum Zwecke der RNA-Isolation (siehe 2.2.5.1) verwendet wurde. Zur Herstellung der Proteinlysate wurde die Epidermis in 100-200 µl Lysispuffer überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte dann bei -80°C. Der Lysispuffer enthält zur Hemmung endogener Phosphatasen Natriumvanadat und als Komplexbildner EDTA. Das EDTA komplexiert die für eine Kinaseaktivität essentiellen Mg^{++} -Ionen [PLOEGH, 1995] und hemmt metallionenhaltige Phosphatasen. Die Zusammensetzung des Lysispuffers erlaubt damit die Analyse des Phosphorylierungszustandes und damit der Aktivität der zu untersuchenden Kinasen. Zur Lyse der Epidermis wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut und dann mit Keramik-Kugeln (Lysing Matrix D; Q BIOgene, Carlsbad, USA) versetzt. Die mechanische Zerkleinerung der Epidermis erfolgte dann unter Verwendung eines Ribolysers (Hybaid, Ashford, U.K.) für 2 x 20 sek., Geschwindigkeitsstufe 5.0. Die Lysate wurden sofort auf Eis gelagert und dort für ungefähr 1 Stunde inkubiert, damit sich der gebildete Schaum des Lysispuffers absetzen konnte. Zur Reinigung der Lysate von Zelltrümmern wurden sie entweder nach Überführung in ein weiteres Reaktionsgefäß und dadurch nach der Trennung von den Keramik-Kugeln, zentrifugiert (20800 x g, 3 min., 4°C) oder durch einen Filtereinsatz (10 µm Porendurchmesser; Hybaid, Ashford, U.K.) mittels Zentrifugation (2700 x g, 20 sek., 4°C) filtriert. Der Überstand bzw. der Durchlauf, der das von Zelltrümmern befreite Zelllysate enthält, wurde dann für die Proteinbestimmung verwendet. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgte kurzfristig bei -20°C, längerfristig jedoch bei -80°C.

Verwendeter Puffer:

Lysispuffer

Lysis-Stammlösung (10x)	10% (v/v)
PMSF in Isopropanol (100 mM)	1% (v/v)
Protease-Inhibitoren (Complete TM + EDTA, Roche, Mannheim)	1 Tablette/ 50 ml
Aprotinin (10 mg/ml)	0,1% (v/v)

Die angegebenen Komponenten wurden in Aqua dest. gelöst und immer kurz vor der Zelllyse frisch zusammengegeben.

Lysis-Stammlösung (10x)

Triton X-100	10% (v/v)
EDTA	10 mM
EGTA	10 mM
Tris	200 mM
Natriumvanadat	10 mM
Natriumfluorid	100 mM
Natriumchlorid	150 mM

Nachdem alle Komponenten in Aqua dest. gelöst vorlagen, wurde der pH-Wert auf 7.5 eingestellt. Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 BCA-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der erhaltenen Zelllysate erfolgte im 96-Loch-Platten-Format unter Verwendung des BC Assay Protein Quantitation Kit (Uptima, Montlucon, Frankreich). Es handelt sich um einen modifizierten Biuret-Test [SMITH *et al.*, 1985]. Die Standardreihe wurde aus Rinderserumalbumin (BSA) im verwendeten Lysispuffer angesetzt und deckte Konzentrationen bis zu 4 µg/µl ab. Die Durchführung der Proteinbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.2.3 Gelelektrophoretische Auftrennung

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [LAEMMLI, 1970] durchgeführt. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit der denaturierten Proteine direkt proportional zum Logarithmus ihrer Masse [COOPER, 1980]. Die Acrylamidkonzentration in den verwendeten Polyacrylamid-Trenngelen betrug 13%, wobei

die Trenngele mit einem 5%igen Sammelgel überschichtet wurden. Es wurden 5 Gele in einem „Multi-Cast“-Gießstand (Pharmacia Biotech, Freiburg) gegossen.

Alle zur Herstellung des Trenngels benötigten Lösungen (Tabelle 2-3) wurden zusammengegeben und schließlich in einen fertigen Gießstand überführt, so dass das darauffolgende Sammelgel noch eine Höhe von 2 cm erreichen konnte. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um Luftabschluß zu gewährleisten und darüber hinaus eine planare Oberkante zu erhalten. Nach mindestens einstündiger Polymerisation bei RT wurde das Isopropanol abgegossen und das Trenngel mit dem Ansatz für das Sammelgel (Tabelle 2-3) überschichtet. Es wurden die Auftragskämme eingesetzt und das Sammelgel polymerisierte bei RT in 1-2 Stunden. Die Aufbewahrung fertiger Polyacrylamidgele erfolgte für höchstens 4 Tage in feuchten Tüchern bei 4°C.

Tab. 2-3: Zusammensetzung 13%iger Trenngele und 5%iger Sammelgele. Diese Ansätze reichen aus, um 5 Gele in einem „Multi-Cast“ Gießstand mit einer Dicke von 0.75 mm zu gießen.

<i>Reagenz</i>	<i>13%ige Trenngele</i>	<i>5%ige Sammelgele</i>
Acrylamid/Bisacrylamid (40%)	10 ml	2 ml
Trenngelpuffer (4x)	7.5 ml	----
Sammelgelpuffer (4x)	----	3.75 ml
ddH ₂ O	12.4 ml	9.2 ml
APS (10%)	90 µl	60 µl
TEMED	24 µl	12 µl

Verwendete Puffer:

Trenngelpuffer (4x)

Tris/HCl, pH 8.8	1.5 M
SDS	0.4% (w/v)

Der Trenngelpuffer (4x) wurde autoklaviert.

Sammelgelpuffer (4x)

Tris/HCl, pH 6.8	1.5 M
SDS	0.4% (w/v)

Der Sammelgelpuffer (4x) wurde autoklaviert.

Probenauftragspuffer (5x)

Tris/HCl, pH 6.8	312 mM
SDS	10% (w/v)
Glycerin	50% (v/v)
Bromphenolblau	0.004% (w/v)

Im Falle der Proteinauftrennung unter reduzierenden Bedingungen wurden immer frisch 125 mM DTT in den Probenauftragspuffer (5x) gegeben.

Tankpuffer (5x)

Tris	125 mM
Glycin	960 mM
SDS	0.5% (w/v)

Der pH-Wert sollte von alleine bei 8.4 liegen.

Es wurden zwischen 10 µg und 30 µg der aufzutrennenden Proteinprobe mit 5fach konzentriertem Probenauftragspuffer für SDS-PAGE vermischt, so dass dieser final einfach konzentriert vorlag. Es folgte zur Denaturierung eine Inkubation der Proben bei 95°C für 10 Minuten im Thermomixer. Als Protein-Standard diente entweder der prestained SDS-PAGE precision broad range Marker (BioRad, München) oder der BOA-Marker (MoBiTec, Göttingen). Die Gelelektrophorese erfolgte in einer Minigel-Elektrophorese-Einheit (Pharmacia Biotech, Freiburg) bei einer Spannung von 120 V während des Laufes durch das Sammelgel und 160 V während der Auftrennung im Trenngel. Als Laufpuffer wurde Tankpuffer (1x) verwendet.

2.2.2.4 Western-Blot

Als Western-Blot bezeichnet man den elektrophoretischen Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran [TOWBIN *et al.*, 1979], die aus Nitrocellulose oder PVDF besteht. Die auf der Membran befindlichen Proteine können nun unspezifisch durch z. B. Coomassie angefärbt werden oder selektiv durch spezifische Antikörper detektiert werden, ein Vorgang, der als Immundetektion bezeichnet wird. Für den Western-Blot wurde ein Verfahren angewandt, das man als „Semi-Dry“ bezeichnet.

Es wurden für jeden Western-Blot eine Nitrocellulose-Membran sowie 2 Filterpapiere im Transferpuffer für 5-10 Minuten äquilibriert. Auf die Anode des Trans-Blot SD (BioRad, München) wurde ein im Transferpuffer äquilibriertes Filterpapier luftblasenfrei gelegt, worauf dann die Membran folgte. Auf die Membran wurde das Trenngel aus der unmittelbar zuvor

erfolgten Polyacrylamid-Gelelektrophorese gelegt, woraufhin das verbleibende Filterpapier folgte. Es wurde stets darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen eingeschlossen wurden. Schließlich wurde der Deckel des Gerätes, der die Kathode darstellt, aufgesetzt. Der Transfer erfolgte für 90 Minuten bei einer Stromstärke von 100 mA pro Western-Blot im Gerät. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran der Immundetektion unterzogen.

Verwendeter Puffer:

Transferpuffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0.1%
Methanol	20% (v/v)

Der pH-Wert sollte von alleine bei pH 8.4 liegen.

2.2.2.5 Immundetektion

Die Immundetektion ist ein Verfahren, bei dem ein bestimmtes immobilisiertes Protein auf der Trägermembran spezifisch nachgewiesen werden kann. Hierbei macht man sich die Spezifität der Antikörper zunutze. Ein sogenannter primärer Antikörper bindet an das gesuchte Protein auf der Trägermembran, der sekundäre Antikörper ist mit einem Marker konjugiert und bindet an den konstanten Bereich des primären Antikörpers. Der Einsatz des sekundären Antikörpers erlaubt eine Amplifikation des Signals, da mehrere von ihnen an einen primären Antikörper binden können. In dieser Arbeit wurden sekundäre Antikörper verwendet, die mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert sind. Zur Immundetektion wurde die Membran für 30-60 Minuten unter Schütteln im Blockpuffer inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Membran in eine Lösung des primären Antikörpers überführt, wobei verschiedene Antikörperverdünnungen verwendet wurden. Die Inkubation erfolgte unter leichtem Schütteln entweder für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde

dann dreimal für 10 Minuten in Waschpuffer gewaschen und schließlich in die Lösung des sekundären Antikörpers überführt. Die Inkubation der Membran in der Lösung des sekundären Antikörpers erfolgte unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für mindestens 1 Stunde. Vor der Entwicklung wurde die Membran mindestens dreimal für 5-10 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Die verwendeten Antikörper in ihren Verdünnungen sowie die verwendeten Wasch- und Blockpuffer sind tabellarisch zusammengefasst (Tabelle 2-4). Zur Entwicklung der Membran wurde diese zunächst kurz zwischen zwei Filterpapieren durch vorsichtiges Andrücken getrocknet und dann nach Angaben des Herstellers in das Substrat (Lumi-Light Plus; Roche, Mannheim) überführt. Die entstehende Chemilumineszenz konnte unter Verwendung des Lumi-Imager (Boehringer Mannheim, Mannheim) detektiert werden. Die Nachweisgrenze liegt hier je nach primärem Antikörper zwischen 0.1-3 ng.

Verwendete Puffer:

TBS (20x)

Tris	400 mM
NaCl	2.7 M

Nach Einstellung des pH-Wertes auf pH 7.5 wurde die Lösung autoklaviert.

TBS-T (1x)

TBS (20x)	5% (v/v)
Tween-20	0.05% (v/v)

PBS-T (1x)

PBS	100%
Tween-20	0.05% (v/v)

Tab. 2-4: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper und Lösungen für die Visualisierung angegebener Proteine mittels Immundetektion. Die verwendeten Puffer enthalten entweder Rinderserumalbumin (BSA) oder Magermilchpulver (J. M. Gabler Saliter GmbH, Obergünzburg)

<i>Antikörper</i>	<i>Blockpuffer</i>	<i>Antikörperpuffer</i>	<i>Einsatzkonzentration</i>	<i>Herkunft</i>
I. Primäre Antikörper				
COX-2	Milchpulver (5% in PBS-T)	Milchpulver (5% in PBS-T)	1:1000	Ziege
4-Hydroxynonenal	Milchpulver (5% in PBS-T)	Milchpulver (5% in PBS-T)	1:1000	Kaninchen
GAPDH	Milchpulver (5% in PBS-T)	Milchpulver (5% in PBS-T)	1:5000	Maus
phospho-Akt	Milchpulver (5% in TBS-T)	BSA (3% in TBS-T)	1:1000	Kaninchen
Akt	Milchpulver (5% in PBS-T)	Milchpulver (3% in PBS-T)	1:1000	Kaninchen
phospho-p38	Milchpulver (5% in TBS-T)	BSA (3% in TBS-T)	1:1000	Kaninchen
p38	Milchpulver (5% in PBS-T)	Milchpulver (3% in PBS-T)	1:1000	Kaninchen
phospho ERK1/2	Milchpulver (5% in TBS-T)	BSA (3% in TBS-T)	1:1000	Kaninchen
ERK1/2	Milchpulver (5% in PBS-T)	Milchpulver (3% in PBS-T)	1:1000	Kaninchen
phospho c-Jun	Milchpulver (5% in TBS-T)	BSA (3% in TBS-T)	1:1000	Kaninchen
c-Jun	Milchpulver (5% in PBS-T)	Milchpulver (3% in PBS-T)	1:1000	Kaninchen
II. Sekundäre Antikörper				
Maus-POD	----	Milchpulver (3% in PBS-T ^{*)})	1:1000	Kaninchen
Kaninchen-POD	----	Milchpulver (3% in PBS-T ^{*)})	1:1000	Ziege
Ziege-POD	----	Milchpulver (3% in PBS-T)	1:1000	Kaninchen
*) Im Falle der Detektion phosphorylierter Proteine wurde der sekundäre Antikörper in einer Lösung aus 3% Milchpulver in TBS-T gelöst.				

2.2.2.6 Elution gebundener Antikörper von der Nitrocellulose-Membran

Um nach einer bereits erfolgten Detektion bestimmter Proteine auf der Trägermembran weitere Proteine detektieren zu können, wendet man ein Verfahren an, bei dem die gebundenen Antikörper von der Membran gelöst werden können. Dieses Verfahren wird auch als „Stripping“ bezeichnet. Dabei wird die Membran für 15-30 Minuten leicht schüttelnd in einem Elutionspuffer inkubiert. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Elutionspuffer verwendet. Die Inkubation mit dem Elutionspuffer I erfolgte für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad, während die Inkubation im Elutionspuffer „Re-Blot-Puffer (mild)“ für 15-20 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte. In beiden Fällen wurde die Membran nach dem „Stripping“ erneut geblockt, indem sie für 30 Minuten in einen Blockpuffer gegeben wurde. Anschließend erfolgte die Behandlung mit den primären und sekundären Antikörpern wie unter 2.2.2.5 beschrieben.

Verwendeter Puffer:

Elutionspuffer I

Natriumdodecylsulfat	2% (w/v)
Tris, pH 6.8	62.5 mM
β -Mercaptoethanol	100 mM

2.2.2.7 Bestimmung der Aktivität von c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK)

Zur Bestimmung der Aktivität von c-jun-N-terminalen Kinasen (JNK) wurde das SAPK/JNK Assay Kit (Cell signaling Technology, Beverly, USA) verwendet. Zunächst wurden die EpiDerm-Modelle nach Angaben des Herstellers lysiert und dann die JNK aus den Zelllysaten über c-Jun-konjugierte Sepharose-Kügelchen präzipitiert. Schließlich wurden die Kügelchen mit den gebundenen JNK-Proteinen vom Lysat getrennt, mehrmals gewaschen und in einen Kinasepuffer überführt, in dem schließlich aktive, d.h. phosphorylierte JNK das gebundene c-Jun phosphorylieren konnten. Phosphoryliertes c-Jun wurde dann mittels Immundetektion detektiert. Die erhaltenen Banden der phosphorylierten c-Jun Proteine, die indirekt die im Lysat vorhandenen aktiven JNK widerspiegeln, wurden densitometrisch quantifiziert. Der

gebundenen Antikörper wurden schließlich eluiert, und es erfolgte die Detektion des c-Jun Gesamtproteins in der darauf folgenden Immundetektion unter Verwendung derselben Membran. Nach dessen densitometrischer Quantifizierung konnten die phospho-c-Jun-Daten auf die gesamt-c-Jun-Daten, die ein Maß der vorhandenen c-Jun konjugierten Sepharose-Kügelchen sind, relativiert werden. Alle Schritte zur Bestimmung der Aktivität der JNK wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.2.8 Densitometrische Auswertung

Die Bandenintensität auf der Membran korreliert mit der Menge des nachgewiesenen Proteins. Aus diesem Grunde erlaubt die Bestimmung der Bandenintensität Rückschlüsse auf die relativen Proteinmengen innerhalb derselben Trägermembran. Zur relativen Quantifizierung der Proteinmengen auf einer Blotmembran wurde ein densitometrisches Verfahren angewandt, wobei die zu bestimmenden Proteinbanden unter Verwendung der LumiAnalyst Version 3.1.00.00 Software (Boehringer Mannheim, Mannheim) genau markiert und schließlich densitometrisch ausgewertet wurden. Die Intensität der Banden wurde in Boehringer Light Units (BLU) angegeben. Auf diese Weise konnten die detektierten Proteinbanden zunächst auf einen internen Standard, wie z. B. das „housekeeping“-Protein Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH), relativiert werden, der nochmals als Beladungskontrolle diente. Die auf diese Weise relativierten Proteinmengen konnten dann auf andere relativierte Proteinmengen (z.B. unbehandelte Kontrolle) normiert werden.

2.2.3 Analytische Methoden

2.2.3.1 Fluorimetrische Bestimmung von Wasserstoffperoxid

Für die Bestimmung von Wasserstoffperoxidkonzentrationen wurde eine fluorimetrische Methode verwendet, bei der vorhandenes Wasserstoffperoxid zugesetztes 7-Hydroxy-6-methoxycoumarin (Scopoletin) durch die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase (HRP) oxidiert. Dieses Oxidationsprodukt weist nach einer Anregung mit monochromatischem Licht der Wellenlänge von 350 nm keine Fluoreszenz bei 460 nm mehr auf. Es wurden mittels

dieser Methode die Wasserstoffperoxidkonzentrationen in unterschiedlichen Medien nach UV-Bestrahlung bestimmt. Dabei wurden 2 ml der Medien bzw. in PBS gelöster Medieninhaltsstoffe in eine 3 cm-Petrischale gegeben und direkt dem UV-Licht ausgesetzt. Als Kontrollen dienten unbestrahlte Medien bzw. direkt nach der Bestrahlung mit Katalase behandelte Medien.

Unter Verwendung von 30%igem Wasserstoffperoxid wurden über eine Verdünnungsreihe in PBS Eichlösungen erstellt, die einen Konzentrationsbereich von 0 μM H_2O_2 (nur PBS) bis 300 μM H_2O_2 abdeckten. Diese Lösungen wurden bei 4°C gelagert und für jeden Versuchsdurchlauf frisch angesetzt. Die Bestimmungen wurden entweder in 15 ml Reaktionsröhrchen (**A**) oder im 96-Loch-Platten-Format (**B**) durchgeführt. Die Zusammensetzungen der Ansätze werden unten abhängig vom Durchführungssystem tabellarisch aufgeführt (Tabellen 2-5 und 2-6).

(A): Zunächst wurde eine 22.3 μM Scopoletinlösung angesetzt (187 μl Scopoletin in DMSO (6 mM) + 50 ml PBS). Für jede Bestimmung wurden jeweils 2690 μl dieser Stammlösung in drei 15 mL Falcon-Röhrchen gegeben. In ein viertes Röhrchen wurden nur 2680 μl PBS und 10 μl DMSO gegeben. Die vier Ansätze wurden für 10 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert. In die vier Röhrchen wurden dann jeweils 300 μl einer Eichlösung gegeben und in zwei der scopoletinhaltenen Röhrchen (Doppelbestimmung der Messwerte) sowie in das scopoletinfreie Röhrchen (Nullwert) zusätzlich 10 μl der HRP-Lösung (500 U/ml PBS). Der Inhalt des verbleibenden Röhrchens (Maximalwert) wurde mit 10 μl PBS versetzt. Nach einer weiteren Inkubation der vier Reaktionsansätze für 10 Minuten bei 30°C wurde die Fluoreszenz bei 460 nm bestimmt. Mittels der unterschiedlichen Eichlösungen wurde eine Eichgerade erstellt, die die Beziehung zwischen Wasserstoffperoxidkonzentration und Abnahme der Fluoreszenz (ΔF) beschreibt. Die Wasserstoffperoxidbestimmung in den Proben erfolgte wie die zur Erstellung der Eichgeraden, nur dass hier die 300 μl der Eichlösung gegen 300 μl der zu untersuchenden Probe ersetzt wurden. Im Falle der Katalase-Kontrollen erfolgte zunächst die Zugabe der in PBS gelösten Katalase (100 U, 50 μl) in das Gemisch aus Scopoletin, PBS und Probe (Messwerte). Erst nach einer Inkubation von 1 Minute bei 30°C im Wasserbad, die sicherstellte, dass vorhandenes Wasserstoffperoxid auch abgebaut wurde, erfolgte die Zugabe der HRP. Auch die Maximalwert- und Nullwertbestimmung wurde unter Anwesenheit der 50 μl Katalase (100 U) durchgeführt. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte im LS5 Lumineszenz Spektrometer (Perkin Elmer, Wellesley, USA).

(B): Zunächst wurde eine 21.8 μM Scopoletinlösung in PBS (43681 μl PBS + 319 μl Scopoletin in DMSO (3 mM)) angesetzt. Dieser Ansatz wurde in zwei gleiche Volumina (je

22 ml) aufgeteilt, wobei aus dem einen der „Max-Mix“ und aus dem anderen der „Mess-Mix“ angesetzt wurde. Dem „Mess-Mix“ wurden 500 μl (42.5 U) einer HRP-Lösung hinzugegeben, während zum „Max-Mix“ 500 μl PBS gegeben wurden. Beide Ansätze wurden gut durchmischt und dunkel gehalten. Ein dritter Ansatz, der sogenannte „Null-Mix“ wurde aus 21841 μl PBS, 159 μl DMSO und 500 μl HRP-Lösung (42.5 U) erstellt. Auch dieser Ansatz wurde gut durchmischt. Jeweils 180 μl der drei Ansätze wurden pro Vertiefung in Doppelreihen in eine 96-Loch-Platte pipettiert, woraufhin die Platte dunkel gehalten wurde. Für die Standardreihe wurden jeweils 20 μl der Eichlösungen in Doppelbestimmungen zu den drei Ansätzen gegeben, so dass final pro Vertiefung 200 μl vorlagen. Unmittelbar nach dem Bestrahlungsende wurden je 20 μl der bestrahlten Medien bzw. als Kontrolle der unbestrahlten Medien in Doppelbestimmungen analog zur Eichreihe den drei Ansätzen beigefügt. Zum verbliebenen Medium wurden dann 120 μl (670 U) in PBS gelöster Katalase gegeben, so dass final 0.33 U/ μl Katalase vorlagen. Nach einer einminütigen Inkubation der Katalase wurden dann je 20 μl aus diesen behandelten Medien in gleicher Weise auf die 96-Loch-Platte gegeben. Die 96-Loch-Platte wurde für 10 Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert und dann nach einer weiteren Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln unter Verwendung des Safire Mikrotiterplattenfluorimeters (Tecan, Crailsheim) vermessen. Die Anregungswellenlänge betrug 350 nm, die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 460 nm.

Die Auswertungen wurden unabhängig von dem Durchführungssystem immer auf die gleiche Art und Weise bearbeitet. Zunächst wurde die Fluoreszenz des Nullwertes (F_{NULL}) von der Maximalfluoreszenz (F_{MAX}) abgezogen. Anschließend wurde jeweils die Abnahme der Fluoreszenz (ΔF) gegen die eingesetzte Wasserstoffperoxidkonzentration aufgetragen. Die auf diese Art und Weise erstellte Eichgerade diente dann der quantitativen Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration in den Proben. Zusätzlich wurden die erhaltenen Wasserstoffperoxidkonzentrationen nach UV-Bestrahlung auf die Kontrollwerte relativiert, die nach Bestrahlung und anschließender Behandlung mit Katalase erhalten wurden. Im Folgenden sind die verwendeten Formeln für die Auswertung dargestellt.

$$(a) \quad \mathbf{F_{MAX'}} = F_{\text{MAX}} - F_{\text{NULL}}$$

$$(b) \quad \mathbf{\Delta F} = F_{\text{MAX'}} - F_{\text{MESS}}$$

Tab. 2-5: Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsansätze für die Wasserstoffperoxidbestimmung im 15 ml Röhrchen Format. Jeder einzelne Ansatz reicht für eine Bestimmung.

<i>Komponente</i>	<i>Maximalfluoreszenz</i>	<i>Nullwert</i>	<i>Messwert</i>
Scopoletinlösung (22.3 µM)	2690 µl	----	2690 µl
PBS	10 µl	2680 µl	----
DMSO	----	10 µl	----
HRP (500 U/ml)	----	10 µl	10 µl

Diesen Ansätzen wurden jeweils 300 µl der H₂O₂ Eichlösung bzw. der zu bestimmenden Probe hinzugefügt.

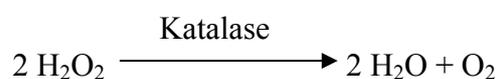
Tab. 2-6: Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsansätze für die Wasserstoffperoxidbestimmung im 96-Loch-Platten-Format. Jeder einzelne Ansatz reicht für ca. 60 Doppelbestimmungen.

<i>Komponente</i>	<i>Max-Mix</i>	<i>Null-Mix</i>	<i>Mess-Mix</i>
Scopoletin in DMSO (3 mM)	159 µl	----	159 µl
DMSO	----	159 µl	----
PBS (PAA)	22341 µl	21841 µl	21841 µl
HRP (85 U/ml)	----	500 µl	500 µl

Je 180 µl dieser drei Ansätze wurden in Duplikaten pro Kavität einer 96-Loch-Platte pipettiert. Zur Bestimmung der H₂O₂-Konzentration wurden je Kavität 20 µl der H₂O₂-Eichlösung bzw. der zu bestimmenden Probe hinzugegeben.

2.2.3.2 Oxygraphische Bestimmung von Wasserstoffperoxid

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Wasserstoffperoxidkonzentration in einer Probe ist die mittels einer Sauerstoffelektrode (Oxygenmeter 781; Strathkelvin Instruments, Glasgow, U.K.). Der Zusatz von Katalase führt zum raschen Abbau des Wasserstoffperoxids zu Wasser und Sauerstoff gemäß der Reaktion:



Der freiwerdende Sauerstoff kann durch die Sauerstoffelektrode gemessen werden und gibt dann Auskunft über die Wasserstoffperoxidmenge, die durch die Katalase abgebaut wurde. Dabei wurden zunächst 400 µl Wasser in die bei 20°C temperierte Versuchskammer gegeben. Unter stetem Rühren für 5-10 Minuten konnte das Wasser in der Versuchskammer äquilibrieren. Die Sauerstoffelektrode wurde in die Versuchskammer eingesetzt, und der Schreiber dokumentierte durch eine Basislinie, dass sich die Sauerstoffkonzentration im Wasser nicht veränderte. Eine Spatelspitze Natrium-Dithionit führte zu einer sofortigen Reduktion des im Wasser gelösten Sauerstoffs, so dass anaerobe Verhältnisse im Wasser erzeugt wurden. Da im äquilibrierten Wasser bei 20°C eine Sauerstoffkonzentration von 287 µM herrscht [Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association (APHA), 13. Ed., New York, USA, 1971], konnte der während der Natrium-Dithionit Reaktion gemessenen Amplitude eine Sauerstoffmenge zugeteilt werden. Dieser Verlauf stellte eine Art Standard dar, mit Hilfe dessen die Wasserstoffperoxidkonzentration in verschiedenen Proben ermittelt wurde. So wurden verschiedene Proben durchgemessen, nur dass kein Natrium-Dithionit, sondern in PBS gelöste Katalase (100 U, 1 µl) dem Probenvolumen von 400 µl zugesetzt wurde. Aus der freigewordenen Sauerstoffmenge konnte auf die zuvor vorhandene Wasserstoffperoxidkonzentration geschlossen werden.

2.2.3.3 Bestimmung der PGE₂-Konzentration

Um die Konzentrationen des Prostaglandins E₂ (PGE₂) in Kulturüberständen zu bestimmen, wurde der kommerziell erhältliche kompetitive PGE₂-ELISA (Cayman Chemicals, Michigan, USA) verwendet. Der Auftrag der Proben erfolgte auf eine mit Antikörpern gegen Maus IgG versehene 96-Loch-Platte. Sowohl der Tracer als auch ein weiterer Antikörper wurden hinzugegeben, wobei es sich bei dem Antikörper um einen monoklonalen anti-PGE₂ Antikörper aus Maus handelt. Dieser Antikörper wird von den Antikörpern der Plattenoberfläche gebunden. Der Tracer und das PGE₂ der zugesetzten Probe konkurrieren um die Bindungsstellen dieser anti-PGE₂ Antikörper. Der zugesetzte Tracer besteht aus PGE₂, das mit Acetylcholinesterase konjugiert ist. Die Acetylcholinesterase katalysiert die Umsetzung eines Substrates in der Entwicklungslösung in ein chromogenes Produkt. Die Menge des gebildeten Produktes wurde durch die Messung der Absorption bei 405 nm (Spectra Max 250; Molecular Devices, Sunnyvale, USA) bestimmt. Über eine Eichreihe mit unterschiedlichen

PGE₂-Konzentrationen konnte schließlich die Konzentration des Prostaglandins E₂ in den Proben bestimmt werden. Liegt eine geringe PGE₂-Konzentration in den Proben vor, so können viele Tracer binden und die Absorption bei 405 nm ist schließlich hoch. Die Durchführung des PGE₂-ELISA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Kultur der Zellen erfolgte in einem Inkubator unter wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und einer Begasung mit 7% (v/v) CO₂ (EpiDerm-Modelle und Fibroblasten zur Untersuchung der Vitalität (Calcein-Test) nach UV-Exposition in unterschiedlichen Zellkulturmedien) bzw. mit 5% (v/v) CO₂ (Fibroblasten zur Untersuchung UV-induzierter Signaltransduktionswege in Abhängigkeit der Zellkulturmedien bzw. in PBS gelöster Medienkomponenten).

2.2.4.2 Kultur der EpiDerm-Modelle

Die ohne Hydrocortison und Phenolrot angezogenen EpiDerm-Modelle (EPI-200) wurden in Plastikeinsätzen, die zur Versorgung mit Nährstoffen während des Transportes auf einer Agarosematrix aufgesetzt waren, bei 4°C geliefert. Noch am Tag der Lieferung wurden die EpiDerm-Modelle einzeln in 2 ml vorgewärmtes Maintenance-Medium (EPI-100-MM), das ebenfalls weder Hydrocortison noch Phenolrot enthielt, in die Kavitäten der 6-Loch-Platten überführt. Dabei wurden Flüssigkeitsrückstände, die sich teilweise noch auf den EpiDerm-Modellen befanden, vorsichtig abgesaugt. Am darauf folgenden Tag erfolgte der Mediumwechsel, worauf dann 24 Stunden später die UV-Bestrahlungen mit unterschiedlichen UV-Qualitäten unter Verwendung des Sonnensimulators durchgeführt wurden. Der Mediumwechsel am Folgetag nach der Lieferung sollte sicherstellen, dass transportbedingte hohe Prostaglandin E₂-Titer eliminiert werden, um die alleinige Wirkung des UV-Lichts auf die PGE₂-Produktion untersuchen zu können. Es wurde zudem ein Zeitraum von 24 Stunden zwischen dem Mediumwechsel und der UV-Exposition gewählt, um sicherzustellen, dass

mediumbedingte, durch Wachstumsfaktoren etc. hervorgerufene Aktivierungen von Signalwegen wieder herunterreguliert sind, damit die UV-bedingte Aktivierung von Signalwegen ohne Einfluss der Zugabe frischen Mediums untersucht werden konnte.

2.2.4.3 Isolierung humaner dermaler Fibroblasten

Hautbiopsien aus chirurgischen Eingriffen wurden noch am Tag der Lieferung oder spätestens einen Tag später (Lagerung im Medium bei 4°C) zum Zwecke der Isolation dermaler Fibroblasten aufgearbeitet. Dabei wurde zunächst die Biopsie weitestgehend vom Fettgewebe befreit und dann in einer mit PBS befüllten Petrischale in kleinere Stücke von 5-6 mm² geteilt. Die folgenden Schritte wurden in verschiedenen Vertiefungen einer 6-Loch-Platte durchgeführt. Für 5 Sekunden wurden diese Hautstücke in 70%igem Ethanol desinfiziert und anschließend in PBS gewaschen. Um die Dermis und die Epidermis voneinander zu trennen, erfolgte der Verdau mit Dispase II (Roche, Mannheim), wobei diese mit PBS verdünnt wurde, um eine Konzentration von 2 U/ml zu erreichen. Dispase ist eine Kollagenase, die für Kollagen IV und Fibronectin spezifisch ist und dabei die Zellvitalität nicht beeinflusst [STENN *et al.*, 1989]. Nach einer Inkubation der Hautstücke mit Dispase II für 2 Stunden bei 37°C im Inkubator wurden die Hautbiopsien in PBS überführt und dort die Epidermis mittels Pinzette und Kanüle von der Dermis separiert. Jeweils 4-8 Dermisstücke wurden je Vertiefung einer weiteren 6-Loch-Platte gegeben. Nach kurzem Antrocknen der Dermisstücke an den Boden der Vertiefung wurden 3 ml DMEM (C⁺) hinzugegeben und die Kultur erfolgte wie unter den beschriebenen Bedingungen (Kapitel 2.2.4.1) im Inkubator. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt und nach ca. 2 Wochen sind die Fibroblasten bereits aus den Dermisstückchen ausgewachsen. Nachdem die auswachsenden Fibroblasten eine Konfluenz von 70% erreicht haben, wurden die Dermisstückchen entfernt und die ausgewachsenen Zellen dreier Vertiefungen einer 6-Loch-Platte passagiert und in eine 175 cm² Kulturflasche überführt. Diese Zellen befinden sich dann in der ersten Passage. Nach Erreichen einer 90%igen Konfluenz wurden die Zellen kryokonserviert (2.2.4.4) und für spätere Versuche in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Fibroblasten, die nach dem Einfrieren wieder in Kultur genommen wurden, befanden sich somit immer in der zweiten Passage.

2.2.4.4 Einfrieren von Fibroblasten

Nachdem die Fibroblasten in der ersten Passage eine 90%ige Konfluenz erreicht hatten, wurden sie passagiert. Die Zellen wurden dann in Einfriermedium (10% (v/v) Dimethylsulfoxid und 90% (v/v) FKS) aufgenommen, so dass 1×10^6 Zellen pro 1 ml Einfriermedium vorlagen. Es wurden je 1 ml der Zellsuspension in Kryoröhrchen gefüllt und diese dann langsam mittels eines mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehältnisses auf -80°C gekühlt. Durch das Isopropanol wird ein schonendes Einfrieren gewährleistet, da die Temperatur nicht schneller als 1°C pro Minute absinkt. Nach einem Tag wurden die Kryoröhrchen aus dem Einfrierbehältnis genommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4.5 Auftauen und Kultur der Fibroblasten

Die Anzucht sowie Aussaat und Kultur humaner dermaler Fibroblasten erfolgte stets in DMEM (C^+). Nur im Falle der Untersuchungen des Einflusses unterschiedlicher Kulturmedien bzw. seiner Komponenten auf die UVA-induzierten Signaltransduktionswege, wurde die Aussaat und Kultur in DMEM (B^+) durchgeführt. Um eingefrorene Fibroblasten wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen zunächst aus dem flüssigen Stickstoff genommen und dann zunächst für 5 Minuten bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Der Inhalt eines Kryoröhrchens (1 ml, 1×10^6 Zellen) wurde mit 9 ml vorgewärmtem Medium vermischt. Nach der Zentrifugation ($1000 \times g$, 10 min. bei RT) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml Medium resuspendiert. Die gut resuspendierten Zellen wurden in eine 175 cm^2 Kulturflasche, in der bereits 25 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt wurden, überführt. Die Fibroblasten befanden sich zu diesem Zeitpunkt in der zweiten Passage. Der Wechsel des Mediums erfolgte zweimal wöchentlich. Nachdem die Fibroblasten eine Konfluenz zwischen 70% und 80% erreicht hatten, wurden sie passagiert und in eine 500 cm^2 Triple-Kulturflasche oder in zwei bis drei weitere 175 cm^2 Kulturflaschen umgesetzt. Die Zellen befanden sich somit in der dritten Passage. Für die eigentlichen Versuche wurden die Fibroblasten entweder in 3 cm Petrischalen (250.000 Zellen in 2 ml Medium) oder in 96-Loch-Platten (10.000 Zellen in $200 \mu\text{l}$ Medium pro Kavität) ausgesät, so dass die Versuche stets in der vierten Passage durchgeführt wurden. Ein Mediumwechsel erfolgte 72 Stunden später. Die verwendeten Medien, ihre in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen und die Zusammensetzungen sind in der Tabelle 2-7 zusammengefasst.

Tab. 2-7: Darstellung der verwendeten Kulturmedien sowie ihre Zusammensetzungen.

<i>Medium</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Zusatzstoffe</i>						<i>Sonstiges</i>
		<i>Phenolrot</i>	<i>HEPES</i>	<i>FKS</i>	<i>Glutamin</i>	<i>Pen/Strep</i>		
DMEM (A)	Sigma	-	-	-	-	-	-	keine
DMEM (B)	Sigma	+	-	-	-	-	-	keine
DMEM (B ⁺)	Sigma	+	-	+	+	+	+	keine
DMEM (C)	PAA	+	+	-	+	+	+	Glucose (3.5 g/l)
DMEM (C ⁺)	PAA	+	+	+	+	+	+	Glucose (3.5 g/l)
DMEM (D)	Biochrom	-	+	-	-	-	-	keine
DMEM (D ⁺)	Biochrom	-	+	+	+	+	+	Additiv A

Die Konzentration des im Medium enthaltenen HEPES lag bei 25 mM (DMEM (C)/(D)). Zugewetztes FKS lag final in einer Konzentration von 10% (v/v) vor, Abweichungen sind entsprechend besonders erwähnt. In allen Fällen betrug die Endkonzentration zugewetzten Glutamins (Glutamax I) 2 mM, die des zugewetzten Penicillins (Pen) 50 U/ml und die des Streptomycins (Strep) 50 µg/ml. Supplementierte Medien wurden für maximal 4 Wochen verwendet und stets bei 4°C gelagert. Die beiden Kulturmedien, die für die Anzucht, Aussaat und Kultur der Fibroblasten verwendet wurden, sind besonders durch Rahmungen hervorgehoben.

Verwendeter Mediumzusatz:

Additiv A (50x)

Glucose	255 g/l
Natrium-Pyruvat	5.5 g/l
Natriumchlorid	4.88 g/l

Die Komponenten wurden in Aqua dest. gelöst und schließlich steril filtriert.

2.2.4.6 Passagieren der Fibroblasten

Unter Passagieren versteht man die Ablösung adhärenter Zellen von der Kulturgefäßoberfläche, um die Zellen einzufrieren (2.2.4.4) oder diese zwecks Expansion erneut in mehrere bzw. größere Kulturgefäße auszusäen. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen zunächst zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen, um das im Kulturmedium enthaltene fetale Kälberserum (FKS), das inhibitorisch auf die nachfolgende enzymatische Ablösung der Zellen wirken würde, zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen wurde vorgewärmtes Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Zellen mit dem Trypsin für 5 Minuten im Inkubator inkubiert. Durch leichtes Schlagen gegen die Kulturflasche oder Auf- und Abpipettieren des Trypsins in kleineren Kulturschälchen wurden die Fibroblasten vom Boden der Kulturgefäße gelöst. Um die Aktivität des Trypsins zu inhibieren, wurde vorgewärmtes Medium hinzugegeben, die Zellen gut resuspendiert und schließlich abzentrifugiert (1000 x g, 10 min. bei RT). Das Zellpellet wurde wieder in frischem, vorgewärmtem Medium resuspendiert, und die Zellen standen so der Neuaussaat zur Verfügung. Im Falle der Aussaat für die eigentlichen Versuche, wurden die Zellen zuvor ausgezählt, damit eine definierte Zellzahl pro Kulturgefäß eingehalten werden konnte. Die verwendeten PBS-, Trypsin-EDTA- und Mediumvolumina variierten je nach verwendetem Kulturgefäß und sind in Tabelle 2-8 dargestellt.

Tab. 2-8: Darstellung der verwendeten PBS-, Trypsin- und Mediumvolumina zum Passagieren von Fibroblasten in Abhängigkeit vom verwendeten Kulturgefäß.

<i>Kulturgefäß</i>	<i>PBS (Waschen)</i>	<i>Trypsin (Ablösen)</i>	<i>Medium (Trypsininhibition)</i>
3 cm-Petrischale bzw. Kavität einer 6-Loch-Platte	3 ml	0.5 ml	2.5 ml
175 cm ² Kulturflasche	20 ml	4 ml	20 ml
500 cm ² Kulturflasche	70 ml	13 ml	35 ml

2.2.4.7 Zellzahlbestimmung

Um eine definierte Menge dermalen Fibroblasten für Untersuchungen auszusäen, wurde die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0.1 mm; 0.0025 mm²) bestimmt. Dazu wurde das Zellpellet nach dem Trypsinieren in einem definierten Volumen Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 10 µl abgenommen und mit 10 µl Trypanblau (Serva, Heidelberg) vermischt. Ein Volumen von 10 µl wurde aus dieser Zellsuspension zum Auszählen der vitalen, ungefärbten Zellen entnommen. Dabei wurde jeweils der gemittelte Wert (W_{gem}) aus der Zellzahl der vier Großquadrate als Ausgangswert für die Zellzahlberechnung verwendet. Nachstehend ist die Formel für die Bestimmung der Zellzahl dargestellt.

$$(c) \text{ Zellzahl} = W_{\text{gem}} \times 10.000 \times 2 \times \text{Mediumvolumen (ml)}$$

2.2.4.8 Bestimmung der Vitalität

a) Calcein-Test

Zur Charakterisierung der Vitalität humaner dermalen Fibroblasten nach UV-Bestrahlung wurde der Calcein-Test in 96-Loch-Platten durchgeführt. Als Parameter der Untersuchungen dienen die zelleigenen Esterasen, die bei vitalen Zellen das zugesetzte, membrangängige Calcein-AM (MoBiTec, Göttingen) umsetzen, wobei das entstehende Produkt nach Anregung mit Licht der Wellenlänge von 485 nm eine Fluoreszenz bei 535 nm zeigt [PAPADOPOULUS *et al.*, 1994]. Eine geringe Fluoreszenz bei 535 nm zeigt damit eine geschädigte Esterasefunktion an und ist damit ein Indikator geschädigter Zellen. Der Calcein-Test wurde 24 Stunden nach der UV-Exposition durchgeführt, wobei immer Triplikate gleicher Behandlung ausgewertet wurden. Für die Durchführung des Calcein-Tests wurden die Zellen vorsichtig zweimal mit vorgewärmten PBS (150 µl pro Kavität) gewaschen und danach mit 100 µl der Calcein-AM Lösung (2 µM) pro Kavität inkubiert. Zur Kontrolle wurde in einige Vertiefungen der Platte, die keine Zellen enthielten, ebenfalls die Calcein-Lösung gegeben. Es folgte eine Inkubation der Platte für 30 Minuten im Inkubator und dann schließlich die fluorimetrische Auswertung unter Verwendung des Spectra Fluor Plus (Tecan, Crailsheim). Die Fluoreszenz der zellfreien Kontrollen wurde von der der zu bestimmenden Proben

abgezogen. Relativiert wurden die Daten auf die jeweils in dem entsprechenden Medium inkubierten, aber unbestrahlten Zellen.

Verwendete Lösung:

Calcein-AM-Lösung (2 μ M)

Calcein-AM- Stammlösung (4 mM) (gelöst in DMSO)	5 μ l
PBS	10 ml

Die Calcein-AM-Stammlösung (4 mM) wurde bei -20°C gelagert. Die Verdünnung in PBS erfolgte immer kurz vor Gebrauch.

b) MTT-Test

MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid) wird von vitalen Zellen zum korrespondierenden blauen Formazan reduziert. Der Nachweis des Formazans erfolgte photometrisch durch die Absorption bei 570 nm. Der MTT-Test wurde ausschließlich bei EpiDerm-Modellen durchgeführt. Die zu untersuchenden EpiDerm-Modelle wurden aus ihrem Medium genommen und einzeln in 300 μ l Maintenance-Medium (EPI-100-MM) mit gelöstem MTT (0.2 mg/ml) pro Kavität einer 24-Loch-Platte überführt. Nach einer 3 stündigen Inkubation im Inkubator wurden die Modelle durch Überführung in PBS gewaschen, um Reste der MTT-Lösung zu eliminieren. Schließlich wurden sie zur Formazan-Extraktion einzeln in je 2 ml Isopropanol pro Kavität einer 24-Loch-Platte überführt. Die Extraktion verlief im Dunkeln bei RT unter leichtem Schütteln (300 rpm) für 2 Stunden. Die Messung der Absorption bei 570 nm erfolgte in Triplikaten im Spectra Max 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), wobei immer 200 μ l der alkoholischen Extrakte pro Kavität in eine 96-Loch-Platte überführt wurden. Die Absorption reinen Isopropanols bei 570 nm wurde von der Absorption der Extrakte abgezogen.

Verwendete Lösung:

MTT-Lösung

MTT-Stammlösung (1 mg/ml PBS)	20% (v/v)
EPI-100-MM	80% (v/v)

Sowohl die MTT-Stammlösung als auch die gebrauchsfertige MTT-Lösung wurden kurz vor dem Gebrauch frisch angesetzt.

2.2.4.9 Fixierung und Kernfärbung der Fibroblasten

Für die Durchführung einer Kernfärbung zur indirekten Bestimmung der Zellzahl, um die vorangegangene Vitalitätsbestimmung auf eine Zelldichte genau derselben Kavitäten zu beziehen, war die Fixierung der adhärennten Fibroblasten in den 96-Loch-Platten erforderlich. Durch die Fixierung werden die zellulären Membranen permeabel gemacht, wodurch das impermeable, in die DNA interkalierende Ethidium-Homodimer (MoBiTec, Göttingen) die Zellen penetrieren kann. Nachdem die Medienüberstände abgenommen und die Zellen einmal mit PBS (100 µl pro Kavität) gewaschen worden waren, erfolgte zur Fixierung die Zugabe eines eiskalten Methanol:Aceton (1:1) Gemisches (100 µl pro Kavität). Nach Inkubation der Ansätze für 30 Minuten bei -20°C wurde das Methanol:Aceton-Gemisch abgenommen und die fixierten Zellen entweder gleich der Kernfärbung unterzogen oder für längere Zeit bei -20°C gelagert. Um Rückstände aus der Fixierung zu eliminieren, wurden die fixierten Zellen einmal mit PBS (200 µl pro Kavität) gewaschen. Schließlich wurde dann eine Ethidium-Homodimer-Lösung (4 µM) mit einem Volumen von 100 µl pro Kavität auf die fixierten Zellen gegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Ausschließlich interkaliertes Ethidium-Homodimer zeigte nach einer Anregung mit Licht der Wellenlänge von 535 nm eine Fluoreszenz bei 635 nm. Dieselben Triplikate wie bei dem vorangegangenen Calcein-Test wurden unter Verwendung des Spectra Fluor Plus (Tecan, Crailsheim) ausgewertet und die Fluoreszenzen der zellfreien Kontrollen von denen der zu bestimmenden Proben abgezogen.

Verwendete Lösungen:

Ethidium-Homodimer-Lösung (4 μ M)

Ethidium-Homodimer- Stammlösung (2 mM, gelöst in DMSO/H ₂ O (1:1))	20 μ l
PBS	10 ml

Die Ethidium-Homodimer-Stammlösung (2 mM) wurde bei -20°C gelagert, die Ethidium-Homodimer-Lösung (4 μ M) wurde jedoch vor Gebrauch frisch angesetzt.

2.2.4.10 Anfertigen von Paraffinschnitten

Die zur Paraffineinbettung vorgesehenen EpiDerm-Modelle wurden zunächst über Nacht in Carnoypuffer bei 4°C inkubiert. Die fixierten Präparate wurden im Mikrowellenautomaten (Microwave processing labstation for histology, MicroMED T/T Mega; Milestone, Sorisole, Italien) für eine Stunde in JFC-Solution (Milestone, Sorisole, Italien) entwässert und anschließend für 40 Minuten in heißem Paraffin inkubiert. In vorgesehenen Metallkassetten wurden die Modelle vorsichtig senkrecht zur Oberfläche aufgestellt und schließlich unter Verwendung einer Paraffin Wachs-Station (AP280-1, AP280-2 und AP280-3; Microm International GmbH, Walldorf) mit heißem Paraffin übergossen und auf einer gekühlten Platte für ungefähr zwei Stunden ausgehärtet. Die Lagerung der in Paraffin eingebetteten EpiDerm-Modelle erfolgte dann bei 4°C. Mittels eines Rotationsmikrotoms (RM 2155; Leica, Cambridge) wurden die Präparate 5 μ m dick geschnitten und in einem Wasserbad bei 42°C gestreckt. Die Aufnahme der Schnitte erfolgte direkt aus dem Wasserbad unter Verwendung von Organosilan-beschichteten Objektträgern. Die Lagerung der Schnitte erfolgte nur kurzfristig bei 4°C, da gleich im Anschluss mit der Immunhistologie begonnen wurde. Bevor jedoch immunhistologische Untersuchungen oder die Färbung mit Hämatoxylin/Eosin durchgeführt werden konnten, wurden die Paraffinschnitte zunächst durch folgende Inkubationsreihe entparaffiniert:

Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung:

- Xylol 5 Minuten
- Xylol 5 Minuten
- Isopropanol 5 Minuten
- Ethanol (96%) 3 Minuten
- Ethanol (80%) 3 Minuten
- Ethanol (70%) 3 Minuten
- ddH₂O 2 Minuten

Gleich im Anschluss wurde mit dem immunhistologischen Nachweis bzw. der Färbung mit Hämatoxylin/Eosin begonnen.

Die Beschichtung der Objektträger mit Organosilan

Zunächst wurde eine frische Organosilan-Lösung (2% (v/v) 3-Aminopropyltriethoxysilan in Aceton) hergestellt. Die Objektträger wurden zweimal für 2 Minuten in Aceton gewaschen und dann für eine Minute in der Organosilan-Lösung inkubiert. Nachdem die Objektträger dann zweimal kurz in Aceton und dreimal kurz in ddH₂O getaucht worden waren, erfolgte die Trocknung der Objektträger über Nacht bei 45°C im Trockenschrank. Die mit Organosilan beschichteten Objektträger wurden für längere Zeit bei RT gelagert.

Verwendeter Puffer:

<i>Carnoy</i> puffer	
Ethanol	60% (v/v)
Chloroform	30% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

2.2.4.11 Anfertigen von Kryostatschnitten

Die EpiDerm-Modelle, die für Kryostatschnitte vorgesehen waren, wurden nach erfolgter Postinkubation nach Behandlung zunächst in etwas „Tissue-Freezing Medium“ (Leica, Cambridge) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert. Zum Schneiden der Modelle wurden diese unter Verwendung des „Tissue-Freezing Mediums“ an einen Präparatehalter bei -30°C fixiert. Das Schneiden der Modelle erfolgte ebenfalls bei -30°C im Kryotom (Jung Frigocut 2800E, Leica, Cambridge). Die 9 µm dicken Kryostatschnitte wurden direkt vom Messer auf die Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger übertragen und gleich den weiteren Schritten der Immunhistologie unterzogen.

Die Beschichtung der Objektträger mit Poly-L-Lysin

Zur Beschichtung der Objektträger wurden diese für 10 Minuten bei 37°C in einer Poly-L-Lysin-Lösung (0.1%) inkubiert. Anschließend erfolgte die Trocknung der Objektträger bei 60°C im Trockenschrank. Beschichtete Objektträger wurden für längere Zeit bei RT gelagert.

2.2.4.12 Histologische Färbungen

Einige EpiDerm-Modelle wurden der Hämatoxylin/Eosin Färbung unterzogen. Der Nachweis der Cyclooxygenase-2 bzw. der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere erfolgte immunhistologisch unter Verwendung spezifischer Antikörper. Die angefärbten Schnitte wurden mikroskopiert (Axiovert 100; Zeiss, Göttingen) und mittels der Bildanalyse (CCD-Kamera; Intas, Göttingen und analySIS Software; Soft Imaging System GmbH, Münster) dokumentiert.

2.2.4.12.1 Immunhistologische Detektion der Cyclooxygenase-2

Der Nachweis der Cyclooxygenase-2 erfolgte in Paraffinschnitten der Dicke von 5 µm. Die Objektträger mit den entparaffinierten Schnitten wurden schließlich mit Abdeckplatten versehen, die die Zugabe geringer Mengen weiterer Substanzen und dabei unter Aufrechterhaltung eines steten Flüssigkeitsfilmes die Verteilung der Substanzen über den ganzen Objektträger hinweg erlauben. Die Objektträger wurden mit der daraufliegenden

Abdeckplatte in einen Objektträgerhalter eingespannt und schließlich durch Zugabe von 200 µl TBS-T (0.1% (v/v) Tween 20) gewaschen. Die Blockierung freier Bindungsstellen erfolgte durch die Zugabe von 1% (w/v) BSA in TBS-T und wurde für eine Stunde bei RT durchgeführt. Die Zugabe des primären Antikörpers (anti COX-2) erfolgte in einer Verdünnung von 1:200 in 1% (w/v) BSA in TBS-T. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nachdem die Objektträger 5-6mal mit TBS-T gewaschen worden waren, wurde der sekundäre Antikörper (anti Ziege (Alexa Fluor 488), 1:1000 in 1% (w/v) BSA in TBS-T) hinzugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden 5-6mal mit TBS-T gewaschen und dann unter Verwendung des Mowiol-Einbettmediums mit Deckgläsern versehen. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bis zum Mikroskopieren bei 4°C im Dunkeln.

Verwendetes Medium:

Einbettmedium Mowiol

Mowiol 4-88	9.6 g
Glyzerin	24 ml
ddH ₂ O	24 ml

Die Substanzen wurden unter Rühren gelöst und dann erfolgte die Zugabe von:

Tris (0.2 M, pH 8.5)	48 ml
----------------------	-------

Alle Komponenten wurden bei 50°C unter Rühren gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.2.4.12.2 Immunhistologische Detektion der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere

Für die Detektion der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) wurden ausschließlich Kryoschnitte verwendet. Die EpiDerm-Schnitte wurden zunächst nacheinander für jeweils 5 Minuten in eiskaltem (-20°C) Methanol und Aceton fixiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden die folgenden Schritte bei RT durchgeführt. Nach der Fixierung wurden die Schnitte zur Rehydrierung für eine Stunde in TKT 100 Puffer inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift für 5 Minuten in PBS wurden die Schnitte zweimal für je 5 Minuten in SSC-Puffer (2x) inkubiert und schließlich wieder für 5 Minuten in PBS gewaschen. Nach dieser

Rehydrierung erfolgten weitere Inkubationsschritte, die zur Denaturierung der fixierten DNA führten. Dabei erfolgte die Inkubation der Schnitte für 3 Minuten im Denaturierungspuffer und dann abschließend die Dehydrierung über eine aufsteigende Alkoholreihe (Inkubation jeweils für 1 Minute in 70%igem, 90%igem und 96%igem Ethanol). Auf die luftgetrockneten Objektträger wurde eine Proteinase K Lösung (10 µg/ml PBS, frisch angesetzt) gegeben, so dass die fixierten Schnitte gut bedeckt waren. Nach einer Inkubation für 10 Minuten im Inkubator erfolgte das dreimalige Waschen der Schnitte für jeweils 5 Minuten in PBS. Die Objektträger wurden nun mit Abdeckplatten versehen, die die Zugabe geringer Mengen weiterer Substanzen und dabei unter Aufrechterhaltung eines steten Flüssigkeitsfilmes die Verteilung der Substanzen über den ganzen Objektträger hinweg erlauben. Die Objektträger wurden mit der darauf liegenden Abdeckplatte in einen Objektträgerhalter eingespannt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde zum einen BSA (3% (w/v) in PBS) für 1 Stunde und nach kurzem Waschen mit PBS zum anderen Ziegen Serum (5% (v/v) in PBS) für 30 Minuten auf die Objektträger gegeben. Nun folgte nach einmaligem Waschen mit PBS die Zugabe des primären Antikörpers (anti CPD, 1:500 in 2% (w/v) BSA in PBS). Die Inkubation des primären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Kontrollen, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert werden sollten, erhielten nur 2% (w/v) BSA in PBS. Nach erfolgter Inkubation wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper (anti Maus (Alexa Fluor 488), 1:1000 in 2% (w/v) BSA in PBS) für 1.5 Stunden bei RT und im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Schnitte mit PBS gewaschen und schließlich unter Verwendung von Mowiol-Einbettmedium mit Deckgläsern eingeschlossen. Bis zum Mikroskopieren wurden die Objektträger dunkel und bei 4°C gelagert.

Verwendete Puffer:

TKT 100

Tris, pH 7.2	50 mM
Kaliumchlorid	1 M
Triton X-100	0.3% (v/v)

SSC (10x)

Natriumcitrat, pH 7.0	150 mM
Natriumchlorid	1.5 M

Denaturierungspuffer

Natriumhydroxid	0.1 M
Ethanol	70% (v/v)

2.2.4.12.3 Hämatoxilin/Eosin Färbung

Die Hämatoxilin/Eosin Färbung wurde ausschließlich an Paraffinschnitten durchgeführt. Das Hämatoxilin zeigt basophile Strukturen, wie die Zellkerne, saure Matrix und Keratohyalin granula. Das Eosin bindet als saurer Farbstoff hingegen an azidophile Strukturen und färbt damit das Zytoplasma rot an. Die entparaffinierten Schnitte wurden für 3 Minuten in Hämalaun inkubiert und schließlich für weitere 10 Minuten unter fließendem Wasser gebläut. Die Schnitte wurden dann für 15 Minuten in 0.1% (w/v) wässrigem Eosin inkubiert und danach über kurze Inkubationen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80% Ethanol, 96% Ethanol, Isopropanol und Xylol) dehydriert. Das Einbetten der Schnitte erfolgte unter Verwendung von Euparal (Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe).

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA)

Zum Zwecke der Untersuchung der COX-2 Expression im EpiDerm-Modell auf transkriptioneller Ebene, wurde zunächst die gesamte Ribonukleinsäure (RNA) isoliert. Die RNA-Isolation wurde unter Zuhilfenahme des High Pure RNA tissue Kit (Roche, Mannheim) durchgeführt. Um die COX-2 Expression sowohl auf der Ebene der Transkription als auch auf der Proteinebene parallel untersuchen zu können, wurden die EpiDerm-Modelle zunächst nach erfolgter Behandlung und Postinkubation in Hälften geschnitten. Zur RNA-Isolation wurde die Epidermis in 400 µl des im Kit enthaltenen RNA Lysis- und Bindungspuffer überführt und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die mechanische Zerkleinerung der Epidermis erfolgte unter Anwendung eines Glas-Homogenisators (1 ml; Wheaton, New Jersey, USA). Zusätzlich wurden die Lysate 10-15 kurzen Ultraschallstößen ausgesetzt. Die Aufreinigung der RNA wurde dann schließlich ohne weitere Modifikation nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.2 Quantifizierung der isolierten RNA

Die absorbierenden Eigenschaften der Nukleinsäuren, insbesondere ihrer Basen im UV-Bereich (260 nm) kann man sich für ihre Quantifizierung zu Nutze machen. Dabei steigt die Extinktion bei 260 nm proportional gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz zur Konzentration der Nukleinsäuren an. Die isolierte RNA wurde 1:10 in DEPC Wasser verdünnt und dann in einer 70 µl Quarzglasküvette photometrisch vermessen. Um den Anteil ebenfalls vorhandener Proteine im RNA-Isolat und damit die Reinheit der RNA zu bestimmen, wurde ebenfalls die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. In diesem Bereich absorbieren aromatische Aminosäurereste, so dass die Höhe der Absorption bei 280 nm ein Maß für kontaminierende Proteine ist. Idealerweise liegt das Verhältnis zwischen der Absorption bei 260 nm und der bei 280 nm bei 2.0. Aber auch RNA-Isolate mit einem geringeren Verhältnis von bis zu 1.6 sind ohne Probleme für den Einsatz in einer Real-Time TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion geeignet. Die vorhandenen RNA-Konzentrationen wurden bereits vom Photometer (Ultrospec 3000; Pharmacia Biotech, Freiburg) angegeben, so dass nur noch die eingesetzte Verdünnung berücksichtigt werden musste.

$$\text{Lambert-Beer'sches Gesetz: } E = \varepsilon * c * d$$

E = Absorption bei 260 nm

ε = RNA-Extinktionskoeffizient (40 µl * µg⁻¹ * cm⁻¹)

c = RNA-Konzentration

d = Schichtdicke (cm)

2.2.5.3 Auftrennung der Ribonukleinsäuren im Agarosegel

Die RNA eukaryontischer Zellen besteht zu ungefähr 95% aus ribosomaler RNA (rRNA). Diese lässt sich wiederum in 28S, 18S, 5.8S und 5S rRNA unterteilen. Die 28S rRNA (5.1kb) und die 18S rRNA (1.9kb) sollten nach der Auftrennung im Agarosegel als scharfe, getrennte Banden sichtbar sein. Diese beiden Banden stellen einen guten Marker für die Integrität der isolierten RNA dar. Die Auftrennung erfolgte in einem durch Formaldehyd denaturierenden, 1%igen Agarosegel. Zur Herstellung des Agarosegels wurde zunächst 1 g Agarose (Life Technologies, Eggenstein) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit 87.5 ml Aqua dest.

vermischt. Zur Lösung der Agarose wurde das Gemisch in der Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt und dann unter Rühren für 2-5 Minuten bei RT unter einem Abzug leicht abgekühlt. Es folgte die Zugabe von 5 ml MOPS-Puffer (10x) und 7.5 ml Formaldehyd (36.5-38%). Nach sorgfältigem Vermischen aller Komponenten wurde die Lösung in einen Gel-Gießstand gegeben, wo sie schließlich innerhalb einer Stunde nach Einsetzen des Auftragskammes zum Agarosegel aushärtete. Nach Entfernen des Auftragskammes und Überführung des Agarosegels in eine mit MOPS-Puffer (1x) gefüllte Laufkammer (HorizonTM 11-14; Life Technologies, Eggenstein), konnten die RNA-Proben auf das Gel aufgetragen werden. Zuvor wurden die aufzutrennenden RNA-Proben (100 ng-300 ng) mit Probenauftragspuffer für Agarosegelelektrophorese vermischt und für 10-15 Minuten bei 70°C im Thermomixer denaturiert und danach kurz zentrifugiert (5000 x g, 20 sek. bei RT). Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 50-60 V durchgeführt und erst unterbrochen, nachdem die Front aus Bromphenolblau einen Anstand von 4-5 cm von den Probenauftragstaschen erreichte. Das Agarosegel wurde schließlich der Laufkammer entnommen und die RNA-Integrität unter Verwendung eines UV-Tisches und des Gel-Dokumentationssystems beurteilt.

Verwendete Puffer:

<u><i>Probenauftragspuffer</i></u>		<u><i>MOPS-Puffer (10x)</i></u>	
Formaldehyd (36.5-38%)	45 µl	MOPS	83.72 g/l
Formamid	45 µl	Natriumacetat	8.2 g/l
MOPS-Puffer (10x)	5 µl	EDTA	3.72 g/l
Ethidiumbromid ((10 mg/ml); MoBiTec, Göttingen)	3.5 µl	Nach vollständiger Lösung aller Komponenten wurde der pH-Wert auf 7.0 eingestellt und der Puffer autoklaviert.	
0.1 M EDTA (pH 7.5)	1.5 µl		
Bromphenolblau (1% in wässrigem Glycerin 50% (v/v))	8 µl		
Dieser Probenauftragspuffer ist ausreichend für 10 RNA-Proben.			

2.2.5.4 Real-Time TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion

Die Real-Time TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion stellt ein sehr sensitives System zur quantitativen Detektion und Analyse von Nukleinsäuren dar. In dieser Arbeit wurde sie für die Quantifizierung zweier RNA-Sequenzen in einer gegebenen Probe verwendet. Grundlage ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), eine durch spezifische Oligonukleotide (Primer) definierte, enzymatische *in vitro*-Replikation mit einer exponentiellen Amplifikation einer Zielsequenz [SAIKI *et al.*, 1985]. Die Besonderheit der TaqMan-PCR besteht darin, dass die Amplifikation der Zielsequenz während der Reaktion nachgewiesen werden kann. Das Schlüsselenzym der TaqMan-PCR, die sogenannte rTth DNA-Polymerase (enthalten im TaqMan EZ RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt)), ist ein Enzym, das nach seiner Hitzeaktivierung (60°C) drei Eigenschaften in sich vereint: Zum einen stellt sie eine reverse Transkriptase dar, die es im ersten Schritt ermöglicht, aus dem vorliegenden Pool unterschiedlichster RNAs cDNAs zu synthetisieren. Diese cDNAs stellen dann, je nach Auswahl der flankierenden Oligonukleotide (Primer), für eine nachfolgende PCR die unterschiedlichen DNA-Matrizen (Templates) dar. Im zweiten Schritt, der eigentlichen PCR, übt die rTth DNA-Polymerase sowohl die Funktion einer thermostabilen DNA-abhängigen DNA-Polymerase als auch die einer 5'-3'-Exonuklease aus. Die Exonukleaseaktivität ist für die quantitative Erfassung der sich amplifizierenden Zielsequenz von besonderer Bedeutung. Denn zusätzlich zu den Primern, die spezifisch die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren, wird dem Ansatz noch eine Sonde hinzugefügt, die spezifisch an die Sequenz bindet, die von den Primern flankiert wird [LEE *et al.*, 1993]. Die Sonde ist am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff, in diesem Fall dem TAMRA konjugiert, während das 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall dem FAM konjugiert ist. Der Quencher hat die Aufgabe, die Fluoreszenz des relativ in seiner Nähe gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zu unterdrücken [FÖRSTER, 1948; LAKOWICZ, 1983]. Kommt es jedoch durch die rTth DNA-Polymerase in der Elongationsphase der PCR zur Verlängerung des 3'-Endes der Primer, so trifft sie auf die gebundene Sonde. Ist dies der Fall, wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der rTth DNA-Polymerase zerschnitten, so dass der Quencher die enge Nachbarschaft zum Fluoreszenzfarbstoff verliert und dieser dadurch nach Anregung mit Licht der Wellenlänge von 488 nm seine Fluoreszenz bei 518 nm emittieren kann. Die Zunahme der Fluoreszenz verläuft damit proportional zur Amplifikation der Oligonukleotidsequenz [BUSTIN, 2000], die einen spezifischen Bereich auf der Ziel cDNA darstellt, die ihrerseits im ersten Reaktionsschritt aus dem Pool an RNAs

revers transkribiert wurde. Um die Verlängerung der Sonde während der Elongationsphase der PCR zu unterdrücken, wurde das 3'-Ende der Sonde durch einen Phosphatrest blockiert. Die freie, nicht hybridisierte Sonde wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der rTth DNA-Polymerase nicht geschnitten, da diese spezifisch für Doppelstränge ist [HEID *et al.*, 1996]. Der PCR Zyklus, bei dem zum ersten Mal ein signifikanter Anstieg des Fluoreszenz-Signals, assoziiert mit einem exponentiellen Wachstum zu verzeichnen ist, wird als „threshold cycle“ (C_T) bezeichnet. Je höher die Konzentration der zu amplifizierenden Zielsequenz in der Probe ist, desto früher kommt es zur exponentiellen Amplifikation der Zielsequenz, d.h. desto niedriger ist der C_T -Wert. Der C_T -Wert spiegelt die Basis zur Quantifizierung der eingesetzten Ziel-RNA wider.

2.2.5.4.1 Design von Sonde und Primern

Um die Sonde und die Primer zu entwerfen, wurde zunächst die cDNA-Sequenz der humanen Cyclooxygenase-2 aus einer Datenbank (GenBank: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/query_form.html) geladen. Es wurde die cDNA-Sequenz gewählt, damit die Nukleotidsequenz ohne Intronbereiche vorlag. Diese Sequenz diente dann der Primer ExpressTM Software (Version 1.0; PE Applied Biosystems, Weiterstadt) als Vorlage, um ideale Primer und eine ideale Sonde zu entwickeln. Die Übergänge der aufeinanderfolgenden Exons wurden eingezeichnet, und es wurden aus den von der Software erarbeiteten Vorschlägen die Primer ausgewählt, die komplementär zu den Sequenzen zweier aufeinanderfolgender Exons sind. Eine ganze Reihe von Eigenschaften, die ideale Primer auszeichnen, wurden vom Hersteller zusammengefasst [OEHLMANN, 1997]. Es wurde eine Sonde ausgesucht, die zum einen zwischen den flankierenden Oligonukleotiden liegt und zum anderen genau in einem Bereich hybridisiert, der einen Exon-Exon Übergang darstellt. Auch an die Sonde wurden noch weitere Anforderungen laut Hersteller gestellt, die im Primer ExpressTM Manual 1.0 [OEHLMANN, 1997] dargestellt sind. Alle vom Hersteller empfohlenen Eigenschaften, die eine ideale Sonde bzw. ideale Primer auszeichnen, konnten nur annähernd realisiert werden. Die auf die Art und Weise ausgewählten Sonden und Primer stellten somit sicher, dass ausschließlich ein Bereich aus der cDNA, die aus der reversen Transkription der entsprechenden COX-2 mRNA stammte, amplifiziert werden konnte. Die Trennung der beiden Primer durch ein vorliegendes Intron, wie es im Falle des Einsatzes genomischer DNA als Matrize wäre, sowie außerdem die durch das Intron verhinderte

Bindung der Sonde, würde die Amplifikation eines Bereiches aus dem Cox-2 Gen verhindern. Um sicherzustellen, dass die gewählten Primer und die ausgewählte Sonde auch spezifisch für die Cyclooxygenase-2 sind, wurden die Sequenzen mit Hilfe der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Suchmaschine in Internet gegen alle in der Datenbank vorliegenden humanen RNA-Sequenzen verglichen. Die Synthese der Primer sowie der FAM/TAMRA-Sonde wurden von Applied Biosystems (Weiterstadt) durchgeführt. Die Sequenzen der COX-2 und 18S rRNA cDNA, der ausgewählten Primer sowie der eingesetzten Sonde sind im Anhang dargestellt (Tabellen 7-1, 7-2 und 7-3).

2.2.5.4.2 Optimierung der Real-Time TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion

Zur Durchführung der TaqMan-PCR wurden alle erforderlichen Reagenzien dem TaqMan EZ RT-PCR Kit entnommen. Die TaqMan-PCR wurde vor ihrem routinemäßigen Einsatz zur Quantifizierung der COX-2 mRNA in unterschiedlichen Proben noch zwei weiteren Optimierungsschritten unterzogen. Die Optimierungen betrafen zum einen die Konzentration des Manganacetats im Reaktionsansatz und zum anderen die Konzentration der beiden Primer. Die beiden Optimierungsschritte wurden getrennt voneinander und nacheinander durchgeführt. Es wurden dabei in einem Einsatzbereich von 2 mM bis 5 mM Manganacetat und in der zweiten Optimierung bei einem Einsatz von 100 nM bis 1.8 μ M der Primer die Bedingungen als optimal angesehen, bei denen der C_T -Wert am niedrigsten war. Zum Zwecke der Auswahl eines geeigneten Auswerte- und Quantifizierungssystems wurde im Anschluss an diese Optimierungsschritte die Effizienz der Amplifikation des ausgewählten Bereiches aus der COX-2 cDNA im Vergleich zur der der ausgewählten Referenz (18S rRNA), auf die die Daten quasi als „Beladungskontrolle“ relativiert werden sollten, analysiert. Ist die Effizienz beider Amplifikationen identisch oder innerhalb enger Toleranzgrenzen, so ist die Quantifizierung über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode erlaubt, ansonsten ist das Mitführen einer Standardreihe, die aus unterschiedlich konzentrierter RNA besteht, für jeden Reaktionslauf erforderlich. Die Effizienz einer Reaktion wird bestimmt, indem die Standardreihen der beiden zu vergleichenden Reaktionen (Target und Referenz) relativ zueinander betrachtet werden. Verlaufen die beiden Standardreihen (C_T -Wert in Abhängigkeit vom Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge) parallel, so dass ihre Beziehung durch eine Gerade mit einer Steigung von < 0.1 darstellbar ist, darf die $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt werden [OEHLMANN, 1997].

2.2.5.4.3 Durchführung der Real-Time TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion

Die TaqMan-Polymerase-Kettenreaktion wurde unter Verwendung von Reaktionsgefäßen, die durch optische Deckel verschließbar sind, im 96-Platten-Format durchgeführt. Die Quantifizierung der COX-2 mRNA erfolgte immer relativ zu einer Referenz, die die Merkmale eines „housekeeping“-Gens tragen sollte. In dieser Arbeit wurde als Referenz die 18S rRNA gewählt, wobei sowohl die Primer-, SONDENSEQUENZEN als auch die optimalen Mangan- und Primerkonzentrationen bereits im Labor „Trockene Haut“ der Beiersdorf AG entwickelt und erhoben wurden. Die Amplifikation beider Zielsequenzen (COX-2 und 18S rRNA) wurde für eine Probe immer innerhalb derselben Reaktionsplatte, aber aufgrund der gleichen Fluoreszenzeigenschaften beider Sonden in unterschiedlichen Reaktionsgefäßen und jeweils in Triplikaten durchgeführt. Auf jeder Reaktionsplatte wurde eine Standardreihe aus verdünnter RNA, die aus unbehandelten EpiDerm-Modellen isoliert und photometrisch quantifiziert wurde, mitgeführt. Für alle durchgeführten TaqMan-Polymerase-Kettenreaktionen wurde die mitgeführte Standardreihe aus demselben RNA-Pool erstellt. Desweiteren enthielt jede Reaktionsplatte Negativkontrollen, die den gesamten PCR-Ansatz ohne jedoch RNA enthielten. Diese sollten einen Hinweis auf relevante RNA Kontaminationen im PCR-Ansatz geben. Das Gesamtvolumen in jedem Reaktionsgefäß betrug 25 µl, wobei sich diese aus 9.5 µl verdünnter RNA (20 ng) und 15.5 µl des Gemisches der übrigen Komponenten zusammensetzten. Die zur TaqMan-PCR erforderlichen Komponenten wurden dem TaqMan EZ RT-PCR Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) entnommen und in einem Großansatz (Master-Mix), ausreichend für alle Reaktionsansätze der entsprechenden Zielsequenz einer Reaktionsplatte zusammengegeben, dem dann für jedes Reaktionsgefäß die 15.5 µl entnommen wurden. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Amplifikation der jeweiligen Zielsequenz ist in Tabelle 2-10 zusammengefasst. Die Reaktionsansätze wurden stets auf Eis mit der RNA zusammengegeben, die Reaktionsgefäße schließlich mit den optischen Deckeln fest verschlossen und dann vor dem Start der Reaktion kurz zentrifugiert (1000 x g, 1 min. bei RT). Die Polymerase-Kettenreaktionen wurden im ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) unter Anwendung des in Abbildung 2-1 dargestellten Programms durchgeführt. Dabei wird in der Reaktion 1 die beigegefügte Uracil-N-Glykosylase (UNG) aktiv, die spezifisch Uracil-glykosidische Bindungen von doppelsträngigen PCR-Produkten hydrolysiert. Dies verhindert die Amplifikation von Kontaminationen aus vorangegangenen TaqMan Reaktionen, in der die Amplifikate immer

anstelle des dTTP dUTP enthalten [LONGO *et al*, 1990]. Die folgende Reaktion 2 muss oberhalb von 55°C stattfinden, damit die Uracil-N-Glykosylase die neu gebildeten Amplifikate (cDNA), die dUTP enthalten, nicht hydrolysiert, denn das Temperaturoptimum der UNG liegt $\leq 55^\circ\text{C}$. Die Reaktion 2 findet für 30 Minuten bei einer Temperatur von 60°C statt und dient der reversen Transkription. In diesem Temperaturbereich wird die rTth DNA-Polymerase aktiviert und übt ihre Funktion als reverse Transkriptase aus. In Reaktionsschritt 3 wird zum einen die UNG bei einer Temperatur von 95°C inaktiviert und zum anderen die vorliegende cDNA denaturiert. Die Reaktion 4 stellt die eigentliche PCR zum Zwecke der Amplifikation der Zielsequenz dar. Diese Reaktion setzt sich aus zwei Inkubationen zusammen, die zum einen der Denaturierung der DNA (94°C für 20 sek.) und zum anderen der Hybridisierung von DNA-Matritze, Sonde und Primer sowie der Elongation der Primer durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität der rTth DNA-Polymerase (59°C für 1 min.) dient. Die Reaktion 4 wurde zur Amplifikation der Zielsequenz in 40 Zyklen durchgeführt.

2.2.5.4.4 Auswertung und Quantifizierung der COX-2 mRNA

Da sich die Effizienzen der Amplifikation beider Zielsequenzen leicht unterscheiden, so dass die relative Quantifizierung über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode nicht zulässig war, wurde auf jeder Reaktionsplatte eine Standardreihe aus RNA-Verdünnungen, die einen Bereich von 0.0125 ng bis 25 ng RNA abdeckte, mitgeführt. Die erhaltenen C_T -Werte aus der Standardreihe für eine Zielsequenz wurden in das Verhältnis zu dem Logarithmus der entsprechend eingesetzten RNA-Menge gesetzt. Aufgrund der Standardreihen beider Zielsequenzen konnte jeder erhaltene C_T -Wert der unbekanntenen Proben in eine RNA-Menge umgewandelt werden. Die so errechnete RNA-Menge für die COX-2 Amplifikation wurde auf die der Referenz (18S rRNA) relativiert. Die dann vorliegende relative COX-2 mRNA-Menge einer Probe wurde dann auf die relative COX-2 mRNA-Menge der korrespondierenden unbehandelten Kontrolle, den sogenannten Kalibrator, normiert. Eine Beispielrechnung ist in Tabelle 2-9 wiedergegeben.

Tab. 2-9: Schematische Darstellung des Verfahrens zur relativen Quantifizierung der COX-2 mRNA in zu untersuchenden RNA-Isolaten.

<i>Zielsequenz</i>	<i>Standardgerade</i>	<i>C_T-Wert</i>	<i>RNA-Menge (10^x)</i>	<i>relative COX-2 mRNA</i>
I. Unbehandelte Probe (Kalibrator)				
COX-2	$y = -3.9x + 36.4$	34	4.12 ng	0.168 ng
18S rRNA	$y = -3.6x + 19$	14	24.5 ng	
II. Behandelte Probe				
COX-2	$y = -4x + 36.5$	32	12.59 ng	0.466 ng
18S rRNA	$y = -3.7x + 18.8$	13.5	27 ng	

Normiert man die auf die Referenz relativierte COX-2 mRNA-Menge der behandelten Probe auf den Kalibrator (unbehandelte Kontrolle), so zeigt sich durch die Behandlung eine Induktion der COX-2 mRNA um 277%.

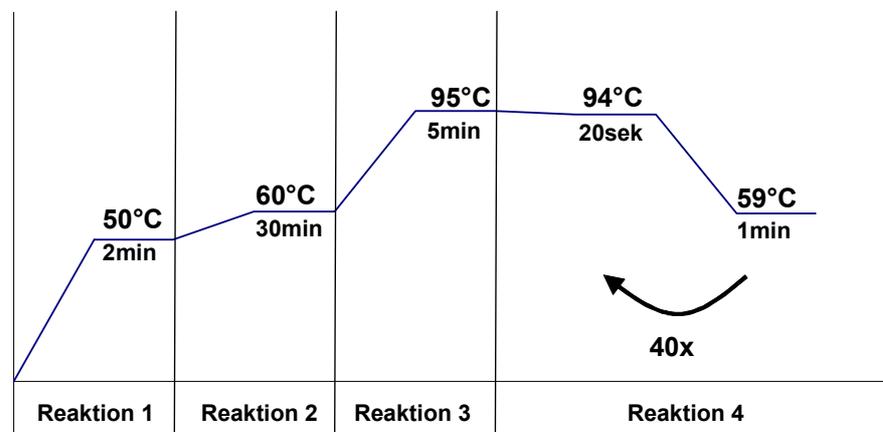


Abb. 2-1: Darstellung TaqMan PCR-Programmes. Reaktion 1: Hydrolyse möglicher Kontaminationen durch Amplifikate vorangegangener TaqMan Reaktionen durch die Uracil-N-Glykosylase. **Reaktion 2:** Reverse Transkription. **Reaktion 3:** Denaturierung der cDNA und Inaktivierung der Uracil-N-Glykosylase. **Reaktion 4:** Amplifikation der Zielsequenz.

Tab. 2-10: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Amplifikation der jeweils angegebenen Zielsequenz.

<i>Komponente</i>	<i>Reaktionsansatz COX-2</i>	<i>Reaktionsansatz 18S rRNA</i>
EZ-Puffer	5 µl	5 µl
dATP (10 mM)	0.75 µl	0.75 µl
dCTP (10 mM)	0.75 µl	0.75 µl
dGTP (10 mM)	0.75 µl	0.75 µl
dUTP (20 mM)	0.75 µl	0.75 µl
Primer forward (10 µM)	0.25 µl	0.125 µl
Primer reverse (10 µM)	1.5 µl	0.75 µl
Sonde (5 µM)	0.5 µl	0.5 µl
rTth-Polymerase (2.5 U/µl)	1 µl	1 µl
Uracil-N-Glykosylase (1 U/µl)	0.25 µl	0.25 µl
Manganacetat (25 mM)	4 µl	3 µl
DEPC ddH ₂ O	----	1.875 µl
Summe	15.5 µl	15.5 µl
RNA-Isolat (20ng)	9.5µl	9.5µl
Gesamtvolumen eines Ansatzes	25 µl	25 µl

3. Ergebnisse

3.1 Darstellung der Versuchsgrundlagen

3.1.1 Das EpiDerm-Modell als Zellsystem

Für die folgenden Versuche wurde das kommerziell erhältliche EpiDerm-Modell (MatTek, Asland, USA) verwendet. Bei diesem Modell handelt es sich um eine *in vitro* entwickelte Epidermis, die die natürlich vorkommenden Differenzierungsformen der darin enthaltenen Keratinozyten aufweist (Abbildung 3-1). Es wurde dieses Modell gegenüber primären Keratinozyten-Monolayerkulturen vorgezogen, da es aufgrund der Differenzierungsstadien und der damit verbundenen Dreidimensionalität der *in vivo*-Situation deutlich mehr entspricht, obwohl auch diesem Modell weitere epidermisassoziierte Zellen fehlen.



Abb. 3-1: Querschnitt durch das EpiDerm-Modell. Dargestellt ist ein Hämatoxylin/Eosin gefärbter Paraffinschnitt des EpiDerm-Modells von 5 µm Dicke.

3.1.2 UV-Spektren des Sonnensimulators

Für die Bestrahlungen der EpiDerm-Modelle wurde ausschließlich der Sonnensimulator (Oriol Instruments, Stratford, USA) verwendet. Durch den Einsatz unterschiedlicher UV-Filter wurden die UV-Expositionen mit simuliertem Sonnenlicht (SSL), dem simulierten Sonnenlicht ohne UVB-Anteil (d.h. ohne 290 bis 320 nm, UVA) und dem simulierten Sonnenlicht ohne UVB- und UVA2-Anteil (d.h. ohne 290 bis 350 nm, UVA1) erzielt. Die UV-Spektren dieser UV-Qualitäten sind in der Abbildung 3-3 dargestellt.

3.2 UV-Licht als Stimulus der Entzündungsreaktion

Da die Cyclooxygenasen als Schlüsselenzyme in der Entzündungsreaktion anzusehen sind, wurde die induzierbare Cyclooxygenase-2 (COX-2) als Marker einer beginnenden Entzündungsreaktion näher untersucht. Das simulierte Sonnenlicht stellt sich als ein effektiver Stimulus der Cyclooxygenase-2 Expression heraus. Immunhistologische Untersuchungen haben gezeigt, dass die COX-2 Expression vornehmlich im *Stratum basale* des EpiDerm-Modells infolge der UV-Exposition erhöht exprimiert wird, also in der mitotisch aktivsten Zellschicht (Abbildung 3-2). Weitere Untersuchungen sollten die Effizienz definierter UV-Bereiche innerhalb des simulierten Sonnenlichtes, die COX-2 Expression zu stimulieren, sowohl qualitativ als auch näherungsweise quantitativ aufklären.

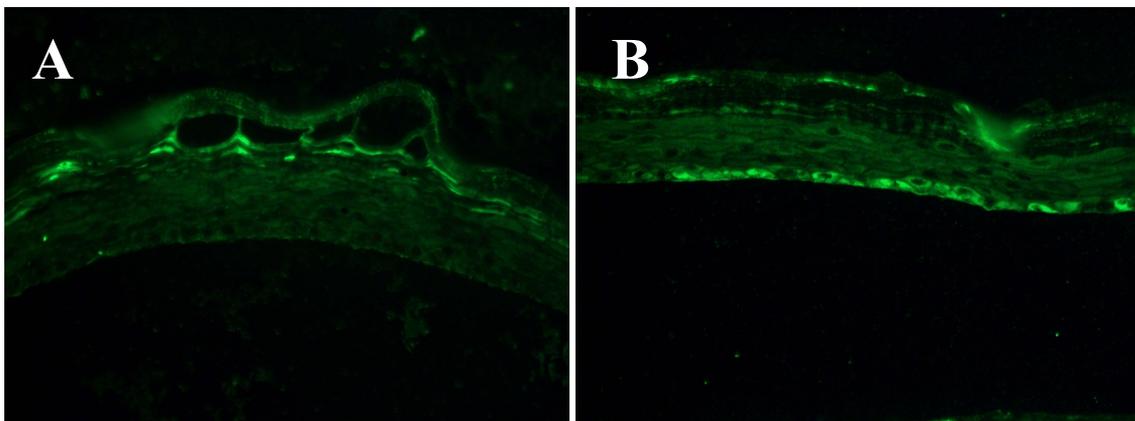


Abb. 3-2: Immunhistologischer Nachweis der COX-2 Expression. Dargestellt ist die COX-2 Expression im EpiDerm-Modell ohne UV-Exposition (A) und 6 Stunden nach Bestrahlung mit SSL (135 mJ/cm^2 UVB, B). Die COX-2 wurde immunhistologisch in $5 \mu\text{m}$ Paraffinschnitten untersucht.

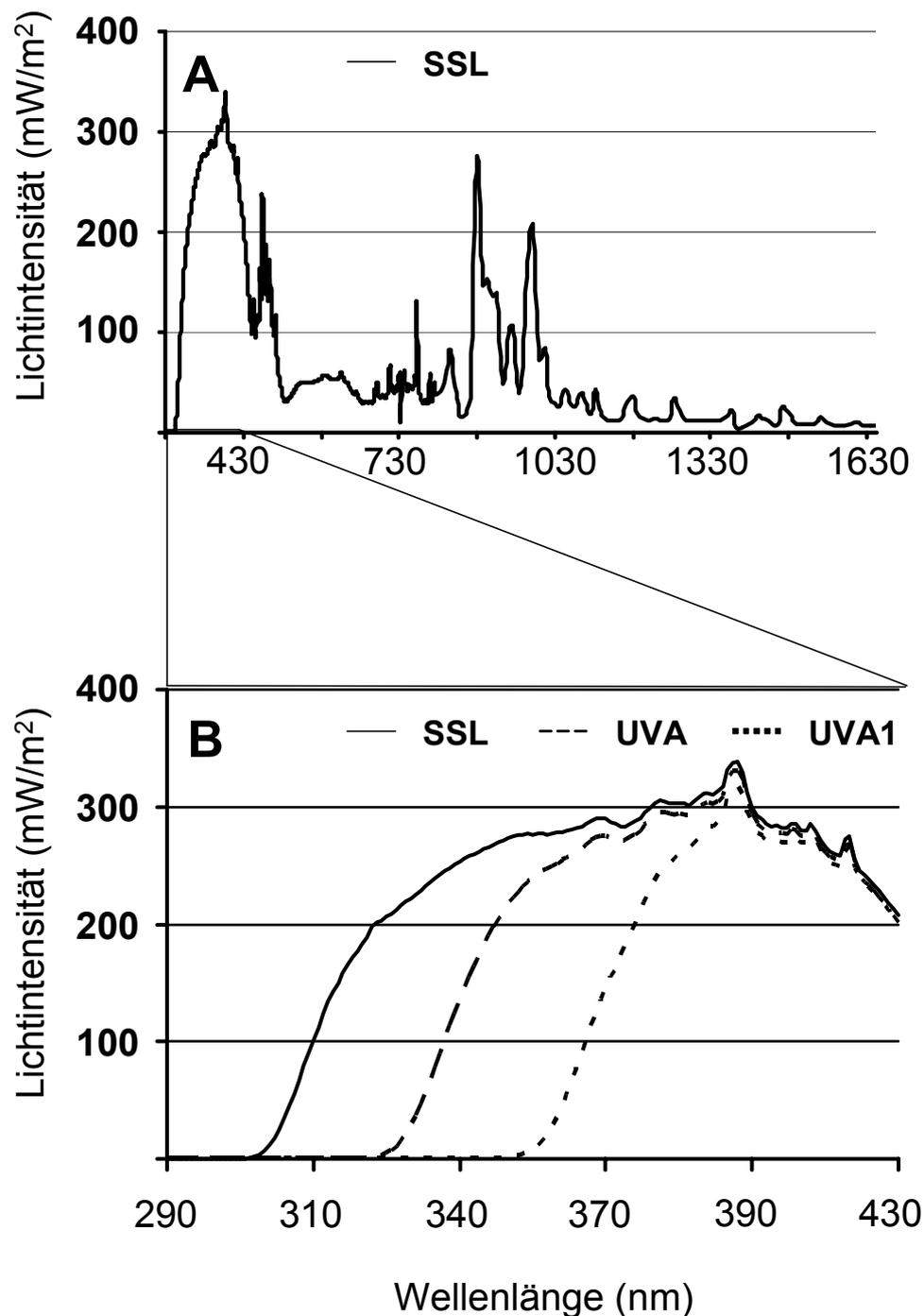


Abb. 3-3: Darstellung der Spektren unter Verwendung verschiedener UV-Filter im Sonnensimulator. Dargestellt ist das Spektrum von 290 nm bis 1630 nm des Sonnensimulators unter Verwendung des Attenuators (SSL) (A). Ein Ausschnitt zeigt den UV-Bereich zwischen 290 nm und 430 nm unter Verwendung des Attenuators (SSL), des BC-Blocks (UVA) und des WG360 (UVA1) (B). Die Spektren wurden freundlicherweise überlassen durch Herrn J. Batzer (Beiersdorf AG, Hamburg).

3.2.1 Wellenlängenabhängigkeit der COX-2 Expression

Um die Abhängigkeit der COX-2 Expression von dem UV-Wellenlängenbereich näher zu untersuchen, wurden die UV-Expositionen unter Verwendung verschiedener UV-Filter mit dem Sonnensimulator durchgeführt (Spektren siehe Abbildung 3-3). Die Untersuchungen zur Expression der COX-2 im EpiDerm-Modell wurden sowohl auf der Ebene der COX-2 mRNA mittels Real-Time TaqMan-PCR als auch auf Proteinebene mittels Western-Blot durchgeführt. Die ausgewählten Bestrahlungsdosen für die Bestrahlung mit simuliertem Sonnenlicht (SSL) von 90 mJ/cm^2 UVB und 135 mJ/cm^2 UVB reflektieren ungefähr eine Exposition für 8 bzw. 12 Minuten am 31.05.2003 um die Mittagszeit in Sarigerme (Türkei) (B. Uhlmann, Beiersdorf AG, Hamburg, persönliche Mitteilung) und liegen damit im physiologisch relevanten Bereich. Die höchste UV-Dosis führte zu einer durch den MTT-Test bestimmten Vitalitätseinschränkung von maximal 20% zu einem Zeitpunkt von 48 Stunden nach UV-Exposition (Daten nicht gezeigt). Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der COX-2 mRNA-Spiegel nach der Bestrahlung mit SSL (Abbildung 3-4 (A)), so stellt man einen starken Anstieg der COX-2 Transkripte 4 Stunden nach Bestrahlung fest. Bereits zwei Stunden später nimmt das Niveau der COX-2 mRNA deutlich ab und schwankt in den folgenden 42 Stunden im Mittel zwischen dem Kontrollniveau und einer zweifachen Induktion. Ein ähnlicher Verlauf zeigt sich nach der Bestrahlung mit den UVA-Dosen, wie sie in den vorangegangenen SSL-Bestrahlungen enthalten waren (Abbildung 3-4 (B)). Die COX-2 mRNA-Spiegel sind im Vergleich zu denen, wie sie nach SSL-Exposition beobachtet wurden, wesentlich moderater. Das Maximum ist ebenfalls nach 4 Stunden erreicht, wobei es im Mittel gerade zur Verdoppelung der relativen COX-2 mRNA-Menge kommt. Ein weiterer Anstieg ist bei der höheren Bestrahlungsdosis nach 48 Stunden zu verzeichnen. Die in den SSL und UVA Bestrahlungen enthaltenen UVA1 Dosen alleine induzieren ein COX-2 mRNA-Niveau, das sehr nahe am Kontrollniveau liegt und es sind maximale Induktionen zu verzeichnen, die im Mittel 150% erreichen (Abbildung 3-4 (C)). Betrachtet man die aus diesen COX-2 mRNA-Spiegeln resultierenden COX-2 Proteinspiegel, so stellt man einerseits fest, dass das Translationsprodukt über einen längeren Zeitraum als die COX-2 mRNA stabil vorliegt und andererseits, was den zeitlichen Verlauf betrifft, stark mit den mRNA-Spiegeln korreliert (Abbildung 3-5). Auf Proteinebene zeigt sich zudem eine starke Abhängigkeit der COX-2 Expression von der verwendeten UV-Dosis. Bereits 4-6 Stunden nach der SSL-Bestrahlung zeigt die COX-2 Expression auf Proteinebene mit 5-6fachen (135 mJ/cm^2 UVB) und 3-4fachen (90 mJ/cm^2 UVB) Induktionen ihr Maximum und sinkt dann kontinuierlich in

den folgenden 18 Stunden auf das Kontrollniveau ab (Abbildung 3-5 (A)). Doch nach weiteren 24 Stunden ist eine kleine Induktion der COX-2 Expression auf Proteinebene zu verzeichnen. Im Gegensatz zur mRNA-Ebene leistet auf Proteinebene die UVA-Bestrahlung im Vergleich zur SSL-Bestrahlung einen höheren Beitrag an dessen Expressionsniveau und führt ebenfalls 4-6 Stunden nach UVA-Exposition zu Expressionsmaxima, die bei einer 3-4fachen ($2.97 \pm 0.5 \text{ J/cm}^2 \text{ UVA}$) bzw. 2-3fachen ($1.98 \pm 0.33 \text{ J/cm}^2 \text{ UVA}$) Induktion liegen (Abbildung 3-5 (B)). Auch hier ist in den folgenden 42 Stunden ein kontinuierlicher Rückgang der COX-2 Expression zu verzeichnen. Wie auch bereits auf der mRNA-Ebene beobachtet, führen die im SSL- und UVA-Licht enthaltenen UVA1 Dosen auch auf der Proteinebene zu COX-2 Expressionen, die nahe am Kontrollniveau liegen und im Maximum knapp eine Verdoppelung zeigen (Abbildung 3-5 (C)).

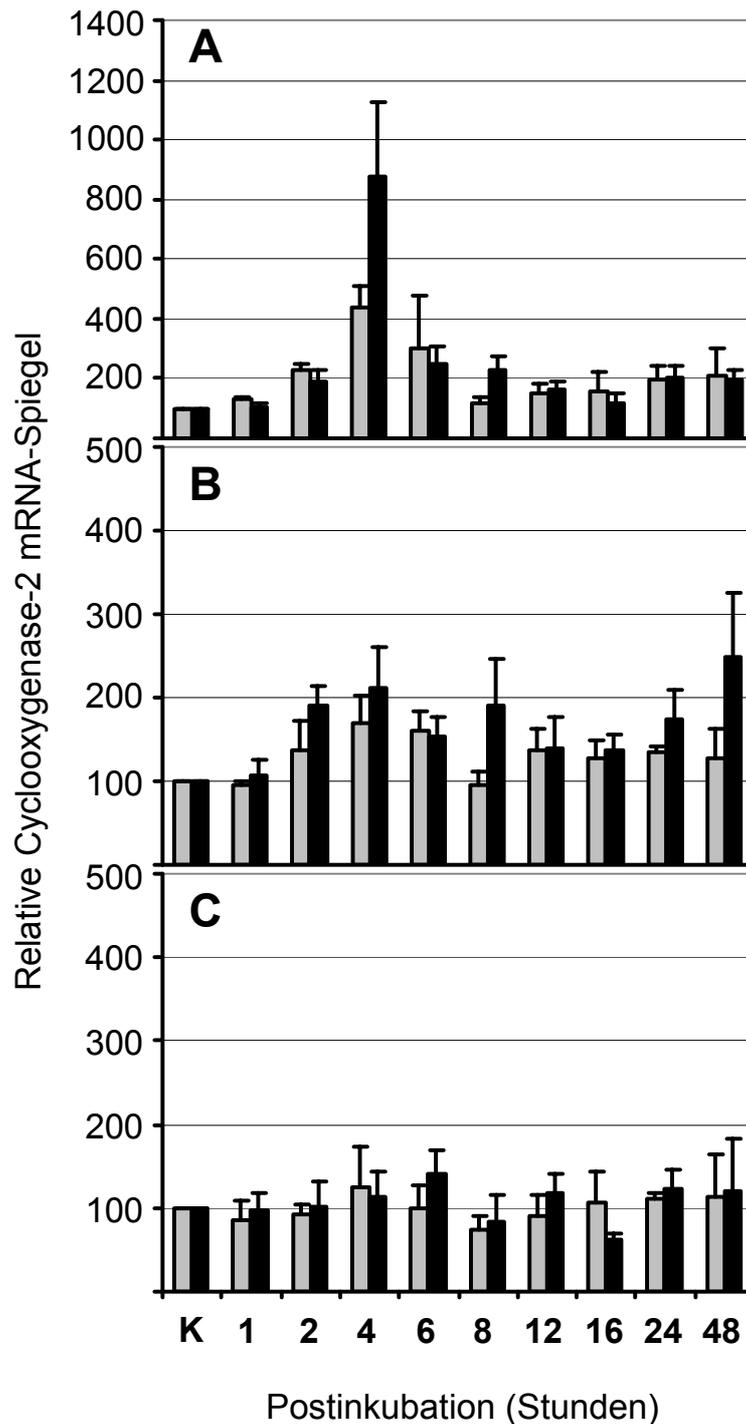


Abb. 3-4: COX-2 mRNA-Spiegel nach UV-Stimulation. Dargestellt sind die auf 18S rRNA relativierten und auf die unbestrahlten Kontrollen (K) normierten COX-2 mRNA-Spiegel, wie sie mittels Real-Time TaqMan-PCR zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit SSL (A) und den darin enthaltenen UVA- (B) bzw. UVA1-Dosen (C) ermittelt wurden. Die grauen Balken zeigen die mRNA-Spiegel im EpiDerm-Modell jeweils nach Bestrahlung mit der geringeren UV-Dosis (90 mJ/cm² UVB (A), 1.98 ± 0.33 J/cm² UVA (B) bzw. der darin enthaltenen Dosis UVA1 (C)) an, während die mRNA-Spiegel nach Bestrahlung mit den höheren UV-Dosen (135 mJ/cm² UVB (A), 2.97 ± 0.5 J/cm² UVA (B) bzw. der darin enthaltenen Dosis UVA1 (C)) mit schwarzen Balken gekennzeichnet sind. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei bis vier, voneinander unabhängigen Versuchen.

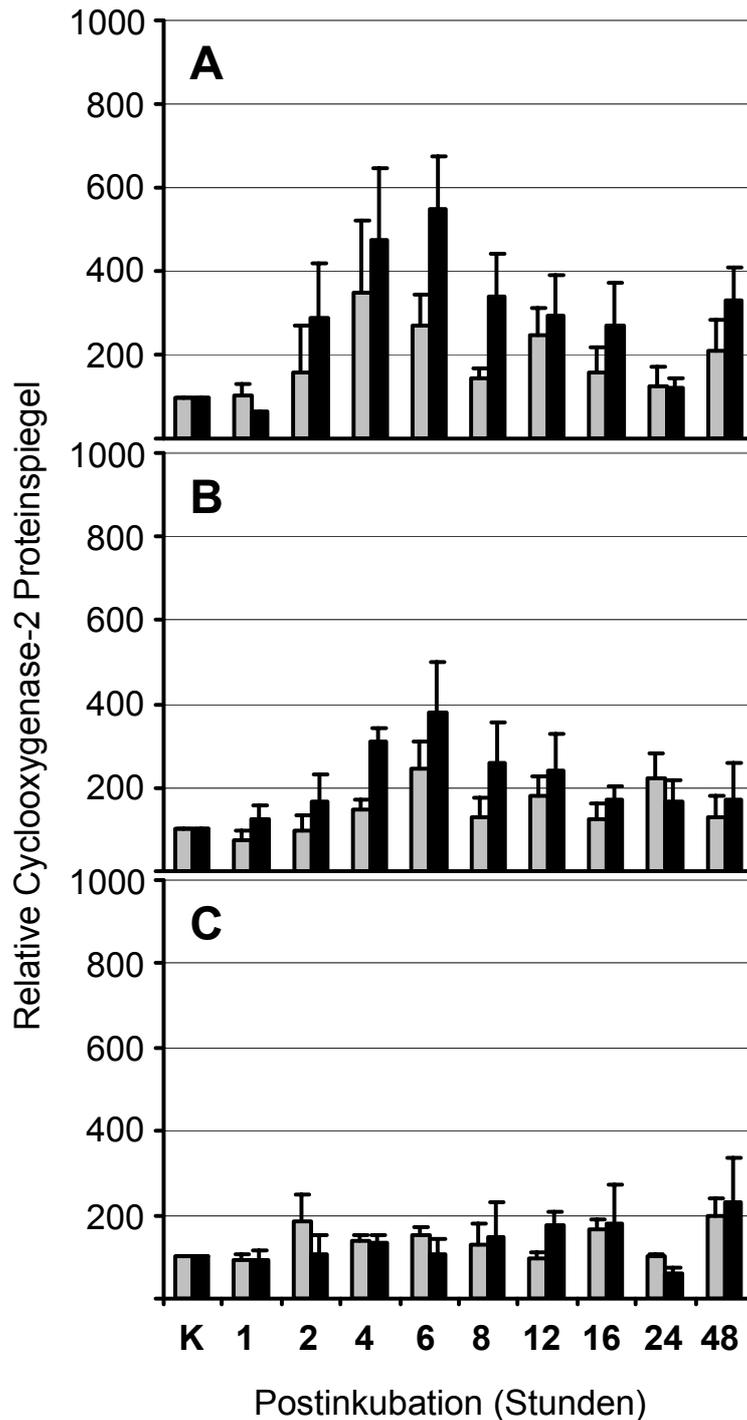


Abb. 3-5: COX-2 Proteinspiegel nach UV-Stimulation. Dargestellt sind die auf GAPDH relativierten und auf die unbestrahlten Kontrollen (K) normierten COX-2 Proteinspiegel, wie sie mittels densitometrischer Auswertung der Western-Blots zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit SSL (A) und den darin enthaltenen UVA- (B) bzw. UVA1-Dosen (C) ermittelt wurden. Die grauen Balken zeigen die COX-2 Proteinniveaus im EpiDerm-Modell jeweils nach Bestrahlung mit der geringeren UV-Dosis (90 mJ/cm^2 UVB (A), $1.98 \pm 0.33 \text{ J/cm}^2$ UVA (B) bzw. der darin enthaltenen Dosis UVA1 (C)) an, während die COX-2 Proteinspiegel nach Bestrahlung mit den höheren UV-Dosen (135 mJ/cm^2 UVB (A), $2.97 \pm 0.5 \text{ J/cm}^2$ UVA (B) bzw. der darin enthaltenen Dosis UVA1 (C)) mit schwarzen Balken gekennzeichnet sind. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei bis vier, voneinander unabhängigen Versuchen.

3.2.2 Wellenlängenabhängigkeit der PGE₂-Synthese

Die Hauptaufgabe der Cyclooxygenasen liegt in der Bereitstellung des Prostaglandin H₂, das wiederum das Substrat der in Abhängigkeit vom Zelltyp exprimierten Prostaglandin- und Thromboxan-Synthasen ist. Mittels eines kommerziell erhältlichen Prostaglandin E₂-ELISA wurden die Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Titer im Zellkulturmedium der EpiDerm-Modelle nach UV-Exposition bestimmt (Tabelle 3-1).

Tab. 3-1: Prostaglandin E₂-Titer im Zellkulturmedium nach UV-Exposition. Dargestellt sind die auf die unbestrahlten Kontrollen relativierten PGE₂-Titer im Zellkulturmedium der EpiDerm-Modelle wie sie nach Bestrahlung mit der jeweils höchst verwendeten UV-Dosis (135 mJ/cm² UVB (SSL) sowie der darin enthaltenen UVA- und UVA1-Dosis) erreicht wurden. Die angegebenen Werte spiegeln die Mittelwerte ± SEM dreier, voneinander unabhängiger Versuche wider. *) Die Zeit ist in Stunden nach Bestrahlungsende dargestellt. In den Kontrollen wurde zum Zeitpunkt 1 Stunde nach Scheinbehandlung eine gemittelte PGE₂-Konzentration von 7.200 pg/ml Medium gemessen.

Zeit (Stunden) ^{*)}	UV-Qualität		
	SSL	UVA	UVA1
Kontrolle	1.0	1.0	1.0
2	1.5 ± 0.4	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.4
8	1.8 ± 0.5	1.1 ± 0.2	1.0 ± 0.1
16	2.3 ± 0.5	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.2
24	3.2 ± 0.9	1.8 ± 0.5	1.2 ± 0.2

3.3 Aktivierung von Signalwegen durch UV im EpiDerm-Modell

Das UV-Licht stellte sich hinsichtlich der epidermalen Entzündungsreaktion als ein wirksames Stimulans heraus. Weitere Versuche am EpiDerm-Modell sollten klären, welche Signalwege durch das UV-Licht in diesem Zellsystem aktiviert werden und ob es hinsichtlich der Aktivierbarkeit ausgewählter Signalwege Unterschiede zwischen den verschiedenen UV-Qualitäten (SSL, UVA und UVA1) gibt.

3.3.1 Aktivierung des p38^{MAPK}-Signalweges

Das simulierte Sonnenlicht (SSL) sowie auch das darin enthaltene UVA-Licht stellten sich als starke Aktivatoren der p38^{MAPK} im EpiDerm-Modell heraus (Abbildung 3-6). Die Aktivierungen haben in einem Zeitraum von einer Minute bis 15 Minuten nach der Bestrahlung ihr Maximum, wobei die Maxima, die durch die unterschiedlichen UV-Qualitäten erreicht wurden, vergleichbar sind. Die SSL-induzierte p38^{MAPK}-Aktivierung wird nur sehr langsam wieder herunterreguliert, wohingegen die p38^{MAPK}-Aktivierung durch UVA bzw. UVA1 bereits nach 30 Minuten fast wieder das Kontrollniveau erreicht (Abbildung 3-6 (A)). Im Allgemeinen findet sich eine gegenüber den Kontrollen 3fach bis 4fach erhöhte Phosphorylierung von p38.

3.3.2 Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2

Der Signalweg, der über die MAP-Kinasen ERK1/2 läuft, wird im EpiDerm-Modell durch alle drei verwendeten UV-Qualitäten (SSL, UVA und UVA1) aktiviert (Abbildung 3-7). Auch hier ist, ähnlich wie bei der p38^{MAPK}, die Aktivierung innerhalb des Zeitraumes von einer Minute bis 15 Minuten nach Bestrahlungsende am größten. Interessanterweise sind die Aktivierungen der ERK1/2 durch UVA und UVA1 gleichermaßen ausgeprägt und zudem im Maximum deutlich stärker als die beobachtete ERK1/2-Aktivierung nach Bestrahlung mit SSL (Abbildung 3-7 (A)). Im Allgemeinen findet sich eine gegenüber den Kontrollen 4fach bis 7fach erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2.

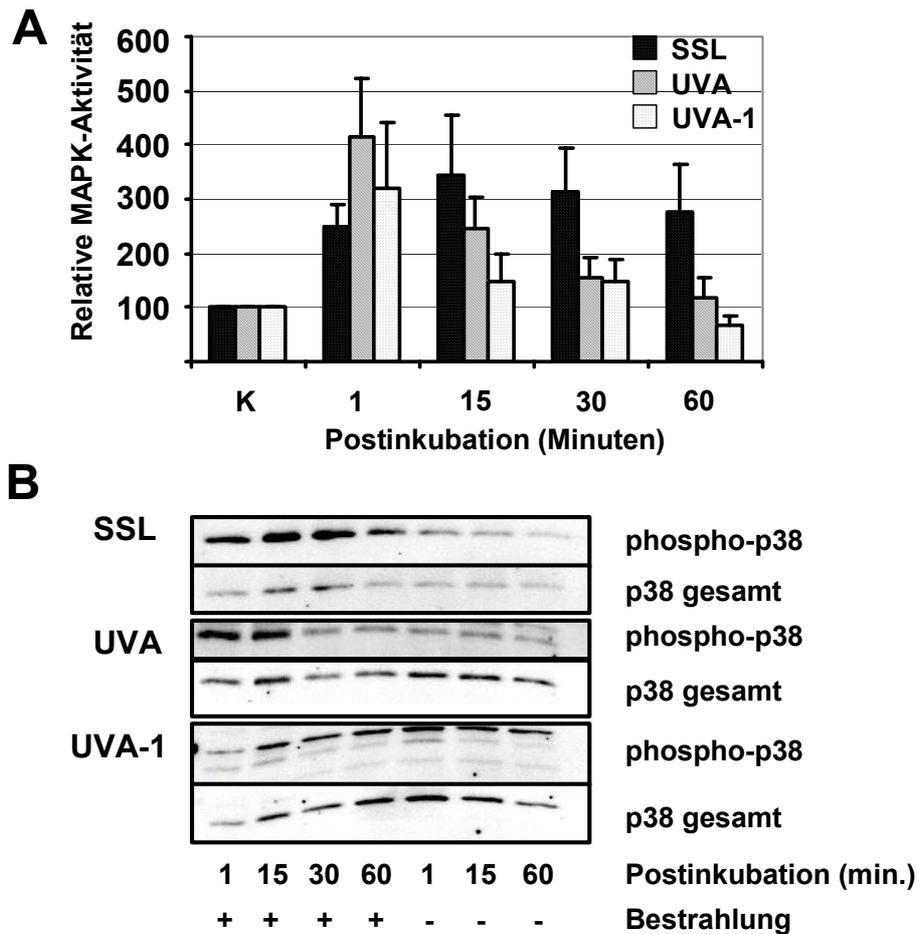


Abb. 3-6: Aktivierung der p38^{MAPK} durch UV. Die EpiDerm-Modelle wurden mit SSL, UVA und UVA1 bestrahlt, wobei die verwendeten UV-Dosen bei 135 mJ/cm² UVB (SSL) bzw. der entsprechend darin enthaltenen UVA- und UVA1-Dosis lagen. In einem Zeitraum von 1, 15, 30 und 60 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Modelle lysiert und im Western-Blot auf die phosphorylierte Form der p38^{MAPK} (Thr180/Tyr182) hin untersucht. Als Kontrolle dienten unbestrahlte EpiDerm-Modelle, die parallel zur Bestrahlungszeit im Dunkeln außerhalb des Inkubators gehalten wurden. Als Referenz ist jeweils der entsprechende Western-Blot dargestellt, der die Gesamtmenge der p38^{MAPK} detektiert. Gezeigt ist für jede Bestrahlungsart ein repräsentativer Western-Blot dreier, voneinander unabhängiger Versuche (**B**) sowie die Mittelwerte ± SEM, wie sie sich aus der densitometrischen Auswertung der drei voneinander unabhängigen Versuche ergeben (**A**). Bei der densitometrischen Auswertung wurde der Anteil phosphorylierter p38^{MAPK} quantifiziert und auf die p38^{MAPK}-Gesamtmenge relativiert. Die so erhaltenen relativierten Induktionen wurden auf die jeweils unbestrahlten Kontrollen (K) des gleichen Zeitwertes normiert.

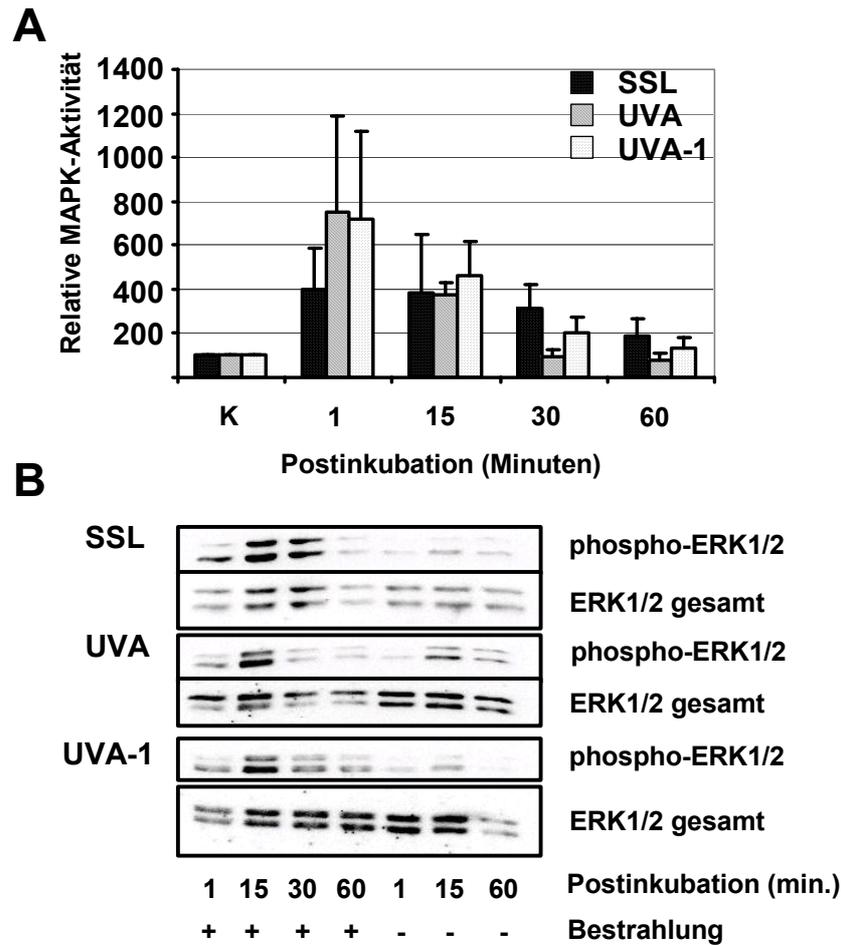


Abb. 3-7: Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch UV. Die EpiDerm-Modelle wurden mit SSL, UVA und UVA1 bestrahlt, wobei die verwendeten UV-Dosen bei 135 mJ/cm^2 UVB (SSL) bzw. der entsprechend darin enthaltenen UVA- und UVA1-Dosis lagen. In einem Zeitraum von 1, 15, 30 und 60 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Modelle lysiert und im Western-Blot auf die phosphorylierte Form der ERK1/2 (Thr202/Tyr204) hin untersucht. Als Kontrolle dienten unbestrahlte EpiDerm-Modelle, die parallel zur Bestrahlungszeit im Dunkeln außerhalb des Inkubators gehalten wurden. Als Referenz ist jeweils der entsprechende Western-Blot dargestellt, der die Gesamtmenge der ERK1/2 detektiert. Gezeigt ist für jede Bestrahlungsart ein repräsentativer Western-Blot dreier, voneinander unabhängiger Versuche (**B**) sowie die Mittelwerte \pm SEM, wie sie sich aus der densitometrischen Auswertung der drei voneinander unabhängigen Versuche ergeben (**A**). Bei der densitometrischen Auswertung wurde der Anteil phosphorylierter ERK1/2 quantifiziert und auf die ERK1/2-Gesamtmenge relativiert. Die so erhaltenen relativierten Induktionen wurden auf die jeweils unbestrahlten Kontrollen (K) des gleichen Zeitwertes normiert.

3.3.3 Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK)

Die Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) im EpiDerm-Modell wurde, wie im Kapitel 2.2.2.7 angegeben, im Immunpräzipitations-Kinase-Test untersucht. Dabei werden die JNK aus dem Zelllysate präzipitiert, und in einer nachfolgenden Kinase-Reaktion ist es nur den aktivierten JNK möglich, gebundenes c-Jun zu phosphorylieren. Die Menge des phosphorylierten c-Jun wurde im Western-Blot bestimmt und densitometrisch quantifiziert.

Das simulierte Sonnenlicht führt zu einer sehr starken Aktivierung der JNK, wobei in einem Zeitraum von 15 Minuten bis 30 Minuten im Mittel eine 20fache Aktivierung festzustellen ist. Das im SSL enthaltene UVA-Licht hat daran einen Anteil von ca. 10%, denn nach der UVA-Bestrahlung ist in dem genannten Zeitraum nach Bestrahlung im Mittel eine 2-3fache Aktivierung zu finden. UVA1 führt zu einer Verdoppelung der JNK-Aktivität (Abbildung 3-8).

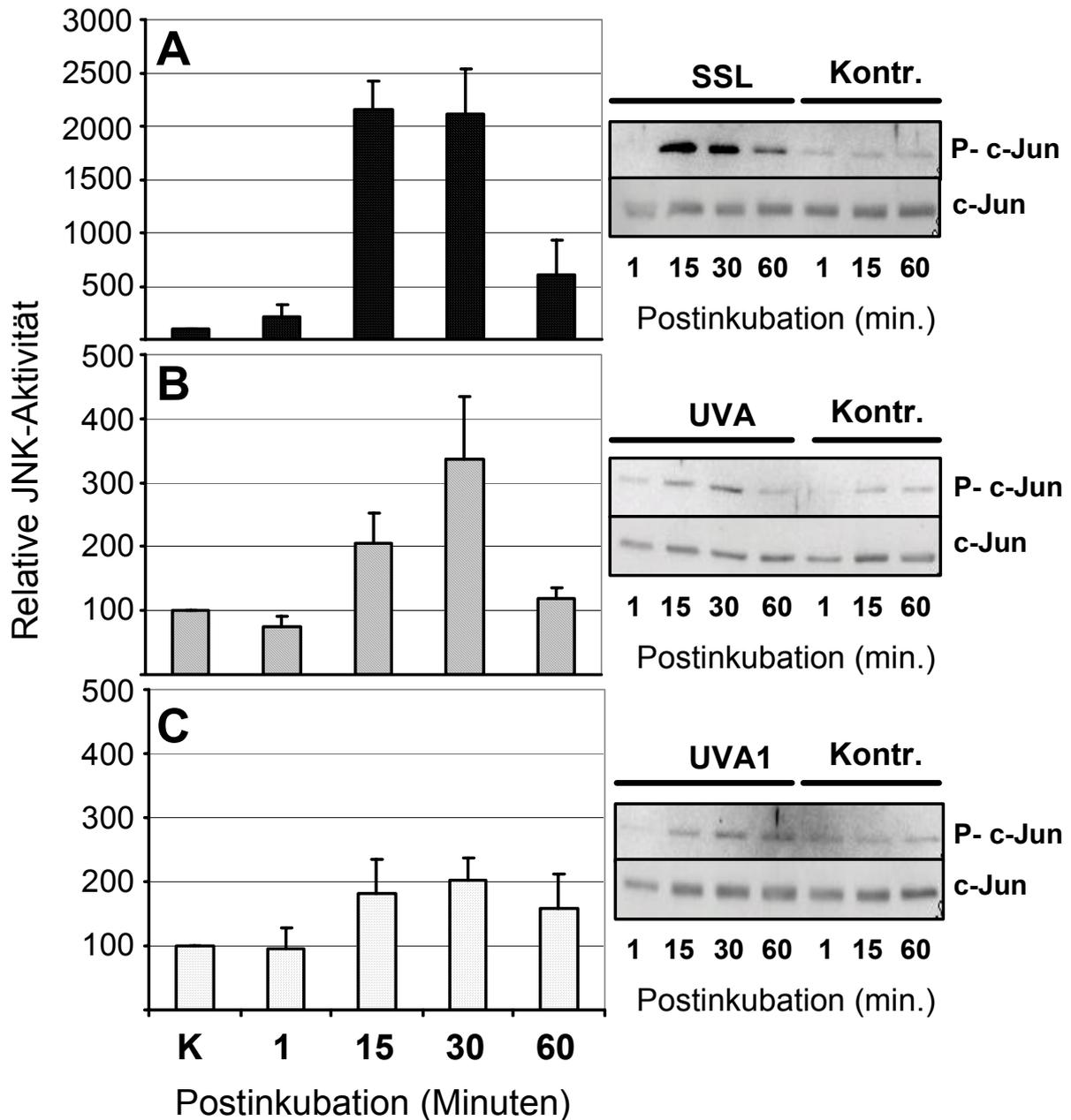


Abb. 3-8: Aktivierung von c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) durch UV. Die EpiDerm-Modelle wurden mit SSL (A), UVA (B) und UVA1 (C) bestrahlt, wobei die verwendeten UV-Dosen bei 135 mJ/cm^2 UVB (SSL) bzw. der entsprechend darin enthaltenen UVA- und UVA1-Dosis lagen. In einem Zeitraum von 1, 15, 30 und 60 Minuten nach der Bestrahlung wurden die Modelle lysiert und mittels Immunpräzipitations-Kinase-Test die relative JNK-Aktivität bestimmt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte EpiDerm-Modelle, die parallel zur Bestrahlungszeit im Dunkeln außerhalb des Inkubators gehalten wurden. Dargestellt sind zum einen repräsentative Western-Blots und zum anderen die Mittelwerte \pm SEM der densitometrischen Auswertung dreier, voneinander unabhängiger Versuche. Der densitometrisch quantifizierte Anteil phosphorylierten c-Jun (P-c-Jun) wurde auf die Gesamtmenge des c-Jun relativiert. Dargestellt sind die Induktionen, die sich aus der Normierung der relativierten Induktionen auf die jeweils unbestrahlten Kontrollen (K) ergeben.

3.4 Die Rolle der MAP-Kinasen in der Induktion der Cyclooxygenase-2

Einerseits konnten die wirksamen Wellenlängenbereiche, die zur Induktion der Cyclooxygenase-2 führen, näher charakterisiert werden. Andererseits konnten auch Unterschiede der betrachteten UV-Qualitäten hinsichtlich ihres Potentials, Signaltransduktionswege zu aktivieren, identifiziert werden. Ein weiterer Schritt besteht in der Aufklärung der Signaltransduktionswege, die die UV-induzierte COX-2 Expression vermitteln. Da UVA1 einen vernachlässigbaren Anteil an der durch SSL oder UVA induzierten COX-2 Expression hat, wurde diese UV-Qualität nicht weiter betrachtet.

3.4.1 Induktion der Cyclooxygenase-2 durch simuliertes Sonnenlicht

Das simulierte Sonnenlicht ist in der Lage, sowohl die p38^{MAPK} als auch die ERK1/2 und JNK stark zu aktivieren. Es sollte der Signalweg identifiziert werden, der die SSL-induzierte COX-2 Expression vermittelt. Dazu wurden die EpiDerm-Modelle zunächst mit unterschiedlichen Inhibitoren der angesprochenen Signalwege präinkubiert und schließlich 6 Stunden nach der Bestrahlung mit SSL auf die COX-2 Expression auf Proteinebene hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der MEK1/2-Inhibitor U0126, der die Aktivierung der MAPK ERK1/2 verhindert und damit diesen Signalweg unterbricht, keinen Effekt auf die SSL-vermittelte COX-2 Expression hat. Dahingegen konnten sowohl der p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 als auch die beiden eingesetzten JNK Inhibitoren „JNK-Inhibitor I“ und SP600125 die COX-2 Expression infolge der Bestrahlung mit SSL vermindern, wenn auch nicht gänzlich auf das Kontrollniveau reduzieren (Tabelle 3-2).

Tab. 3-2: Wirkung eingesetzter Inhibitoren auf die SSL- und UVA-induzierte COX-2 Expression. Sowohl die in DMSO gelösten Inhibitoren SB203580 (10 μ M), U0126 (10 μ M) und SP600125 (4 μ M) als auch der im MCDB 153-Medium gelöste „JNK Inhibitor I“ (42 μ M) wurden dem Medium 1.5 Stunden vor der Bestrahlung zugesetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit 135 mJ/cm^2 UVB (SSL) bzw. $2.97 \pm 0.5 \text{ J}/\text{cm}^2$ UVA (UVA). Die EpiDerm-Modelle wurden 6 Stunden nach der UV-Exposition lysiert und im Western-Blot auf die COX-2 Expression hin untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der auf GAPDH relativierten und auf die jeweilige unbestrahlte Lösungsmittelkontrolle normierten COX-2 Proteinspiegel, wie sie sich durch die densitometrische Auswertungen von drei (SB203580 (UVA), U0126 (UVA) sowie JNK Inhibitor I (SSL und UVA)) und vier (SB203580 (SSL), U0126 (SSL)), voneinander unabhängiger Versuche ergeben. Im Falle des SP600125 ist der Mittelwert zweier, voneinander unabhängiger Versuche dargestellt.

Relative COX-2 Proteinspiegel nach Bestrahlung mit		
Behandlung	<i>SSL</i>	<i>UVA</i>
Kontrolle (DMSO)	1.0	1.0
UV (DMSO)	2.8 ± 0.3	1.6 ± 0.2
+ SB203580	1.4 ± 0.2	1.7 ± 0.1
+ U0126	3.0 ± 1.1	2.0 ± 0.5
+ SP600125	1.1	3.3
Kontrolle (MCDB 153)	1.0	1.0
UV (MCDB 153)	6.8 ± 1.3	3.4 ± 0.6
+ JNK Inhibitor I	2.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3

3.4.2 Induktion der Cyclooxygenase-2 durch UVA-Licht

Ähnlich dem SSL, ist UVA in der Lage, die p38^{MAPK} , ERK1/2 und die c-Jun N-terminalen Kinasen zu aktivieren. Der Einsatz von Inhibitoren, die diese untersuchten Signalwege unterbrechen, identifizierte ausschließlich den Weg über die c-Jun-N-terminalen Kinasen für die UVA-induzierte COX-2 Expression als relevant (Tabelle 3-2). „Der JNK-Inhibitor I“ ist dabei in der Lage, die UVA-vermittelte COX-2 Expression fast nahezu auf das Kontrollniveau zu reduzieren. Die Inhibitoren U0126 und das SB203580 zeigten hinsichtlich der UVA-induzierten COX-2 Expression keinen Effekt. Im Vergleich zu den Signaltransduktionswegen, die durch die Bestrahlung mit SSL zur COX-2-Induktion führen, konnte bei der UVA-induzierten COX-2 Expression nur ein Signalweg als relevant identifiziert werden.

3.5 UV-Licht, reaktive Sauerstoffspezies und die Schädigung der Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

3.5.1 UV-Licht und reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Da reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine ganze Reihe von Reaktionen in Zellen auslösen, sollte der Einfluss des UV-Lichtes auf die Bildung von Wasserstoffperoxid im Zellkulturmedium untersucht werden. Dabei wurden PBS, unterschiedliche Zellkulturmedien sowie einige in PBS gelöste Medienkomponenten in einem zellfreien System unter Verwendung des UVA-700 UVA Licht (30 J/cm^2 UVA) ausgesetzt und die gebildete Menge Wasserstoffperoxids zum einen mittels des fluorimetrischen Scopoletin-Tests und zum anderen unter Verwendung einer Sauerstoffelektrode bestimmt. Es ließen sich Wasserstoffperoxidkonzentrationen nachweisen, die in Abhängigkeit vom Medium zwischen $58 \mu\text{M}$ und $375 \mu\text{M}$ lagen (Tabelle 3-3 (A)). Medien, die zusätzlich zum Bicarbonat als Puffersubstanz HEPES enthielten (DMEM (C) und DMEM (D)), zeigten gegenüber den reinen Bicarbonat-gepufferten Medien (DMEM (A) und DMEM (B)) eine deutlich höhere Tendenz, unter UVA-Bestrahlung Wasserstoffperoxid zu generieren. In der Tat führte die Bestrahlung von in PBS gelöstem HEPES in Kombination mit Riboflavin zu Wasserstoffperoxidkonzentrationen, die mit $476 \mu\text{M}$ ungefähr denen entsprechen, wie sie nach Bestrahlung eines HEPES-gepufferten Mediums (DMEM (D)) zu finden sind. Die in PBS gelösten Medienkomponenten Riboflavin und Tryptophan generieren hingegen in Kombination unter UVA-Bestrahlung $55 \mu\text{M}$ Wasserstoffperoxid, eine Konzentration, wie sie durch die Bestrahlung der reinen Bicarbonat-gepufferten Medien (DMEM (A) und DMEM (B)) zu finden ist (Tabelle 3-3 (B)).

Die UV-Bestrahlung des Zellkulturmediums für die EpiDerm-Modelle (EPI-100-MM) sowohl mit simuliertem Sonnenlicht als auch im Vergleich dazu nur mit der darin enthaltenen UVA-Dosis zeigte, dass diese Entstehung von Wasserstoffperoxid durch UV alleine auf die Wirkung des UVA zurückzuführen ist. Der beim simulierten Sonnenlicht zusätzlich vorhandene UVB-Anteil führte zu keiner Steigerung der Wasserstoffperoxidkonzentration im Medium unmittelbar nach Bestrahlung (Tabelle 3-4).

Um den Einfluss des durch die UVA-Bestrahlung generierten Wasserstoffperoxids auf einige Signaltransduktionswege zu untersuchen, wurden humane dermale Fibroblasten (HDF) im PBS, in unterschiedlichen Zellkulturmedien sowie in PBS gelösten Medienkomponenten unter Verwendung des UVA-700 bestrahlt (30 J/cm^2 UVA). Die Untersuchungen zur Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) sowie der $p38^{\text{MAPK}}$ erfolgten im Western-Blot (Abbildung 3-9). Es zeigte sich eine deutliche Beziehung zwischen der Aktivierung der untersuchten Signalwege und der entstehenden Wasserstoffperoxidkonzentration während der Bestrahlung. Außerdem zeigte sich, dass das in einigen Medien enthaltene fetale Kälberserum (FKS) zwar *per se* zur Aktivierung der Proteinkinase B führt, aber hinsichtlich beider untersuchter Signalwege die UVA-vermittelte Aktivierung gegenüber der unbestrahlten Kontrolle vermindert, wie es auch die Bildung von Wasserstoffperoxid im Medium abpuffert. Ein dritter untersuchter Signalweg über die MAP-Kinasen ERK1/2 zeigte nur eine leichte Tendenz einer Aktivierung in den unterschiedlichen Zellkulturmedien im Vergleich zur Bestrahlung in reinem PBS (Abbildung nicht gezeigt).

Neben den beobachteten Unterschieden hinsichtlich der Aktivierung von Signalwegen in humanen dermalen Fibroblasten, korrelierten auch die Ergebnisse der Vitalitätsuntersuchungen weitestgehend mit der Entstehung von Wasserstoffperoxid im verwendeten Zellkulturmedium durch die UV-Exposition (Tabelle 3-5). Zu beachten ist hier, dass in den verwendeten Medien (DMEM (C⁺) und DMEM (D⁺)) der FKS Gehalt nur bei 0.2% liegt und diese damit hinsichtlich des Potentials, Wasserstoffperoxid während der UV-Exposition zu generieren, eher mit den FKS-freien Medien (DMEM (C) und DMEM (D)) vergleichbar sind.

3. Ergebnisse

Tab. 3-3: Durch UVA hervorgerufene Erzeugung von Wasserstoffperoxid in unterschiedlichen Zellkulturmedien sowie in PBS mit gelösten Medienkomponenten. Es wurden unterschiedliche, handelsübliche Zellkulturmedien (A) sowie Ansätze von in PBS gelösten Medienkomponenten (B) mit 30 J/cm² UVA bestrahlt und gleich im Anschluss die Wasserstoffperoxidkonzentration mittels des fluorimetrischen Scopoletin-Tests bestimmt.

*) Die Hersteller der DMEM Medien sind im Kapitel 2.1 aufgeführt. HEPES: *N*-(2-hydroxyethylpiperazin)-*N'*-2-ethansulfonsäure, FKS: Fetales Kälberserum (10%), Gln: Glutamax I (2 mM), Pen/Strep: Penicillin (50 U/ml) und Streptomycin (50 µg/ml).

***) In PBS gelöstes Riboflavin (1 µM), HEPES (25 mM) und Tryptophan (78 µM) entsprechen den Konzentrationen, wie sie auch in den verwendeten Zellkulturmedien vorliegen.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier, voneinander unabhängiger Versuche.

A

Medium ^{*)}	Zusatzstoffe					Wasserstoffperoxid (µM)
	<i>Phenolrot</i>	<i>HEPES</i>	<i>FKS</i>	<i>Gln</i>	<i>Pen/Strep</i>	
PBS	-	-	-	-	-	3 ± 2
DMEM (A)	-	-	-	-	-	116 ± 10
DMEM (B)	+	-	-	-	-	66 ± 4
DMEM (B ⁺)	+	-	+	+	+	58 ± 6
DMEM (C)	+	+	-	+	+	151 ± 14
DMEM (C ⁺)	+	+	+	+	+	99 ± 16
DMEM (D)	-	+	-	-	-	375 ± 16
DMEM (D ⁺)	-	+	+	+	+	87 ± 2

B

Lösung ^{**)}	Medienkomponenten			Wasserstoffperoxid (µM)
	<i>Riboflavin</i>	<i>HEPES</i>	<i>Tryptophan</i>	
PBS	-	-	-	3 ± 2
(1)	+	-	-	4 ± 4
(2)	-	+	-	4 ± 4
(3)	-	-	+	3 ± 3
(4)	-	+	+	4 ± 4
(5)	+	-	+	55 ± 13
(6)	+	+	-	476 ± 54
(7)	+	+	+	461 ± 32

3. Ergebnisse

Tab. 3-4: Abhängigkeit der Bildung von Wasserstoffperoxid vom UV-Wellenlängenbereich. PBS und das EPI-100-MM-Medium wurden mit simuliertem Sonnenlicht (135 mJ/cm² UVB) oder nur mit der darin enthaltenen Dosis UVA (2.97 ± 0.5 J/cm² UVA) bestrahlt und unmittelbar nach Bestrahlungsende unter Verwendung des Scooletin-Tests auf Wasserstoffperoxid hin untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SD dreier, voneinander unabhängiger Versuche.

Medium	UV-Bestrahlung	
	SSL	UVA
	<i>Wasserstoffperoxid (μM)</i>	<i>Wasserstoffperoxid (μM)</i>
PBS	2 ± 1	1 ± 1
EPI-100-MM	19 ± 2	17 ± 1

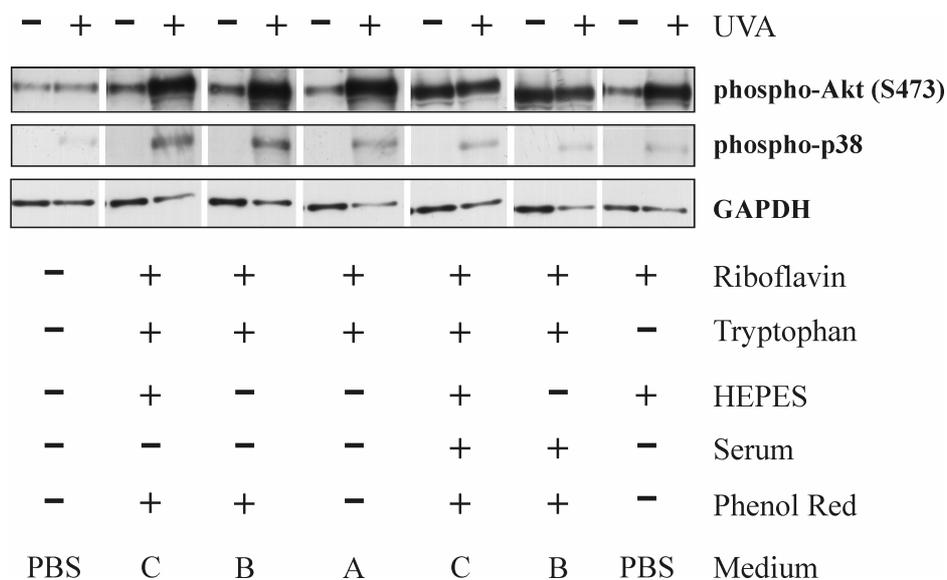


Abb. 3-9: Aktivierung der Proteinkinase B und der p38^{MAPK} in humanen dermalen Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung. Das Aussaatmedium (DMEM (B⁺)) wurde 72 Stunden nach der Aussaat der humanen dermalen Fibroblasten gegen frisches DMEM (B⁺) ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen einmal in vorgewärmtem PBS gewaschen und mit PBS sowie zweier in PBS gelöster Medienkomponenten (Riboflavin, 1 μM; HEPES, 25 mM) bzw. unterschiedlichen Zellkulturmedien versorgt. Gleich im Anschluss an diesen Mediumwechsel erfolgte die UVA-Bestrahlung (30 J/cm²), woraufhin eine Postinkubation von 30 Minuten im Inkubator folgte. Wurden die Zellen in PBS bestrahlt, so erfolgte direkt nach der Bestrahlung zur besseren Zellversorgung der Wechsel in DMEM (B). Die Zellen wurden schließlich lysiert und die Aktivierungen von Signaltransduktionswegen im Western-Blot untersucht. Die Hersteller der Medien sind im Kapitel 2.1 erwähnt. Dargestellt sind repräsentative Western-Blots zweier (DMEM (A)) und dreier, voneinander unabhängiger Versuche.

Tab. 3-5: Einfluss unterschiedlicher Zellkulturmedien auf die Vitalität humaner dermaler Fibroblasten nach UVA-Bestrahlung. Das Aussaatmedium (DMEM (C⁺)) wurde 72 Stunden nach der Aussaat gegen die Medien DMEM (C⁺) bzw. DMEM (D⁺) ausgetauscht. Die FKS Endkonzentration betrug in diesen Medien 0.2%. Nach weiteren 24 Stunden erfolgten die UVA-Bestrahlungen (Dermalight 2020) mit den angegebenen Dosen. Für die Bestrahlungen in PBS wurde das DMEM (C⁺) abgenommen, die Zellen zweimal in PBS gewaschen und dann in PBS bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das PBS wieder gegen das vorkonditionierte DMEM (C⁺) ersetzt. Nach einer Postinkubation von 24 Stunden wurde die Vitalität mittels Calcein-Test bestimmt. Die Calcein-Daten wurden auf die indirekte Zellzahl, die nach einer Kernfärbung mit Ethidium-Homodimer erhalten wurde, relativiert. Die auf diese Weise relativierten Calcein-Daten der bestrahlten Zellen wurden auf die relativierten Calcein-Daten der jeweiligen unbestrahlten Kontrollen normiert. Die Ergebnisse zeigen die Mittelwerte \pm SD dreier, voneinander unabhängiger Versuche.

Medium	UVA-Bestrahlung	
	10 J/cm ² UVA	20 J/cm ² UVA
	Vitalität (%)	Vitalität (%)
PBS	90 \pm 13	85 \pm 19
DMEM (C ⁺)	97 \pm 12	81 \pm 8
DMEM (D ⁺)	20 \pm 6	16 \pm 2

3.5.2 UV-Licht und die Schädigung der Desoxyribonukleinsäuren (DNA)

Es ist bekannt, dass das UV-Licht Mutationen auslösen kann. Dabei werden unterschiedliche Ursachen bezüglich der Mutagenität des UV-Lichtes diskutiert. So geht man davon aus, dass das UVB-Licht direkt durch seine Energie Mutationen auslöst, wobei präferentiell Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin-(4-6)-Pyrimidon Photoaddukte entstehen. Das UVA-Licht hingegen führt ebenfalls zur Ausbildung von Mutationen, wobei diese sekundär über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies entstehen, die zu Modifikationen der DNA führen. In dieser Arbeit wurde die Ausbildung von CPD im EpiDerm-Modell in Abhängigkeit der UV-Qualität untersucht. Die CPD wurden unter Verwendung eines Antikörpers in Kryostatschnitten detektiert, wobei die Bestrahlungen jeweils mit der höchst verwendeten UV-Dosis (135 mJ/cm² UVB (SSL) bzw. der darin enthaltenen UVA- und

UVA1-Dosis) durchgeführt wurden. Es zeigte sich, dass das SSL sehr stark die Ausbildung der CPD induziert. Auf der anderen Seite führt das darin enthaltene UVA-Licht alleine zu keiner Bildung von CPD (Abbildung 3-10).

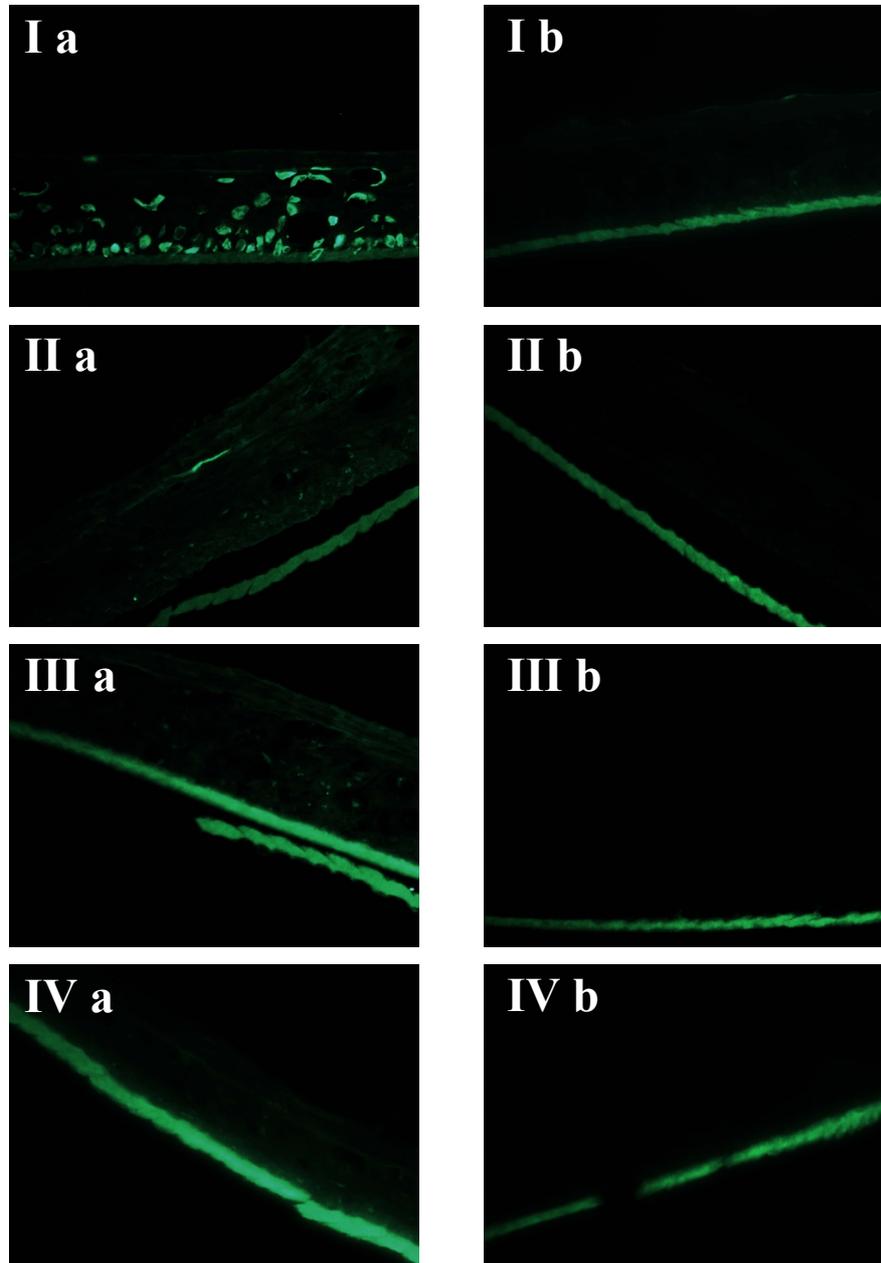


Abb. 3-10: Die Bildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) in Abhängigkeit von der UV-Qualität. Die EpiDerm-Modelle wurden mit 135 mJ/cm^2 UVB SSL (I) bzw. mit der darin enthaltenen UVA- (II) und UVA1-Dosis (III) bestrahlt. Als Kontrolle dienten unbestrahlte EpiDerm-Modelle (IV). Zu einem Zeitpunkt von 30 Minuten nach UV-Exposition wurden die CPD in $9 \mu\text{m}$ dicken Kryostatschnitten detektiert. Gezeigt sind repräsentative Immunfärbungen unter Verwendung des primären und sekundären Antikörpers (a) und zur Kontrolle unter alleiniger Verwendung des sekundären Antikörpers (b) dreier, voneinander unabhängiger Ergebnisse.

3.6 Die Rolle des oxidativen Stresses bei der durch UV-Licht induzierten COX-2 Expression

Inwieweit spielt der oxidative Stress bei der UV-vermittelten COX-2 Expression eine Rolle? Wie bereits im Kapitel 3.5.1 dargestellt wurde, ist das UV-Licht in der Lage, Wasserstoffperoxid und damit eine relativ stabile reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Zellkulturmedien zu generieren, aus der z.B. unter Anwesenheit von Eisen(II)ionen über die Fenton-Reaktion wiederum hochreaktive Hydroxylradikale entstehen können. Aus diesem Grunde sollte der Einfluss von Wasserstoffperoxid sowie möglicher Folgeprodukte (Lipidperoxidation) auf die Cyclooxygenase-2 Expression im EpiDerm-Modell näher untersucht werden.

3.6.1 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Expression der COX-2

Im Kapitel 3.5.1 wurde gezeigt, dass durch die Bestrahlung der EpiDerm-Modelle mit SSL (135 mJ/cm² UVB) oder mit dem ausschließlich darin enthaltenen UVA (2.97 ± 0.5J/cm² UVA) in dem Kulturmedium (EPI-100-MM) bis 19 µM Wasserstoffperoxid entstehen (Tabelle 3-4). Dies ist eine im Vergleich zu den Konzentrationen, wie sie durch eine 10fach höhere UVA-Bestrahlung in den anderen Zellkulturmedien bzw. in einigen in PBS gelösten Komponenten zu finden sind, eher geringe Konzentration. Die Zugabe von Wasserstoffperoxid in das Medium der EpiDerm-Modelle in einer bis zu 27fach höheren Konzentration (500 µM) führte 6 Stunden nach dessen Zugabe zu keiner nennenswert gesteigerten COX-2 Expression (Tabelle 3-6).

Tab. 3-6: COX-2 Expression nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid.

Es wurde dem Kulturmedium der EpiDerm-Modelle Wasserstoffperoxid unterschiedlicher Konzentrationen beigefügt, so dass die unten angegebenen Endkonzentrationen erreicht wurden. Nach einer Postinkubation von 6 Stunden wurden die Modelle lysiert und im Western-Blot auf die COX-2 Expression hin untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der auf GAPDH relativierten und auf die unbehandelte Kontrolle normierten COX-2 Proteinspiegel, wie sie sich durch die densitometrische Auswertung von drei (500 μ M) und vier (20-100 μ M), voneinander unabhängiger Versuche ergeben.

<i>Wasserstoffperoxid (μM)</i>	<i>COX-2 Proteinspiegel</i>
Kontrolle	1.0
20	1.0 \pm 0.2
50	0.9 \pm 0.2
100	0.8 \pm 0.2
500	1.3 \pm 0.3

3.6.2 4-Hydroxynonenal und COX-2 Expression

4-Hydroxynonenal (4-HNE) entsteht bei der Lipidperoxidation. Das 4-HNE bildet, insofern es in höheren Konzentrationen auftritt, Addukte mit zellulären Makromolekülen, wie der DNA oder Proteinen. Es sollte in dieser Arbeit der Einfluss des 4-HNE auf die COX-2 Expression im EpiDerm-Modell untersucht werden. Um festzustellen, ob die UV-Expositionen tatsächlich über Lipidperoxidation zur Bildung intrazellulären 4-Hydroxynonenals führen, wurden die Zelllysate bestrahlter EpiDerm-Modelle zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der UV-Exposition mittels Western-Blot auf 4-HNE-Proteinaddukte hin untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von 20 μ g 4-HNE in das Kulturmedium (Endkonzentration des 4-HNE 64 μ M) zu einer Induktion der COX-2 Expression führt, die sich durch den p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 unterdrücken lässt (Abbildung 3-11). Im Western-Blot konnte nach Zugabe von 4-HNE kein gesteigertes Auftreten von 4-HNE-Proteinaddukten nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Andererseits konnten auch zu verschiedenen Zeitpunkten nach der SSL-Exposition (135 mJ/cm² UVB) im Western-Blot nur eine geringe Steigerung von 4-HNE-Proteinaddukten detektiert werden (Abbildung 3-12).

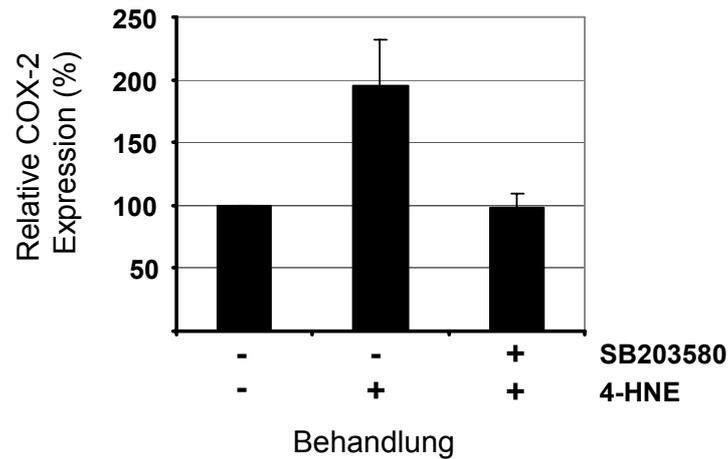


Abb. 3-11: Induktion der COX-2 Expression durch 4-Hydroxynonenal. EpiDerm-Modelle wurden mit dem p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 (10 μ M) oder zur Kontrolle mit dessen Lösungsmittel DMSO versehen. Nach einer Inkubation von 1.5 Stunden wurden 20 μ g 4-HNE oder zur Kontrolle dessen Lösungsmittel Ethanol in das Medium gegeben, und nach weiteren 6 Stunden wurden die EpiDerm-Modelle lysiert und im Western-Blot auf die COX-2 Expression hin untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der auf GAPDH relativierten und auf die Lösungsmittelkontrolle normierten COX-2 Expressionen, wie sie sich durch die densitometrische Auswertung vierer, voneinander unabhängiger Versuche ergeben.

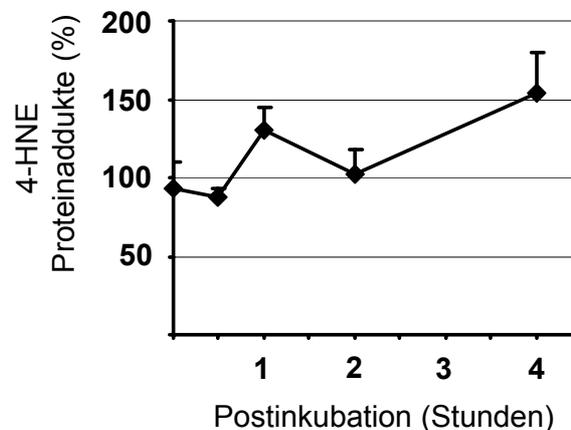


Abb. 3-12: Bildung von 4-HNE Proteinaddukten. Die EpiDerm-Modelle wurden mit simuliertem Sonnenlicht (135 mJ/cm^2 UVB) bestrahlt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach UV-Exposition lysiert. Zur Kontrolle wurde für jeden Zeitpunkt ein unbestrahltes EpiDerm-Modell mitgeführt. Die Bildung der 4-HNE Proteinaddukte wurde im Western-Blot untersucht, wobei die Summe aller detektierten Banden densitometrisch ausgewertet und auf die GAPDH-Bande relativiert wurde. Die so erhaltenen relativierten 4-HNE-Proteinaddukte wurden auf die der jeweiligen unbestrahlten Kontrolle normiert. Hier sind die Mittelwerte \pm SEM von drei (Zeitpunkt 0 Stunden) und vier (übrige Zeitpunkte), voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt.

3.6.3 Modulation der durch UV-Licht induzierten COX-2 Expression durch Antioxidantien

Um die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) bei der durch UV-Licht induzierten COX-2 Expression näher zu untersuchen, wurden verschiedene Antioxidantien auf ihren protektiven Effekt hin untersucht. Dabei wurde der Einfluss von wasserlöslichen Antioxidantien, wie Vitamin C und α -Glucosylrutin (AGR; ToyoSugar, Tokio) und zum anderen lipidlöslichen Antioxidantien, wie Vitamin E, Trolox (ein Derivat des α -Tocopherols) und β -Carotin, auf die UV-induzierte COX-2 Expression untersucht. Diese beiden Klassen (wasser- und lipidlöslich) können eine Auskunft über die Lokalisation und Eigenschaften der reaktiven Sauerstoffspezies geben. Dabei würde der protektive Effekt wasserlöslicher Antioxidantien eher auf die Bildung und Relevanz zytoplasmatischer, ebenfalls wasserlöslicher ROS hindeuten, wohingegen die lipidlöslichen Antioxidantien klassisch Membranschädigungen wie Lipidperoxidationen unterdrücken. Die genannten Antioxidantien wurden in unterschiedlichen Konzentrationen dem Medium 24 Stunden vor der Bestrahlung beigelegt. Eine Ausnahme bildet das Vitamin C, das aufgrund seiner geringen Halbwertszeit eine Stunde vor den UV-Expositionen dem Medium zugesetzt wurde. Die Expression der Cyclooxygenase-2 wurde 6 Stunden nach der UV-Exposition im Western-Blot untersucht. Unter den wasserlöslichen Antioxidantien zeigte das Vitamin C keinen Effekt bezüglich der COX-2 Expression auf Proteinebene. Hier zeigte sich unter dem Einfluss des Vitamin C eher noch eine Steigerung der durch UVA ausgelösten COX-2 Expression. Das α -Glucosylrutin stellte sich jedoch als ein sehr wirksames Antioxidans heraus, das in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration sowohl die SSL- als auch die UVA-induzierte COX-2 Expression um bis zu 55% (SSL-induziert) bzw. sogar auf Kontrollniveau (100%) (UVA-induziert) reduziert (Abbildung 3-13).

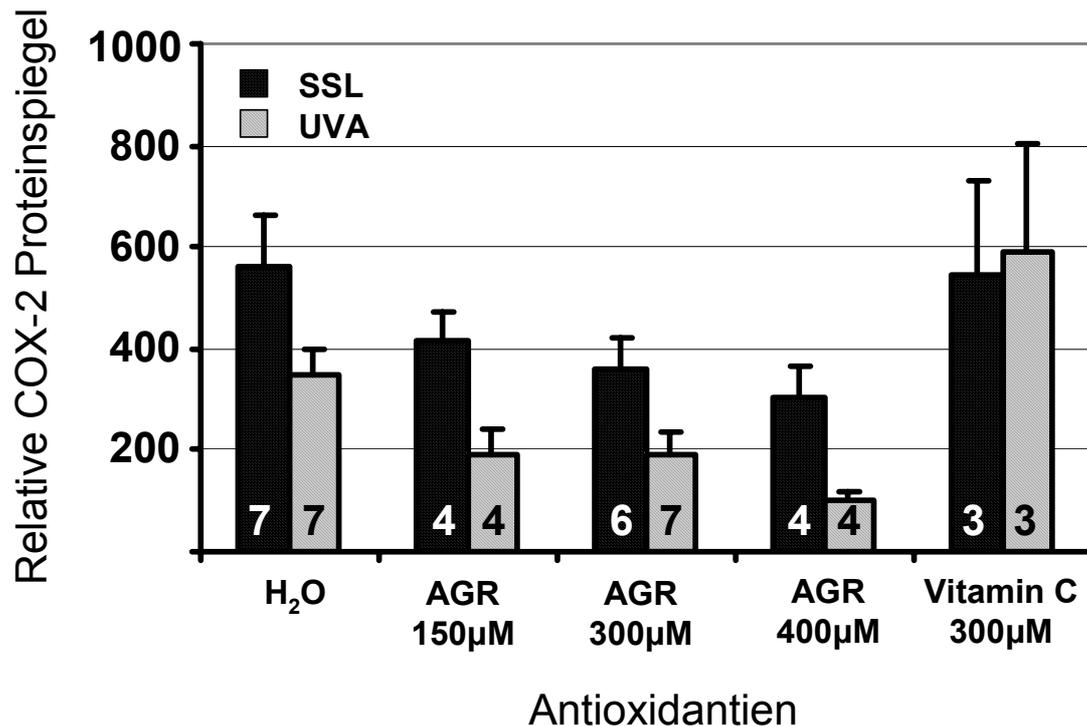


Abb. 3-13: Die Wirkung wasserlöslicher Antioxidantien auf die UV-induzierte COX-2 Expression.

Die Lösungsmittelkontrolle (H₂O) sowie die angegebenen Antioxidantien (AGR: α -Glucosylrutin und Vitamin C) wurden in den angegebenen Konzentrationen 24 Stunden (α -Glucosylrutin) bzw. eine Stunde (Vitamin C) vor der UV-Exposition dem Kulturmedium beigelegt. Die UV-Expositionen wurden mit SSL (135 mJ/cm² UVB, schwarze Balken) bzw. der darin enthaltenen UVA-Dosis (2.97 ± 0.5 J/cm² UVA, graue Balken) durchgeführt. Die EpiDerm-Modelle wurden 6 Stunden nach Bestrahlungsende lysiert und mittels Western-Blot auf die COX-2 Expression hin untersucht. Die COX-2 Proteinspiegel wurden densitometrisch ausgewertet und auf GAPDH relativiert. Die erhaltenen relativierten COX-2 Proteinspiegel nach Behandlung und Bestrahlung wurden auf die der behandelten, aber unbestrahlten Kontrollen (=100%) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM mindestens dreier, voneinander unabhängiger Versuche. Die genauen Fallzahlen sind an der Basis der Balken angegeben.

Die lipidlöslichen Antioxidantien wurden in Ethanol gelöst und dann dem Medium beigelegt. Betrachtet man die Wirkung von Trolox und Vitamin E, so erkennt man keine Reduktion der COX-2 Expression für beide UV-Qualitäten im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Beim β -Carotin hingegen erkennt man eine protektive Wirkung. Bei einer idealen Einsatzkonzentration von 23 μ M führt es zur 70%igen Reduktion der UVA-induzierten COX-2 Expression, wohingegen die SSL-induzierte COX-2 Expression unverändert bleibt (Abbildung 3-14). Interessanterweise führt eine Erhöhung der β -Carotin-konzentration auf 46 μ M nicht zu einer Verbesserung der protektiven Eigenschaft, sondern vielmehr zu

erhöhten COX-2 Expressionen, die zwischen dem 1.6fachen (SSL-vermittelt) und 2fachen (UVA-vermittelt) der Induktionen liegen, die im reinen Lösungsmittel beobachtet werden.

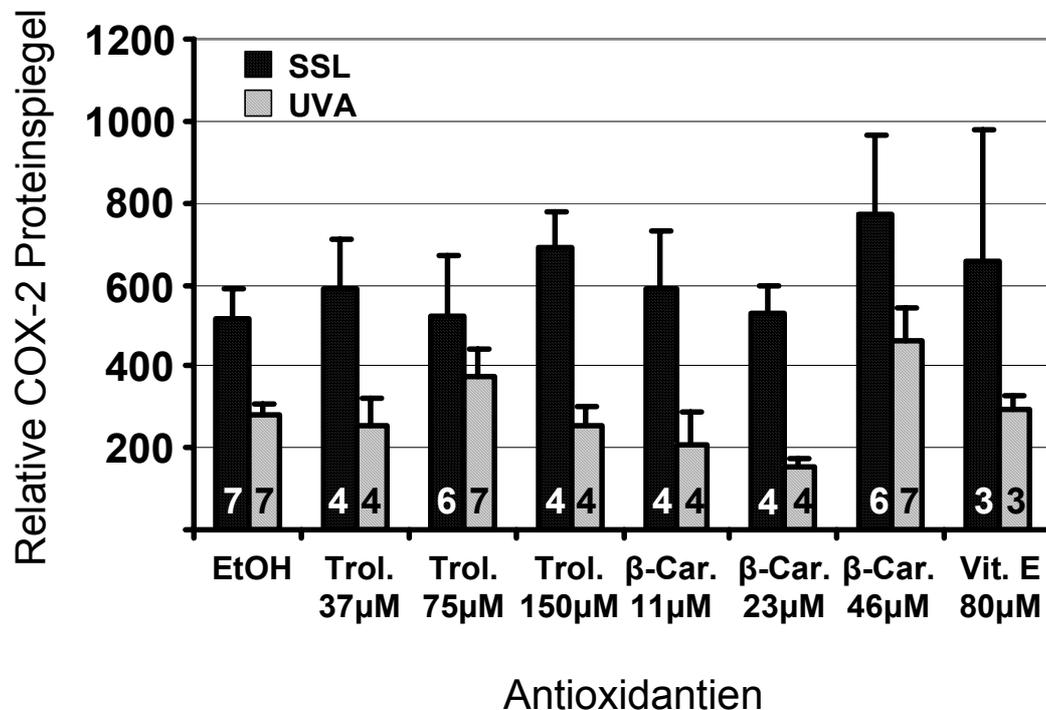


Abb. 3-14: Die Wirkung lipidlöslicher Antioxidantien auf die UV-bedingte COX-2 Expression. Die Lösungsmittelkontrolle (EtOH: Ethanol) sowie die angegebenen Antioxidantien (Trol.: Trolox; β-Car.: β-Carotin und Vit. E: Vitamin E) wurden in den angegebenen Konzentrationen 24 Stunden vor der UV-Exposition dem Kulturmedium beigelegt. Die UV-Expositionen wurden mit SSL (135 mJ/cm^2 UVB, schwarze Balken) bzw. der darin enthaltenen UVA-Dosis ($2.97 \pm 0.5 \text{ J/cm}^2$ UVA, graue Balken) durchgeführt. Die EpiDerm-Modelle wurden 6 Stunden nach Bestrahlungsende lysiert und mittels Western-Blot auf die COX-2 Expression hin untersucht. Die COX-2 Proteinspiegel wurden densitometrisch ausgewertet und auf GAPDH relativiert. Die erhaltenen relativierten COX-2 Proteinspiegel nach Behandlung und Bestrahlung wurden auf die der behandelten, aber unbestrahlten Kontrollen (=100%) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM mindestens dreier, voneinander unabhängiger Versuche. Die genauen Fallzahlen sind an der Basis der Balken angegeben.

3.6.4 Einfluss von Antioxidantien auf die UV-bedingte MAP-Kinasen Aktivierung

Einerseits konnte gezeigt werden, dass Ultraviolette Strahlung ein Aktivator der MAP-Kinasen p38, ERK1/2 und JNK ist. Dabei wurde die Aktivität der p38^{MAPK} und der JNKs als wesentlich für die Expression der Cyclooxygenase-2 nach UV-Exposition im EpiDerm-Modell herausgestellt. Die Beobachtung, dass Antioxidantien wie α -Glucosylrutin (AGR) und β -Carotin (23 μ M) die UV-vermittelte COX-2 Expression reduzieren können, geben einen Hinweis darauf, dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine wesentliche Rolle bei der UV-induzierten COX-2 Expression spielen. Weitere Untersuchungen sollten klären, inwieweit ausgewählte Antioxidantien (Vitamin C, Vitamin E, AGR und β -Carotin), ihre Lösungsmittel (Wasser und Ethanol) sowie das Dimethylsulfoxid (DMSO), das einen mindernden Effekt auf die UV-induzierte COX-2 Expression hat (Tabelle 3-2), die Aktivierung der drei untersuchten MAP-Kinasen nach UV-Exposition beeinflussen.

Die Präinkubation der EpiDerm-Modelle mit den Antioxidantien Vitamin E, β -Carotin und AGR sowie ihrer Lösungsmittel Ethanol und Wasser erfolgte für 24 Stunden. Das Vitamin C wurde eine Stunde vor der UV-Exposition dem Medium beigefügt und in Anlehnung an die Versuche zur Aufklärung der Signaltransduktionswege in der UV-induzierten COX-2 Expression, wurde das Dimethylsulfoxid dem Medium 1.5 Stunden vor Bestrahlungsbeginn zugesetzt. Die UV-Expositionen wurden mit 135 mJ/cm² UVB (SSL) bzw. 2.97 ± 0.5 J/cm² UVA (UVA) durchgeführt. Die EpiDerm-Modelle wurden in einem Zeitraum zwischen 10 und 12 Minuten nach Bestrahlungsende in Lysispuffer überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Modelle wurden schließlich lysiert und die Aktivierung der MAP-Kinasen im Immunpräzipitations-Kinase-Test (JNK) oder im Western-Blot unter Verwendung phospho-spezifischer Antikörper (ERK1/2 und p38^{MAPK}) bestimmt (Abbildung 3-15).

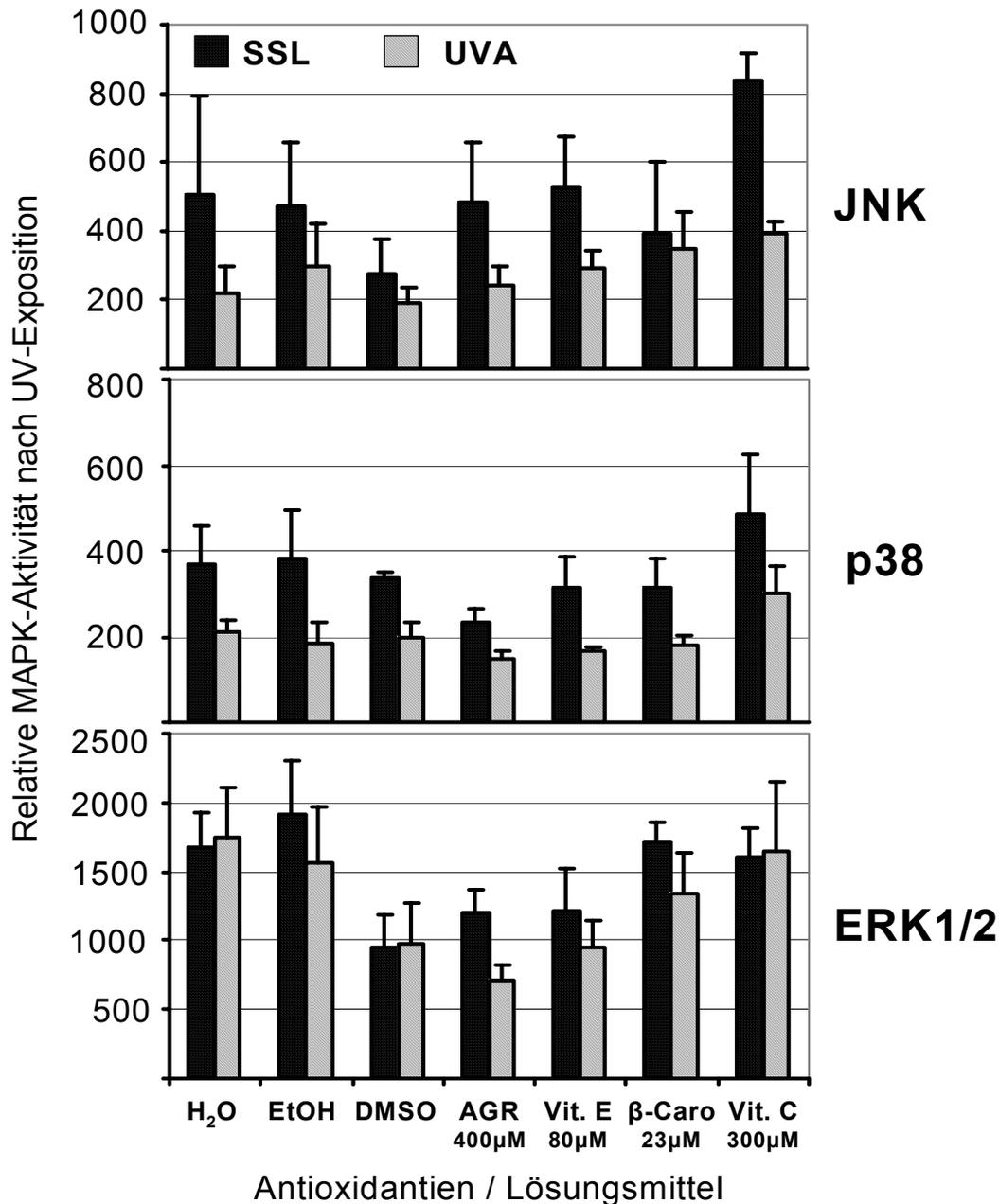


Abb. 3-15: Einfluss verschiedener Antioxidantien sowie einiger Lösungsmittel auf die UV-induzierte Aktivierung von MAP-Kinasen. Das α -Glucosylrutin (AGR), Vitamin E (Vit. E) und β -Carotin (β -Caro) wurden zusammen mit deren Lösungsmittel (Wasser: H₂O und Ethanol: EtOH) dem Medium 24 Stunden vor der UV-Exposition in den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt. Das Vitamin C (Vit. C) wurde dem Medium eine Stunde, das DMSO 1.5 Stunden vor dem Bestrahlungsbeginn beigefügt. Die Bestrahlungen wurden mit 135 mJ/cm² UVB (SSL) bzw. 2.97 ± 0.5 J/cm² UVA (UVA) durchgeführt. Die EpiDerm-Modelle wurden 10 bis 12 Minuten nach Bestrahlungsende im Lysispuffer in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Analyse der MAP-Kinase-Aktivitäten erfolgte durch einen Immunpräzipitations-Kinase-Test (JNK) oder unter Verwendung phospho-spezifische Antikörper im Western-Blot. Dabei wurden zunächst die MAP-Kinase-Aktivitäten auf die Gesamtmenge der jeweiligen MAP-Kinase relativiert. Die auf diese Weise erhaltenen relativen Aktivitäten wurden auf die der behandelten, aber unbestrahlten Modelle (Kontrollen = 100%) normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM der densitometrischen Auswertung dreier, voneinander unabhängiger Versuche.

Die Lösungsmittel Wasser und Ethanol zeigen hinsichtlich der UV-induzierten Aktivierung der drei MAP-Kinasen keinen Unterschied. Dimethylsulfoxid (DMSO) allerdings minimiert sowohl die Aktivierung der JNKs als auch die Aktivierung der ERK1/2, wohingegen die p38^{MAPK} in gleicher Weise aktiviert werden, wie unter Anwesenheit von Wasser oder Ethanol. Wie im Kapitel 3.4 bereits gezeigt wurde, beeinflusst das DMSO auch die UV-induzierte COX-2 Expression, denn die Induktionen konnten unter Anwesenheit von DMSO reduziert werden (Tabelle 3-2).

Das α -Glucosylrutin (AGR) zeigte in seiner wirksamsten Konzentration (400 μ M) keinen Einfluss auf die Aktivierung der JNKs, konnte jedoch die durch SSL hervorgerufene Aktivierung der p38^{MAPK} um 50% sowie die SSL- und UVA-induzierte Aktivierung der ERK1/2 um 30% (SSL) bzw. 60% (UVA) senken.

Das Vitamin E senkte die UV-Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 um knapp 40%, wohingegen es keinen Einfluss auf die Aktivierung der JNKs bzw. nur einen schwachen minimierenden Einfluss auf die SSL-induzierte p38^{MAPK}-Aktivierung zeigte. Das β -Carotin verhielt sich hinsichtlich der Aktivierung aller drei MAP-Kinasen nahezu neutral, es zeigte sich nur eine schwache Verringerung der Aktivität der ERK1/2 bzw. der SSL-vermittelten Aktivierung der p38^{MAPK}.

Das Vitamin C zeigte in der eingesetzten Konzentration von 300 μ M auf der Ebene der COX-2 Expression einen stimulierenden Einfluss, d.h. die beobachtete UVA-induzierte COX-2 Expression lag unter dem Einfluss des Vitamin C (300 μ M) beim 1.9fachen der beobachteten Induktionen im Lösungsmittel. In der Tat wurden auch die beiden stress-aktivierten MAP-Kinasen (p38 und JNK) unter Anwesenheit von Vitamin C nach UV-Bestrahlung stärker aktiviert als die Lösungsmittelkontrolle. Auf der anderen Seite hatte das Vitamin C keinen Einfluss auf die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2.

4. Diskussion

4.1 Abhängigkeit der Wirkung von UV-Licht von seiner Wellenlänge

4.1.1 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Es gibt viele Publikationen, die belegen, dass infolge einer UV-Einwirkung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die über die Aktivierung von Signaltransduktionswegen in bestrahlten Zellen eine Reihe von Antworten auslösen [KLOTZ *et al.*, 2001; MIKKELSEN und WARDMAN, 2003; MAHNS *et al.*, 2003].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durch die UVA-Bestrahlung von Zellkulturmedien Wasserstoffperoxid entsteht (Tabelle 3-3). Welche Inhaltsstoffe der Zellkulturmedien können die UV-vermittelte Bildung von Wasserstoffperoxid bewirken? Damit es zu einer nicht-enzymatischen Aktivierung von Sauerstoff kommen kann, müssen zunächst sogenannte Photosensibilisatoren die UV-Energie aufnehmen. Unter Aufnahme dieser Energie werden sie in einen energetisch angehobenen Zustand versetzt, der sie befähigt, mit anderen Substanzen zu reagieren. Bekannte zelluläre Photosensibilisatoren, die Energie im UVA-Bereich absorbieren, sind das Riboflavin, Porphyrine und Chinone.

Versuche zur Identifikation der dieser UV-vermittelten Wasserstoffperoxidbildung zugrundeliegenden Substanzen haben ergeben, dass hierfür Kombinationen aus (i) Tryptophan und Riboflavin sowie (ii) *N*-(2-Hydroxyethylpiperazin)-*N'*-2-ethansulfonsäure (HEPES) und Riboflavin in Frage kommen. Dass Riboflavin als Photosensibilisator wirkt, ist schon seit den 1960er Jahren bekannt. Auch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in Zellkulturmedien sowie die Bildung von Wasserstoffperoxid durch die Reaktion von Riboflavin und Tryptophan unter UV-Einwirkung wurden bereits gezeigt [GRZELAK *et al.*, 2001; WANG und NIXON, 1978]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass innerhalb des SSL-Spektrums ausschließlich das UVA-Licht (320 bis 400 nm) für die Bildung des Wasserstoffperoxids verantwortlich ist. Die Bestrahlung mit SSL, das zusätzlich noch den UVB-Anteil enthält, führt zu keiner Steigerung der Wasserstoffperoxidkonzentration im Medium (Tabelle 3-4).

Die Wasserstoffperoxidkonzentrationen, die durch die UV-vermittelte Reaktion von Riboflavin und Tryptophan erzielt werden, entsprechen zu 47-83% derjenigen, die unter Bestrahlung der nicht HEPES-gepufferten Medien (DMEM (A) und DMEM (B)) zu beobachten ist (Tabelle 3-3). Die photochemischen Reaktionen in Riboflavin/HEPES-Mischungen führen zu der Entstehung von Wasserstoffperoxid, dessen Konzentration etwas höher liegt als in den HEPES-gepufferten Medien (DMEM (C) und DMEM (D)) (Tabelle 3-3). Daneben konnte gezeigt werden, dass fetales Kälberserum (FKS) die Bildung von Wasserstoffperoxid reduziert, eine Beobachtung, die durch die direkte Reaktion des Wasserstoffperoxids mit Serumproteinen, durch Peroxidaseaktivitäten im Serum oder durch reine Absorptionserscheinungen erklärbar ist.

Diese Ergebnisse zeigen, dass (i) die alleinige Reaktion von UVA mit Riboflavin und Tryptophan nicht vollständig die Entstehung von Wasserstoffperoxid in den nicht HEPES-gepufferten Medien erklärt und (ii) die photochemische Reaktion von HEPES und Riboflavin mehr Wasserstoffperoxid produziert als in den HEPES-gepufferten Medien zu beobachten ist. Der letztere Effekt ist insbesondere durch Reaktionen weiterer Medienbestandteile mit Wasserstoffperoxid zu erklären [GIANDOMENICO *et al.*, 1997]. Neben der Beobachtung, dass die Gegenwart von HEPES zu einer deutlich höheren UVA-induzierten Wasserstoffperoxidbildung führt, zeigt sich zusätzlich auch innerhalb der beiden Mediengruppen (nicht HEPES-gepuffert und HEPES-gepuffert) ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Wasserstoffperoxidbildung.

Betrachtet man die Zusammensetzung beider nicht HEPES-gepufferter Medien (DMEM (A) und DMEM (B)), so sind nur Unterschiede bezüglich des Phenolrots und des Natriumpyruvats vorhanden, Komponenten, die dem DMEM (A) fehlen. Die HEPES-gepufferten Medien (DMEM (C) und DMEM (D)) unterscheiden sich bezüglich ihrer Zusammensetzung nur in wenigen Komponenten (Glukose, Phenolrot, Natriumhydrogencarbonat und Natriumpyruvat). Dabei ist der Anteil des Natriumcarbonats im DMEM (D) um 90% gegenüber dem des DMEM (C) reduziert, wohingegen die anderen angegebenen Komponenten gänzlich fehlen. Auffällig ist, dass in den Medien, die Natriumpyruvat enthalten, die gebildete Menge Wasserstoffperoxids um 43-60% geringer ist als in den korrespondierenden, nicht Natriumpyruvat enthaltenden Medien (Tabelle 4-1). Tatsächlich ist der Abbau von Wasserstoffperoxid durch Pyruvat in Zellkulturmedien schon länger bekannt [GIANDOMENICO *et al.*, 1997]. Frühere Studien haben gezeigt, dass die α -Ketosäure Brenztraubensäure in

Gegenwart von Wasserstoffperoxid decarboxyliert [SALAHUDEEN *et al.*, 1991]. Dadurch, dass das Pyruvat in einem solchen Mechanismus bei der Reduktion des Wasserstoffperoxids zu Wasser selbst aufgebraucht wird, bestimmt die Konzentration des Pyruvats das Ausmaß des Wasserstoffperoxidabbaus.

Tab. 4-1: Beziehung zwischen HEPES, Pyruvat und der Eigenschaft einiger Zellkulturmedien, UVA-vermittelt Wasserstoffperoxid zu generieren.

Medium	<i>Medienkomponenten</i>		
	HEPES	Pyruvat	H ₂ O ₂ [μM]
DMEM (A)	-	-	116 ± 10
DMEM (B)	-	+	66 ± 4
DMEM (D)	+	-	375 ± 16
DMEM (C)	+	+	151 ± 14

Aufgrund der Tatsache, dass es nur unter Anwesenheit von Riboflavin in den untersuchten Medienkomponenten UV-vermittelt zur Bildung von Wasserstoffperoxid kommt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich beim Riboflavin um den auslösenden Photosensibilisator handelt. Diese Beobachtung deckt sich mit der Arbeit von SATO *et al.* (1995), die beschreibt, dass die Zytotoxizität UVA-bestrahlter Riboflavin-Lösungen auf die Bildung von Wasserstoffperoxid zurückzuführen sei. Angeregtes Riboflavin (RF^{*}) zeichnet sich durch ein stark erhöhtes Redoxpotential aus [siehe Diskussion in YOSHIMURA und OHNO, 1988]. Es ist aus diesem Grund in der Lage, andere Moleküle wie beispielsweise Tryptophan oder HEPES, zu oxidieren. Das daraus resultierende Riboflavinanionradikal (RF^{•-}) kann über die monovalente Reduktion molekularen Sauerstoffs Superoxidanionradikale (O₂^{•-}) bilden, die ihrerseits zu Wasserstoffperoxid dismutieren können. Ein zweiter Mechanismus, der für die Bildung von Wasserstoffperoxid aus der Reaktion von HEPES und Peroxynitrit publiziert wurde [KIRSCH *et al.*, 1998], geht vom oxidierten HEPES, dem HEPES-Kationradikal (HEPES^{•+}) aus. Nach der Deprotonierung könnte es mit molekularem Sauerstoff reagieren, so dass ein HEPES-Peroxyradikal (HEPES-OO[•]) gebildet wird, aus dem wiederum Superoxidanionradikale gebildet werden (Abbildung 4-1). Dass das Superoxidanionradikal in der Tat ein Zwischenprodukt in der UVA-vermittelten Wasserstoffperoxidbildung darstellt,

wird durch die Arbeit von PETERSEN *et al.* (2000) bestätigt, die zudem noch die *in vivo*-Relevanz der UV-vermittelten Bildung von Wasserstoffperoxid sowie dessen Folgeprodukte beschreibt.

Die Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf Säugerzellen ist zum einen von ihrer Art und zum anderen von ihrer Konzentration abhängig. So stimulieren sie die Aktivierung einiger Signalwege, führen über die Regulation der Transkription zur Expression bestimmter Gene oder leiten die Apoptose ein. Die Untersuchung zweier Proteinkinasen unterschiedlicher Signalwege (Proteinkinase B (Akt) und p38^{MAPK}) hat gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der UVA-induzierten Aktivierung dieser Wege und der Eigenschaft des verwendeten Mediums, Wasserstoffperoxid während der UV-Exposition zu bilden, besteht (Abbildung 3-9). Die Untersuchungen zur Vitalität dieser Zellen haben zudem bestätigt, dass eine Beziehung zwischen der Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies und der zellulären Vitalität, gemessen an der zellulären Esterasefunktion, besteht. Ein geringer Stimulus durch reaktive Sauerstoffspezies regt die zellulären Detoxifikationsmechanismen an, und es kommt sogar zu einer geringfügigen Steigerung der Vitalität (vgl. Vitalität nach Bestrahlung mit 10J/cm² UVA in PBS *versus* DMEM (C⁺), Tab. 3-5). Übersteigen die Konzentrationen gebildeter ROS die Möglichkeiten der Detoxifikation, so kommt es zum oxidativen Stress, der eine eingeschränkte Vitalität zur Folge hat und schließlich die Apoptose dieser geschädigten Zellen einleitet (Tabelle 3-5).

Zusammenfassend hat sich herausgestellt, dass ausschließlich der UVA-Bereich (320-400 nm) für die Entstehung UV-induzierter ROS (Wasserstoffperoxid) in Zellkulturmedien verantwortlich ist. Die Bildung von ROS verläuft über die Absorption von Lichtenergie durch Riboflavin, das in seinem angeregten Zustand eine erhöhte Reaktivität gegenüber anderen Molekülen aufweist. Die erzeugten ROS spielen in der Aktivierung von Proteinkinasen, wie am Beispiel der Proteinkinase B und der p38^{MAPK} gezeigt, eine große Rolle (Abbildung 3-9). Übersteigen die reaktiven Sauerstoffspezies die antioxidativen Kapazitäten der Zelle, so kommt es zu oxidativem Stress, der in einer reduzierten Vitalität der Zelle oder gar der Apoptose endet. Diese Versuche haben gezeigt, dass einige Effekte, die in *in vitro*-Zellsystemen als UV-Antwort interpretiert werden, ursächlich wahrscheinlich nur auf die UV-bedingte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeführt werden könnten. Aus diesem Grunde ist vor dem Hintergrund der Analyse UV-vermittelter Reaktionen im Zellkultursystem die Auswahl geeigneter Medien während der UV-Exposition zu beachten.

Auf der anderen Seite sind aber auch in der *in vivo*-Situation sowohl in der extrazellulären Flüssigkeit als auch im Zytoplasma eine Reihe von Photosensibilisatoren, wie z. B. Riboflavin, Porphyrine und Chinone vorhanden, so dass die medienbedingte Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies während der UV-Exposition in *in vitro*-Zellsystemen nicht zwangsläufig als artifiziell angesehen werden muss. Dass die UVA-induzierte Wasserstoffperoxidbildung auf intrazellulärer Ebene stattfindet und dort der Auslöser oxidativer Schäden ist, wurde bereits beschrieben [PETERSEN *et al.*, 2000].

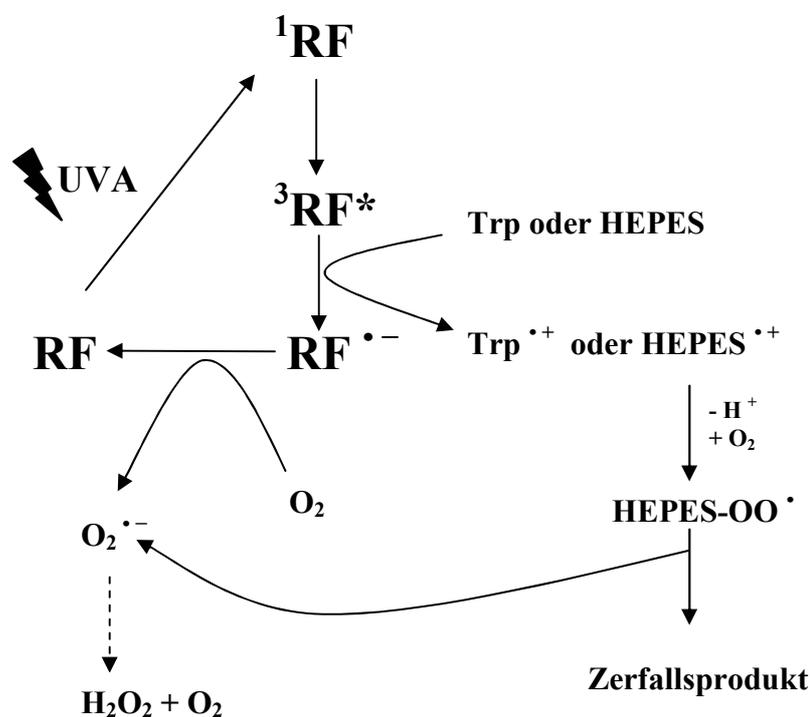


Abb. 4-1: Modell zur UVA-induzierten Entstehung von Wasserstoffperoxid in Zellkulturmedien. Durch das UVA-Licht wird das Riboflavin (RF) über seinen Singulett- (^1RF) in den angeregten Triplett-Zustand ($^3\text{RF}^*$) angehoben und kann aufgrund seines erhöhten Redoxpotentials Tryptophan oder HEPES oxidieren. Das reduzierte Riboflavin überträgt ein Elektron auf molekularen Sauerstoff, so dass Superoxidanionradikale ($\text{O}_2^{\bullet-}$) entstehen. Durch spontane Dismutation wird aus den Superoxidanionen Wasserstoffperoxid und molekularer Sauerstoff. Ein weiteres Modell geht vom oxidierten HEPES aus, das unter Deprotonierung und Reaktion mit molekularem Sauerstoff zum HEPES-Peroxyradikal ($\text{HEPES-OO}^{\bullet}$) wird. Aus diesem wird schließlich Superoxid freigesetzt, das über den beschriebenen Weg der Dismutation zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt.

4.1.2 Aktivierung der MAP-Kinasen

Generell konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle drei verwendeten UV-Bereiche (SSL, UVA und UVA1) in der Lage sind, die untersuchten MAP-Kinasen (p38^{MAPK}, JNK und ERK1/2) transient zu aktivieren, was ihre Bedeutung in der UV-ausgelösten Signaltransduktion bestätigt.

Betrachtet man die p38^{MAPK}, so stellt man hinsichtlich der Aktivierung durch SSL- oder UVA-Licht einen Unterschied fest. Die UVA- bzw. UVA1-induzierten Aktivierungen erreichen unmittelbar nach der UV-Exposition ihr Maximum und fallen innerhalb der folgenden 15 Minuten auf ein Niveau von ungefähr 50% ihrer maximalen Aktivierung zurück, eine Beobachtung, die sich auch bei der UVA-induzierten Aktivierung der ERK1/2 zeigt. Dabei führt das UVA1 nur zu einer schwachen Aktivierung der p38^{MAPK}, die 15 Minuten nach Bestrahlung fast wieder auf das Kontrollniveau abgeklungen ist. Betrachtet man die Aktivierungen der p38^{MAPK} infolge der SSL-Exposition, so stellt man fest, dass einerseits das Maximum der Aktivierung 15 Minuten nach Bestrahlung liegt und andererseits die Aktivierungen viel länger anhalten. Zum Zeitpunkt einer Stunde nach Bestrahlung ist die Aktivierung nur um ca. 25% im Vergleich zur maximalen Aktivierung abgeklungen (Abbildung 3-6). Dieser unterschiedliche Verlauf deutet auf unterschiedliche Stimuli hin, die die UVB- und UVA-induzierte Aktivierung der p38^{MAPK} vermitteln. Diese Ergebnisse decken sich mit Beobachtungen, dass 20 mJ/cm² UVB in humanen Keratinozyten zu einer Aktivierung der p38^{MAPK} im Sinne der doppelten Phosphorylierung führen, wobei die Aktivität selbst zwei Stunden nach Bestrahlung noch detektierbar ist [PEUS *et al.*, 1999]. Zudem zeigt sich das UVA-Licht sowohl in humanen Fibroblasten als auch in humanen Keratinozyten als Stimulus der p38^{MAPK} [KLOTZ *et al.*, 1999; MAZIÈRE *et al.*, 2001].

Im Gegensatz zu der Beobachtung, dass UVA-Licht nicht in der Lage ist, in humanen Fibroblasten die ERK1/2 zu aktivieren [KLOTZ *et al.*, 1999], zeigt sich durchaus in humanen Keratinozyten neben dem UVB-Licht auch das UVA-Licht als effektiver Aktivator der ERK1/2 [MAZIÈRE *et al.*, 2001; PEUS *et al.*, 1999; ASSEFA *et al.*, 1997]. Interessanterweise sind die Aktivierungen der ERK1/2 im EpiDerm-Modell durch UVA und UVA1 zum einen gleich stark und zum anderen unmittelbar nach der Bestrahlung fast doppelt so hoch wie die nach der SSL-Exposition. Bereits 15 Minuten später zeigen sich hinsichtlich der Aktivierungen zwischen den einzelnen UV-Qualitäten keine Unterschiede mehr, d.h. bei

gleichbleibender Aktivierung durch SSL-Bestrahlung gehen die Aktivierungen nach UVA- bzw. UVA1-Exposition um ca. 50% zurück (Abbildung 3-7).

Die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) zeigen sowohl in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT als auch in NHK („normal human keratinocytes“) eine UVB-induzierte Aktivierbarkeit, deren Maximum zwischen 15 Minuten und 30 Minuten nach UVB-Exposition vorliegt [ASSEFA *et al.*, 1997]. Im Gegensatz zu Arbeiten von ADACHI *et al.* (2003), die keine Aktivierbarkeit der JNK in humanen Keratinozyten nach UVA-Exposition fanden, wurde sowohl in anderen Arbeiten [MAZIÈRE *et al.*, 2001; CHOUINARD *et al.*, 2002] als auch im EpiDerm-Modell das UVA-Licht als effektiver Stimulus der JNKs identifiziert. Das UVA-Licht ist zwar in der Lage, eine Induktion der JNKs im EpiDerm-Modell zu verursachen, die nur ungefähr bei 10% derer liegt, wie sie nach SSL-Exposition zu beobachten ist, aber sie liegt dennoch 3fach über der unbestrahlten Kontrolle. UVA1 ist hingegen ein sehr schwacher Aktivator der JNKs, die beobachteten Aktivitäten liegen gerade bei einer knappen Verdoppelung gegenüber den Kontrollen (Abbildung 3-8). Der zeitliche Verlauf der Aktivierung ist identisch mit den Beobachtungen von ASSEFA *et al.* (1997).

Zusammenfassend hat sich gezeigt, dass alle UV-Qualitäten mehr oder minder in der Lage sind, die MAP-Kinasen zu aktivieren und es neben der Stärke der Aktivierbarkeit auch durchaus Unterschiede hinsichtlich der Dauer der Aktivität der MAP-Kinasen gibt. Darüber hinaus konnte erstmals gezeigt werden, dass der UVA1-Bereich (350 bis 400 nm) ebenfalls noch in der Lage ist, MAP-Kinasen zu aktivieren und dies z.T. sogar stärker als SSL (290 bis 400 nm), wie am Beispiel der ERK1/2 Aktivierung gezeigt werden konnte. Damit konnte bestätigt werden, dass auch dem UVA-Bereich eine große Bedeutung als Stimulus physiologischer Veränderungen zugeschrieben werden muss.

4.2 Expression der Cyclooxygenase-2 im EpiDerm-Modell

4.2.1 *Wellenlängenabhängigkeit der Induktion der Cyclooxygenase-2 durch UV*

Eine Reihe von Publikationen sind zur UV-vermittelten Induktion der COX-2 Expression in der Haut erschienen [BUCKMAN *et al.*, 1998; BACHELOR *et al.*, 2002; ISOHERRANEN *et al.*, 1999], doch werden die Induktionen nur infolge einer Bestrahlungsart (UVB+UVA, UVB oder UVA) beschrieben. Der Fokus dieser Studie liegt unter anderem in der Identifikation von Wellenlängenbereichen innerhalb des simulierten Sonnenlichtes (SSL), die die COX-2 Expression induzieren. Die Verwendung unterschiedlicher Zellsysteme, Bestrahlungsquellen sowie unterschiedlicher UV-Intensitäten in der Literatur machen die Ergebnisse nicht miteinander vergleichbar und geben damit keinen Hinweis auf die Wellenlängenabhängigkeit der COX-2 Expression. In dieser Studie wurden alle Versuche unter Verwendung einer Strahlungsquelle (Sonnensimulator), eines Zellsystems (EpiDerm-Modell) und mit UV-Intensitäten durchgeführt, die miteinander vergleichbar sind, d.h. die UVA- bzw. UVA1-Intensitäten entsprechen denen, die in der SSL-Exposition enthalten sind. Aufgrund dieses Versuchsaufbaus sind die COX-2-Induktionen, ausgelöst durch definierte UV-Bereiche, nicht nur qualitativ, sondern auch näherungsweise quantitativ miteinander zu vergleichen.

Durch den Einsatz von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) und die intradermale Injektion von Prostaglandinen, konnte erstmals die Bedeutung der COX-2-induzierten Entzündungsreaktion am UV-Erythem herausgestellt werden [SNYDER, 1975; VADAS *et al.*, 1981; FLOWER *et al.*, 1976]. Zwar ist bekannt, dass simuliertes Sonnenlicht, sowie die darin enthaltenen großen UV-Bereiche jeweils für sich (UVB oder UVA) die COX-2 Expression in der Haut stimulieren, doch gibt es keine Arbeit, die das genaue UV-Wirkungsspektrum für die COX-2-Induktion untersucht hat. Die Identifizierung eines solchen UV-Wirkungsspektrums würde zum einen die biochemische Grundlage des Sonnenbrandes weiter charakterisieren und zum anderen Anhaltspunkte zur Prävention bieten. Um die Wellenlängenabhängigkeit der UV-vermittelten COX-2 Expression zu untersuchen, wurden als Zelltyp Keratinozyten gewählt, da das UVB-Licht (290 bis 320 nm) aufgrund seines Penetrationsverhaltens [BRULS *et al.*, 1984] weitestgehend in der Epidermis als Stimulus fungieren kann. Um sich im

Zellmodell so weit wie möglich der *in vivo*-Situation anzunähern, wurden die Untersuchungen am kommerziell erhältlichen EpiDerm-Modell durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine *in vitro* entwickelte Epidermis, die die typischen Differenzierungsstadien vom *Stratum basale* bis zum *Stratum corneum* der humanen Epidermis widerspiegelt (Abbildung 3-1). Das hier verwendete Modell verfügt nur über einen Zelltyp (primäre humane Keratinozyten), so dass epidermisassoziierte Zellen, wie z.B. Melanozyten und Langerhans-Zellen, fehlen.

Es konnte gezeigt werden, dass die COX-2 Expression infolge der UV-Exposition im *Stratum basale* des EpiDerm-Modells erhöht ist (Abbildung 3-2), wie es bereits für SKH-1 Mäuse publiziert wurde [TRIPP *et al.*, 2003]. Betrachtet man den Zeitverlauf der transienten COX-2 Expression im EpiDerm-Modell, so ist das Maximum der mRNA-Spiegel und Proteinspiegel in einem Zeitraum zwischen 4 und 6 Stunden nach UV-Exposition erreicht (Abbildungen 3-4 und 3-5). Der Zeitraum der maximalen Expression ist für alle untersuchten Wellenlängenbereiche (SSL (290 bis 400 nm), UVA (320 bis 400 nm) und UVA1 (350 bis 400 nm)) gleich, die Unterschiede der stimulierenden Wellenlängenbereiche zeigen sich ausschließlich in der Stärke der COX-2 Expression.

Die durch UVA-Licht induzierte COX-2 Expression zeigt in der Keratinozyten-Zelllinie HaCaT einen ganz ähnlichen zeitlichen Verlauf [BACHELOR *et al.*, 2002], wohingegen das UVB-Licht in HaCaTs sowie in primären humanen Keratinozyten zu einer länger anhaltenden COX-2 Expression führt, die auch 12 bis 24 Stunden nach UV-Exposition noch detektierbar ist [BUCKMAN *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2001]. Die von BACHELOR *et al.* (2002) beschriebene Induktion der Cyclooxygenase-2 durch UVA-Licht in Keratinozyten (HaCaT) konnte im EpiDerm-Modell bestätigt werden. Ein großer Unterschied besteht neben der Auswahl des Zellmodells zusätzlich in der Intensität der gewählten UVA-Dosis. In HaCaTs ist erst ab einer Dosis von 25 J/cm² UVA die COX-2 induzierbar, im EpiDerm-Modell zeigten sich bereits Induktionen nach einer Bestrahlung mit rund 2 J/cm² UVA, also nach einer Dosis, die eine Größenordnung niedriger ist und dabei in einem physiologisch relevanten Bereich liegt.

Die Bestrahlungen mit SSL führen in Abhängigkeit von der verwendeten Intensität (90 mJ/cm² UVB und 135 mJ/cm² UVB) zu Induktionen, die auf mRNA-Ebene im Mittel bei einer 4fachen bzw. 9fachen Erhöhung liegen. Diese erhöhten mRNA-Spiegel resultieren in einer knapp 4fachen bzw. 5.5fachen COX-2-Induktion auf Proteinebene (Abbildungen 3-4 und 3-5). Die Bestrahlungen unter Ausschluss des UVB-Anteils, also mit den beiden in den

SSL Bestrahlungen enthaltenen UVA-Intensitäten ($1.98 \pm 0.33 \text{ J/cm}^2$ UVA und $2.97 \pm 0.5 \text{ J/cm}^2$ UVA) führen im Vergleich zur Induktion auf Proteinebene (2.5fach bzw. 4fach) zu einer verhältnismäßig schwachen Erhöhung der mRNA-Spiegel (1.5fach bzw. 2fach) (Abbildungen 3-4 und 3-5). Bei der UVA-Bestrahlung liegt bei beiden Intensitäten die Induktion auf Proteinebene über der Induktion auf mRNA-Ebene, ein Verhältnis, dass bei der SSL-Bestrahlung umgekehrt vorliegt. Diese Beobachtung spiegelt die unterschiedlichen Regulationsmöglichkeiten der COX-2 Expression wider. Wie bereits publiziert wurde, wird die COX-2 Expression auf unterschiedlichen Ebenen reguliert, nämlich einerseits auf transkriptioneller Ebene über die Transkriptionssteigerung und andererseits auf posttranskriptioneller Ebene über die mRNA-Stabilisierung. Dabei spielen sogenannte „AU-rich elements“ (AREs) eine wichtige Rolle [DIXON *et al.*, 2000], die aus repetitiven AUUUA-Sequenzen bestehen und in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der COX-2 mRNA lokalisiert sind [APPLEBY *et al.*, 1994]. An die AREs bindende Proteine, wie beispielsweise HuR oder hnRNP A0, erhöhen die Stabilität der COX-2 mRNA [DIXON *et al.*, 2001; ROUSSEAU *et al.*, 2002]. Durch die Erhöhung der mRNA-Stabilität kann eine vorliegende Matrize durch ihre längere Existenz auch öfter translatiert werden, so dass es dadurch zu Induktionen auf Proteinebene kommt, ohne dass die Transkriptionsrate gesteigert wird. Gleichzeitig können bei einem über die mRNA-Stabilisierung verlangsamten mRNA-„turn-over“ die mRNA-Spiegel ansteigen. Ein solcher regulatorischer Mechanismus ist gerade im Bereich der Entzündung weit verbreitet, da diese Art der Regulation schnelle Antworten auf Proteinebene erlauben, ohne die gesamte Transkriptions-Maschinerie zu aktivieren [CHEN und SHYU, 1995].

Diese Untersuchungen und zudem die Beobachtung, dass der UVA1 Wellenlängenbereich (350 bis 400 nm) zu keiner nennenswerten COX-2 Induktion führt (Abbildung 3-5), zeigen, dass

- (i) innerhalb des Spektrums des simulierten Sonnenlichtes nur UVB (290 bis 320 nm) und UVA2 (320 bis 350 nm) die COX-2 Expression stimulieren.
- (ii) die durch den UVA2-Anteil des simulierten Sonnenlichtes induzierte COX-2 Expression auf Proteinebene ca. 65% derer ausmacht, die nach der Bestrahlung mit simuliertem Sonnenlicht zu beobachten ist.

- (iii) die Wellenlängenbereiche oberhalb 350 nm keinen nennenswerten Einfluss auf die COX-2 Expression haben.

Diese Studie bestätigt also die erstmals von BACHELOR *et al.* (2002) publizierte Induktion der COX-2 durch UVA-Licht in humanen Keratinozyten und grenzt darüber hinaus den für die Induktion relevanten Bereich innerhalb des UVA-Lichtes weiter ein, indem gezeigt werden konnte, dass die UVA-induzierte COX-2 Expression ursächlich fast ausschließlich auf die Wirkung des UVA2 Bereichs (320 bis 350 nm) zurückzuführen ist.

Auf der anderen Seite bestätigen die Daten zur COX-2-Aktivität, gemessen am Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Spiegel im Zellkulturmedium, die dargestellten Charakteristika der UV-induzierten COX-2 Expression. Auch hier führt UVA-Licht zu PGE₂-Konzentrationen, die zu ungefähr 40% derer entsprechen, die nach SSL-Exposition gemessen werden (Tabelle 3-1). Die Tatsache, dass in Übereinstimmung mit der fehlenden COX-2 Expression nach UVA1-Bestrahlung auch keine PGE₂-Induktionen zu verzeichnen sind, machen auch hier den UVA2-Bereich für die UVA-induzierte Prostaglandinsynthese verantwortlich.

4.2.2 Welcher Signalweg vermittelt die UV-induzierte COX-2 Expression? Gibt es Unterschiede hinsichtlich der SSL- und der reinen UVA-induzierten COX-2 Expression?

Die gesteigerte Prostaglandinsynthese als UV-Antwort unterliegt der Aktivität einiger Enzyme (Phospholipase C oder Phospholipase A₂, Cyclooxygenase-2 sowie der entsprechenden Prostaglandin-Synthasen), so dass diese der Kontrolle durch möglicherweise verschiedene Signaltransduktionswege unterliegt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche der drei durch UV-Licht aktivierbaren MAP-Kinasen die gesteigerte Expression der Cyclooxygenase-2 vermittelt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die MAP-Kinasen durch Inhibitoren in ihrer Aktivität unterdrückt. Die anschließende Analyse zur COX-2 Expression nach UV-Exposition in Gegenwart dieser Inhibitoren brachte das Ergebnis, dass sowohl der p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 als auch der JNK-Inhibitor SP600125 die SSL-vermittelte COX-2 Expression reduzieren, wohingegen der MEK1/2-Inhibitor U0126 keinen Effekt zeigte (Tabelle 3-2). Betrachtet man hingegen die UVA-induzierte COX-2 Expression, so

zeigt keiner der verwendeten Inhibitoren einen Effekt; im Gegenteil, die UVA-Exposition führte in Gegenwart des SP600125 sogar zu einer Stimulation der COX-2 Expression. Die Verwendung eines weiteren JNK-Inhibitors („JNK-Inhibitor I“), der ein zellpermeables Polypeptid aus 32 Aminosäureresten darstellt, das spezifisch an die JNKs bindet, zeigte übereinstimmend mit dem JNK-Inhibitor SP600125 die Reduktion der SSL-induzierten COX-2 Expression und zeigte darüber hinaus auch einen mindernden Effekt hinsichtlich der UVA-induzierten COX-2 Expression. In der Tat wurde der JNK-Inhibitor SP600125 in der Literatur als unspezifisch beschrieben, indem er verschiedene Kinasen inhibiert, und dies teilweise effizienter als JNKs [BAIN *et al.*, 2003]. Insofern sind die mit dem „JNK-Inhibitor I“ erhobenen Daten als valider anzusehen als die mit dem SP600125 erhobenen Daten.

Hinsichtlich der Signaltransduktionswege, die die COX-2 Expression vermitteln, sind eine Reihe von Publikationen erschienen, die zeigen, dass es eine große Diversität in der Signaltransduktion gibt, um die COX-2 Expression zu regulieren. Sowohl die Art des Stimulus als auch das Zellsystem bestimmen, welcher Signalweg die Aktivierung wiederum unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren vermittelt, woraus die gesteigerte Transkription resultiert. Neben der transkriptionellen Regulation der COX-2 ist noch ein weiterer Mechanismus zur Steuerung der Expression bekannt, der unter den „immediate-early genes“ sehr häufig beobachtet wird. Dieser Mechanismus gehört zur post-transkriptionellen Kontrolle und umfasst die Stabilisierung der mRNA durch verschiedene Proteine, die an AUUUA-reichen Sequenzen, sogenannten AREs („AU-rich elements“) binden und dadurch den Abbau der mRNA inhibieren.

Es gibt nur wenige Publikationen, die die zur UV-induzierten COX-2 Expression führenden Signaltransduktionswege untersuchen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur UVB-vermittelten COX-2 Expression in HaCaTs, konnte auch im EpiDerm-Modell die Aktivierung der p38^{MAPK} für die SSL-vermittelte COX-2 Expression verantwortlich gemacht werden [CHEN *et al.*, 2001]. Darüber hinaus spielen sowohl im EpiDerm-Modell als auch in HaCaTs die Aktivierungen der MAP-Kinasen ERK1/2 für die UV-vermittelte COX-2 Expression keine Rolle [CHEN *et al.*, 2001]. Untersuchungen in dieser Zelllinie haben zudem die Bedeutung der CRE/Ebox bzw. der Transkriptionsfaktoren CREB und ATF1 in der UVB-induzierten COX-2 Expression herausgestellt [TANG *et al.*, 2001]. Diese Ergebnisse werden durch weitere Untersuchungen ergänzt, die ebenfalls die Rolle der Transkriptionsfaktoren CREB-2/ATF-2 hinsichtlich der basalen COX-2 Expression verantwortlich machen konnten,

wobei unterschiedliche Stimuli durch nachfolgende Bindung von AP-1-Bausteinen, des C/EBP β („CCAAT/enhancer binding protein“) oder NF κ B die erhöhte transkriptionelle Tätigkeit vermitteln [SCHROER *et al.*, 2002]. Hinsichtlich der SSL-vermittelten COX-2 Expression im EpiDerm-Modell konnte jedoch noch ein zweiter Signalweg als relevant herausgestellt werden, der wahrscheinlich auf die Wirkung des UVA-Lichtes zurückzuführen ist, da dieser ausschließlich für die UVA-induzierte COX-2 Expression verantwortlich zu sein scheint. Es handelt sich dabei um den Weg, der über JNK läuft und dessen Unterbrechung durch den „JNK-Inhibitor I“ sowohl die SSL- als auch die UVA-induzierte COX-2 Expression reduziert. Die Beobachtungen, dass sowohl der p38^{MAPK}-Inhibitor SB203580 als auch der „JNK-Inhibitor I“ jeweils für sich die COX-2 Expression infolge SSL-Exposition unterdrücken, lässt darauf schließen, dass die COX-2 Expression als konvergierender Effekt beider MAP-Kinasen resultiert. Dass dennoch nicht jeder Inhibitor die COX-2 Expression völlig auf das Kontrollniveau reduziert, könnte eine Folge der Spezifität der Inhibitoren für nur bestimmte Subtypen der entsprechenden MAP-Kinase sein, so dass die Inhibitoren aufgrund der Diversität an Subtypen das Signal nicht gänzlich unterdrücken.

Betrachtet man die UVA-induzierte COX-2 Expression im EpiDerm-Modell, so steht die Identifizierung der JNKs als UVA-vermittelnde MAP-Kinasen im Gegensatz zu den beschriebenen Verhältnissen in der Zelllinie HaCaT, in der die p38^{MAPK} nicht nur in der UVB-, sondern auch in der UVA-induzierten COX-2-Antwort eine entscheidende Rolle spielt [BACHELOR *et al.*, 2002]. Ein weiterer zu beobachtender Unterschied liegt in der benötigten Intensität des UVA-Lichtes, um eine COX-2-Antwort auszulösen. In HaCaT-Zellen konnte erst ab einer Dosis von 25 J/cm² UVA die COX-2 Expression stimuliert werden, wohingegen im EpiDerm-Modell bereits ca. 2 J/cm² UVA, also eine Dosis, die ungefähr eine Größenordnung niedriger ist, zur COX-2 Expression führt. BACHELOR *et al.* (2002) beschrieben, dass die UVA-bedingte Aktivierung der p38^{MAPK} die COX-2 Expression über die Stabilisierung der mRNA steuert. Diese Bedeutung wurde schon mehrmals der p38^{MAPK} zugeschrieben und dies auch für unterschiedliche mRNAs [KUMAGAI *et al.*, 2002; REUNANEN *et al.*, 2002]. Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass auch die JNKs, wenn auch über einen anderen, ARE-unabhängigen Mechanismus, zur Stabilisierung von mRNAs beitragen können [CHEN *et al.*, 2000]. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse hinsichtlich der vermittelnden MAP-Kinasen fügen sich gut in die bereits publizierten Ergebnisse ein, da zum einen die p38^{MAPK} über die Phosphorylierung von CREB und ATF2 und andererseits die JNK über die Phosphorylierung von ATF2 die Transkription des Cox-2 Gens regulieren könnten.

Darüber hinaus ist die gesteigerte COX-2 Expression möglicherweise auch über die Aktivierung von AP-1-Bausteinen, wie c-Jun, denkbar. Dies ist ein Vorgang, der bereits beschrieben wurde [SCHROER *et al.*, 2002].

4.2.3 Die COX-2 Expression als alleinige Ursache des Sonnenbrandes?

Es konnte gezeigt werden, dass simuliertes Sonnenlicht sowie UVA-Licht in der Lage sind, die COX-2 Expression zu stimulieren. Der simultane Anstieg der Prostaglandin E₂-Sekretion ins Medium bestätigt die Aktivität der COX-2. Vergleicht man den Expressionsverlauf mit der durch verschiedene Methoden (Reflexionsspektroskopie mittels SpectroPen[®] und Blutflussgeschwindigkeit mittels Laser Doppler) erfassten Erythementwicklung [R. Wolber und J. Batzer, Beiersdorf AG, Hamburg, persönliche Mitteilung], so stellt man eine zeitliche Korrelation zwischen der COX-2 Expression und der Ausbildung eines Erythems fest (Tabelle 4-2). Diese Beobachtung und die durch klinische Studien belegten präventiven Eigenschaften der NSAIDs bestätigen den eindeutigen Zusammenhang zwischen COX-2 Expression und Erythementwicklung. Auf der anderen Seite belegen klinische Studien der Beiersdorf AG Hamburg [R. Wolber, persönliche Mitteilung] sowie die Arbeiten von BLACK *et al.* (1980), dass die topische Applikation von Diclofenac (1%) oder Flurbiprofen (5%), das SSL-induzierte Erythem nicht vollständig verhindern kann (Tabelle 4-2). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass neben der Cyclooxygenaseaktivität weitere physiologische Vorgänge in der Ausbildung eines Erythems involviert sind. Betrachtet man den Verlauf des Erythems unter Diclofenac (1%)-Behandlung, so stellt man fest, dass gerade die frühen Entwicklungsstadien (2.5 bis 10 Stunden nach UV-Exposition) des UV-Erythems reduziert werden, die späteren Zeitpunkte hingegen fast unbeeinflusst bleiben.

Weitere Überlegungen lassen es eher unwahrscheinlich erscheinen, dass sowohl das UVB- als auch das UVA-Erythem ausschließlich Erscheinungen einer erhöhten COX-2 Expression sind. Vor dem Hintergrund, dass die Induktion der Entzündungsreaktion, gemessen an der COX-2 Expression (Proteinebene) und der COX-2 Aktivität (PGE₂-Sekretion), durch das UVA2 Licht einen Anteil von ungefähr 50-70% an der durch das SSL hervorgerufenen Induktion hat, erscheint die COX-2-Aktivität als alleinige biochemische Erklärung des Sonnenbrandes eher unzureichend. Untersuchungen haben gezeigt, dass das UVB-Licht rund

1000mal stärker erythemato-gen ist als das UVA-Licht [WARIN, 1978], dessen Anteil an der gesamten UV-Intensität des simulierten Sonnenlichtes jedoch ungefähr 25mal höher ist. Wenn die COX-2 Aktivität mit ihrer nachfolgenden Synthese der Prostaglandine alleinig für die Ausbildung eines Sonnenbrandes verantwortlich wäre, dann dürfte die Induktion durch das UVA-Licht nur knapp 3% derer betragen, die nach einer Exposition mit SSL zu beobachten ist, in der die gleiche UVA-Intensität enthalten ist. Anders ausgedrückt: Es wäre nach diesem Modell, unter der Prämisse, dass die COX-2 Aktivität die alleinige biochemische Grundlage des Sonnenbrandes ist, das UVB-Licht nur 50mal stärker erythemato-gen als das UVA-Licht.

Es wird seit längerem diskutiert, dass zusätzlich zur COX-2-Aktivität und der damit verbundenen erhöhten Synthese von Prostaglandinen noch die Schädigung der DNA im Sinne der Ausbildung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) oder (6-4)-Photoaddukten der starken erythemato-genen Wirkung des UVB-Lichtes zugrunde liegt [YOUNG *et al.*, 1998; UEDA *et al.*, 1996]. Beide Arten von DNA-Schäden entstehen durch direkte Absorption der Lichtenergie durch DNA und zeigen ein ähnliches Wirkungsspektrum, dessen Maximum im UVB-Bereich liegt [ROSENSTEIN UND MITCHELL, 1987; YOUNG *et al.*, 1998]. In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen konnte auch in dieser Arbeit am EpiDerm-Modell gezeigt werden, dass der UVB-Anteil des simulierten Sonnenlichtes für die Bildung der CPD verantwortlich ist. Der alleinige UVA-Anteil des simulierten Sonnenlichtes führte zu keiner Ausbildung von CPD (Abbildung 3-10). Die Bildung der CPD und der (6-4)-Photoaddukte gehören zu den prominenten DNA-Schäden, die durch UVB-Licht hervorgerufen werden, wobei der Anteil der CPD deutlich überwiegt [MITCHELL, 1988]. Beide Arten von DNA-Schäden unterscheiden sich zudem in der Geschwindigkeit, in der sie durch Reparaturenzyme eliminiert werden. Es gibt zwar unterschiedliche Untersuchungen, die in Abhängigkeit von der Methodik und dem Zellsystem unterschiedliche Zeitverläufe angeben, doch ist ihnen gemeinsam, dass die (6-4)-Photoaddukte wesentlich schneller als die CPD aus dem Genom eliminiert werden [MITCHELL *et al.*, 1985; UEDA *et al.*, 1996].

Doch welcher Zusammenhang besteht zwischen der Bildung dieser DNA-Schäden und dem Sonnenbrand? Zum einen zeigen die UV-Bereiche, die stark erythemato-gen sind und die, die zur Bildung dieser Addukte führen, einen großen Deckungsbereich. Untersuchungen haben gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen der UV-Empfindlichkeit und der Bildung von CPD gibt [FREEMAN *et al.*, 1986; UEDA *et al.*, 1996]. Diese Untersuchungen werden durch die Beobachtung bestätigt, dass Patienten mit Xeroderma Pigmentosum oder dem Cockayne-

Syndrom, die durch Mutationen im NER-System unter einer gestörten oder fehlenden Reparatur dieser DNA-Schäden leiden, ebenfalls durch eine hohe UV-Empfindlichkeit ausgezeichnet sind [DE BOER und HOEIJMAKERS, 2000].

Neuere Untersuchungen an transgenen Mäusen, die die CPD-spezifische Photolyase aus dem Langschnauzen Kaninchenkänguruh (*Potorous tridactylus*) exprimieren, haben gezeigt, dass die lichtgetriebene spezifische Reparatur der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere sowohl die Ausbildung eines Erythems als auch die Apoptose stark reduzieren [SCHUL *et al.*, 2002]. In Übereinstimmung mit diesen Versuchen stehen die Ergebnisse der topischen Applikation von in Liposomen integrierter Photolyase aus dem Cyanobakterium *Anacystis nidulans* nach UV-Exposition [STEGE *et al.*, 2000]. STEGE *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die topische Applikation von in Liposomen integrierter Photolyase zum einen die Ausbildung UV-induzierter CPD um bis zu 40% senkt und zudem das Ausmaß des UV-induzierten Erythems mit der charakteristischen Ausbildung der sogenannten „sunburn cells“ mindert. Diese Ergebnisse infolge einer enzymatischen Reparatur dieser DNA-Schäden werden durch Untersuchungen, die sich mit dem UV-Schutz durch Antioxidantien beschäftigen, bestätigt. So führte die topische Applikation eines Extraktes aus grünem Tee, der sich überwiegend aus den Derivaten des polyphenolischen Epicatechins (Epicatechin, Epigallocatechin, Epigallocatechin-3-gallat und Epicatechin-3-gallat) zusammensetzt, zur Senkung der UV-vermittelten Ausbildung von CPD, die in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis bei 60-80% lag. Parallel dazu beobachtete man ebenfalls eine Reduktion des Erythems, die in Abhängigkeit der UV-Dosis zwischen 84% und 100% lag [KATIYAR *et al.*, 2000]. Aufgrund der Gesamtheit dieser Untersuchungen, in denen sich immer wieder eine Korrelation zwischen der Ausbildung von CPD oder (6-4)-Photoaddukten und der Erythembildung zeigt, scheinen diese Art der DNA-Schädigungen als Ursache der starken erythematogenen Wirkung des UVB-Lichtes als sehr wahrscheinlich. Dabei wird jedoch kontrovers diskutiert, welcher der beiden Arten von DNA-Schäden denn stärker zytotoxisch ist bzw. die Hauptursache der UV-Sensibilität sein könnte [MITCHELL, 1988]. Der präventive Effekt der CPD-spezifischen Photolyasen [SCHUL *et al.*, 2002; STEGE *et al.*, 2000] unterstreicht eher die Bedeutung der CPD-Bildung in der Erythembildung, doch kann man diesen Effekt auch dadurch erklären, dass das Reparatursystem der Zelle durch die Aktivität der Photolyase schneller und effektiver (6-4)-Photoaddukte eliminieren kann, da nur noch wenige CPD mit den (6-4)-Photoaddukten um das Reparatursystem konkurrieren. Weitere Untersuchungen von YOUNG *et al.* (2000) zeigen eine Korrelation zwischen dem Lichtschutzfaktor einer Sonnencreme und ihrem Schutz vor der Bildung von CPD und (6-4)-Photoaddukten.

Tab. 4-2: Darstellung des Zusammenhanges zwischen der COX-2 Expression und der Erythementwicklung sowie des Einflusses von Diclofenac (1%) auf die Ausbildung eines UV-Erythems. Unter **I.)** sind die im EpiDerm-Modell beobachteten relativen Cyclooxygenase-2 Proteinspiegel nach Bestrahlung mit 135 mJ/cm² UVB simuliertem Sonnenlicht dargestellt. Der Punkt **II.)** charakterisiert die Ausbildung eines UV-Erythems mittels SpectroPen® und Laser Doppler. Die Hautareale wurden mit 2 MED simuliertem Sonnenlicht bestrahlt und nachfolgend die Rötung und die Durchblutung mittels SpectroPen® und Laser Doppler bestimmt. Die dargestellten Werte wurden bereits auf benachbarte, aber unbestrahlte Hautareale relativiert. Daraus ergeben sich für den SpectroPen® Δa -Werte (a -Wert = Messung der Rötung) und für den Laser Doppler Δ -Werte relativer Einheiten. Unter **III.)** ist der gleiche Versuchsablauf wie unter II.) dargestellt, nur dass unmittelbar nach der UV-Exposition sowie nach weiteren 5 und 24 Stunden die topische Applikation von Diclofenac (1%) auf diese Hautareale erfolgte. Die Daten aus II.) und III.) wurden im Zuge einer klinischen Studie der Beiersdorf AG Hamburg erhoben (nicht publiziert) und wurden freundlicherweise von Herrn J. Batzer und R. Wolber (Beiersdorf AG, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

<i>Messmethode</i>	<i>Zeitverlauf (Stunden)</i>					
	2.5	5	7.5	10	24	48
I.) Bestrahlung mit 135mJ UVB/cm² (<i>in vitro</i>)						
COX-2 Expression (relative Proteinspiegel)	2.9	4.7	3.4	2.9	1.2	3.3
II.) Bestrahlung mit 2 MED (<i>in vivo</i>)						
SpectroPen® (Δa -Werte)	1.4	3.2	4.3	4.1	3.2	2.5
Laser Doppler (Δ relative Einheiten)	60	226	322	338	176	100
III.) Bestrahlung mit 2 MED + Diclofenac (1%) (<i>in vivo</i>)						
SpectroPen® (Δa -Werte)	0.5	1.6	2.5	2.7	2.7	2.2
Laser Doppler (Δ relative Einheiten)	14	23	60	137	149	110

Zusammenfassend haben diese Versuche ergeben, dass ein Wellenlängenbereich zwischen 290 nm und 350 nm die UV-induzierte COX-2 Expression auslöst. Dabei hat sich der UVA2 Bereich (320 bis 350 nm) mit einem Anteil von ungefähr 60% als sehr bedeutend für die COX-2 Induktion herausgestellt. Vor dem Hintergrund, dass (i) die vollständige Hemmung der COX-Aktivität das UV-Erythem nicht vollständig unterdrücken kann und (ii) das UVB-

Licht ungefähr 1000mal stärker erythematogen wirkt als das UVA-Licht, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Prostaglandine allein für die Ausbildung eines Erythems verantwortlich sind. Viele Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenhanges zwischen der Ausbildung eines UV-Erythems und der Bildung UVB-bedingter Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere und (6-4)-Photoaddukte zeigen die große Bedeutung dieser DNA-Schäden und könnten die starke erythemato gene Wirkung des UVB-Lichtes erklären. Dennoch haben klinische Studien gezeigt, dass die alleinige Hemmung der Prostaglandinsynthese durch NSAIDs eine signifikante Reduktion des UV-Erythems bewirkt, so dass die Modulation der COX-2 Expression nach wie vor ein sehr vielversprechender Angriffspunkt zur Vorbeugung und Behandlung eines Sonnenbrandes darstellt. Offensichtlich hat die COX-2 Expression eher eine verstärkende/unterstützende Wirkung beim UV-Erythem, ist jedoch allein für die Entstehung eines UV-Erythems nicht ausreichend.

4.3 Reaktive Sauerstoffspezies und COX-2 Expression

Einerseits konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von UVA-Licht im Kulturmedium der EpiDerm-Modelle Wasserstoffperoxid entsteht. Andererseits führte die Zugabe von Wasserstoffperoxid in das Zellkulturmedium, das in seiner Endkonzentration das 25fache dessen übersteigt, das UV-vermittelt im Medium entsteht, zu keiner gesteigerten COX-2 Expression. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die extrazelluläre, mediumbedingte UV-induzierte Wasserstoffperoxidbildung keinen Einfluss auf die Cyclooxygenase-2 Expression im EpiDerm-Modell hat. Dass Wasserstoffperoxid trotzdem eine Rolle in der UV-bedingten COX-2 Expression spielt, kann damit nicht ausgeschlossen werden, da diese Untersuchungen keine Aussagen über (i) die intrazelluläre Wasserstoffperoxidkonzentration und (ii) den Einfluss des intrazellulär gebildeten Wasserstoffperoxids auf die COX-2 Expression erlauben. Dass intrazellulär UVA-induziert Wasserstoffperoxid entsteht und als Auslöser oxidativer Schäden wirkt, ist beschrieben worden [PETERSEN *et al.*, 2000]. Darüber hinaus ist nicht auszuschließen, dass auch andere, durch UV-Licht induzierten ROS, wie z.B. Singulett-Sauerstoff eine wesentliche Rolle in der UV-induzierten COX-2 Expression spielen.

Der Einsatz wasserlöslicher Antioxidantien untermauerte die Vermutung, dass reaktive Sauerstoffspezies an der UV-induzierten COX-2 Expression ursächlich beteiligt sein könnten (Abbildung 3-13). α -Glucosylrutin (AGR) ist ein Flavonoid, das bereits als ein sehr effektiver

Radikalfänger evaluiert wurde [STÄB *et al.*, 2000]. Im EpiDerm-Modell zeigte das AGR in Abhängigkeit von seiner Konzentration eine Minderung der UV-induzierten COX-2 Expression. Dabei konnte die UVA-induzierte COX-2 Expression vollkommen auf das Kontrollniveau reduziert werden, wohingegen die SSL-induzierte COX-2 Expression um ca. 55% reduziert wurde. In der höchsten Konzentration (400 μM) zeigte das AGR keine Veränderungen hinsichtlich der JNK-Aktivierung, wie es zu erwarten gewesen wäre, da Inhibitorstudien zeigten, dass die Aktivität der JNK die UVA-induzierte COX-2 Expression vermittelt. Daneben konnte das AGR (400 μM) jedoch sowohl die UV-bedingte Aktivierung der ERK1/2 als auch die der p38^{MAPK} reduzieren, worin die protektive Wirkung des AGR in der SSL-vermittelten COX-2 Expression zu liegen scheint. Unter dem Einfluss von Vitamin C führte das UVA-Licht zur gesteigerten COX-2 Expression. Untersuchungen zur UV-bedingten Aktivierung der stress-aktivierten Proteinkinasen zeigen, dass es unter dem Einfluss von Vitamin C zu einer Erhöhung der p38 und JNK Aktivierung kommt. Die ERK1/2 MAP-Kinasen zeigen unter dem Einfluss des Vitamin C kein verändertes, UV-induziertes Aktivierungsmuster. Dies entspricht Untersuchungen, die zeigen, dass Vitamin C alleine unter der Einwirkung von UV-Licht prooxidativ wirken kann [TROMMER *et al.*, 2002]. Hierbei spielt die Wahl der Konzentration jedoch eine entscheidende Rolle. Die Wahl der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vitamin C Konzentration (300 μM) erfolgte mit Blick auf laborinterne Daten, die in einem anderen Zellsystem und unter anderen experimentellen Bedingungen, u.a. 16 Stunden Inkubationszeit, antioxidative Effekte zeigte. Wesentlicher Unterschied zu den hier gezeigten Daten ist, dass in der vorliegenden Arbeit die Inkubationsdauer lediglich 1 Stunde betrug. Aufgrund der Instabilität von Vitamin C unter Zellkulturbedingungen dürfte die effektive Konzentration im vorliegenden Fall deutlich höher sein, als in dem zuvor genannten Experiment. Aus der Literatur ist zudem bekannt, dass das Vitamin C in dieser Konzentration (300 μM , 50 mg/l) in humanen Fibroblasten sowohl die UVB-vermittelte Freisetzung von Superoxidanionen als auch die Aktivität der Katalase verstärkt. Die alleinige Zugabe des Vitamin C ohne UV-Exposition führte in dieser Konzentration einerseits zur Aktivierung der Superoxiddismutase und andererseits zur Anhebung des Glutathiongehaltes auf ein Maß, wie es ohne Zugabe von Vitamin C, aber nach UV-Exposition beobachtet wird [JONES *et al.*, 1999]. In diesem Zusammenhang ist nicht auszuschließen, dass die hier gewählten Zellkulturbedingungen bei einer Vitamin C Konzentration von 300 μM , insbesondere in Kombination mit UV-Bestrahlung, eher zu prooxidativen Ereignissen und einer gesteigerten COX-2 Expression führen. Ein ähnlicher Effekt wurde bereits bei der höchst verwendeten Konzentrationen des β -Carotin beobachtet

(Abbildung 3-14). Demnach sollte die Austestung weiterer, niedrigerer Vitamin C Konzentrationen hier Aufschluss bringen und positive Effekte auch für Vitamin C aufzeigen können.

In Übereinstimmung mit Untersuchungen an epithelialen Leberzellen führt auch im EpiDerm-Modell die Zugabe des relativ stabilen Lipidperoxidationsproduktes 4-Hydroxynonenal (4-HNE) zur gesteigerten COX-2 Expression, die durch Zugabe des p38^{MAPK}-Inhibitors SB203580 inhibierbar ist [KUMAGAI *et al.*, 2002]. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die UV-vermittelte Lipidperoxidation ungesättigter Fettsäuren mit der nachfolgenden Entstehung des 4-Hydroxynonenals und der resultierenden Aktivierung der p38^{MAPK} auch als Auslöser der SSL-induzierten COX-2 Expression fungieren könnte, denn einerseits konnte gezeigt werden, dass die 4-HNE-Protein Addukte im EpiDerm-Modell eine Stunde nach SSL-Exposition um 30% ansteigen und andererseits konnten Inhibitorstudien herausstellen, dass die Aktivität der p38^{MAPK} die SSL-induzierte COX-2 Expression vermittelt.

Keines der verwendeten lipidlöslichen Antioxidantien zeigte eine signifikante Reduktion der SSL-induzierten COX-2 Expression, im Gegenteil führte die Zugabe von β -Carotin in einer Konzentration von 46 μ M sogar zu einer gesteigerten COX-2 Expression in Folge der UV-Exposition (Abbildung 3-14). Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen von JONES *et al.* (1999), die zeigen konnten, dass das β -Carotin in höheren Konzentrationen (54 mg/l, 100 μ M) auf humane Fibroblasten zytotoxisch wirkt und darüber hinaus aber auch in geringeren Konzentrationen (10 μ M und 1 μ M) bereits die UVB-bedingte Freisetzung von Superoxidanionen verstärkt [JONES *et al.*, 1999]. Das Vitamin E und das β -Carotin (23 μ M) reduzieren in gleicher Weise leicht die Aktivierung der p38^{MAPK}. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass sowohl das β -Carotin als auch das Vitamin E die 4-HNE induzierte Aktivierung der p38^{MAPK} über die Reduktion der Lipidperoxidation leicht reduzieren, ein Effekt, der aufgrund mangelnder Regeneration des Vitamin E und β -Carotin durch Vitamin C [LEUNG *et al.*, 1981], nur andeutungsweise auftritt und daher auf der Ebene der SSL-induzierten COX-2 Expression nicht mehr zu erkennen ist. Eine klinische Studie belegte zudem, dass nur die orale Aufnahme einer Kombination aus Vitamin E und Vitamin C die Empfindlichkeit gegenüber dem UV-Licht, gemessen an der minimalen erythemalen Dosis (MED) erniedrigt, wohingegen Vitamin E und Vitamin C für sich keinen Effekt zeigen [FUCHS und KERN, 1998]. Der gleiche Hintergrund könnte auch dem Trolox zugrunde liegen,

das ebenfalls nach alleiniger Zugabe keinen Effekt auf die SSL-induzierte COX-2 Expression zeigt.

Nur das β -Carotin zeigt in Konzentrationen von 11 μM und 23 μM eine Verringerung der UVA-induzierten COX-2 Expression (Abbildung 3-14). Dieser protektive Effekt konnte jedoch nicht auf der Ebene der MAP-Kinasen im Sinne einer reduzierten Aktivierung der JNK beobachtet werden. Die ERK1/2 MAP-Kinasen wurden unter den untersuchten lipidlöslichen Antioxidantien (β -Carotin (23 μM) und Vitamin E) nur unter dem Einfluss von Vitamin E geringer aktiviert als unter dem alleinigen Einfluss seines Lösungsmittels.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen der Wirkung der Antioxidantien auf die UV-induzierte COX-2 Expression und auf die Modulation der UV-bedingten MAP-Kinase-Aktivierung, so ergibt sich nicht immer ein schlüssiges Bild. So zeigen die Antioxidantien, die die UVA-induzierte COX-2 Expression reduzieren (β -Carotin und AGR) keine Veränderungen hinsichtlich der JNK-Aktivierung, wie es zu erwarten gewesen wäre, da Inhibitorstudien zeigten, dass die Aktivität der JNK die UVA-induzierte COX-2 Expression vermittelt. Betrachtet man die Reduktion der SSL-induzierten COX-2 Expression durch AGR, so kann die stark minimierte Aktivierung der p38^{MAPK} unter dem Einfluss des AGR für diese Beobachtung verantwortlich gemacht werden, denn die Inhibitorstudien zeigten, dass sowohl die Aktivität der JNK als auch die der p38^{MAPK} die SSL-induzierte COX-2 Expression vermitteln. Wie lässt sich daher die protektive Wirkungsweise der Antioxidantien AGR (400 μM) und β -Carotin (23 μM) auf die UVA-induzierte COX-2 Expression erklären, wenn die Aktivierung der JNK unbeeinflusst bleibt? Zwei Parameter spielen in der Signaltransduktion eine wichtige Rolle, nämlich zum einen die Stärke der Aktivierung und zum anderen die Dauer der Aktivierung. Die Untersuchung der Aktivität der MAP-Kinasen zu einem einzigen Zeitpunkt (10-12 Minuten) nach UV-Exposition scheint daher für die Erklärung der Wirkungsweise beider genannter Antioxidantien als unzureichend. Ein Einzelexperiment hat z. B. gezeigt, dass die JNK-Aktivität unter dem Einfluss des AGR viel schneller wieder herunterreguliert wird, so dass eine verkürzte Periode der JNK-Aktivität eventuell die Wirkungsweise des AGR erklärt (Daten nicht gezeigt). Der gleiche Mechanismus könnte der Wirkung des β -Carotins in der UVA-induzierten COX-2 Expression zugrunde liegen.

Der Einsatz von Dimethylsulfoxid (DMSO, 1% (v/v)) als Lösungsmittelkontrolle in den Inhibitorstudien zeigte, dass die Induktionen der Cyclooxygenase-2 unter dem Einfluss von DMSO um 50% reduziert sind (Tabelle 3-2). Diese Beobachtungen geben außerdem einen Hinweis darauf, dass möglicherweise Hydroxylradikale, die unter anderem von DMSO wirksam abgefangen werden können, eine Rolle in der UV-induzierten COX-2 Expression spielen. Die Hydroxylradikale könnten über die Fenton-Reaktion aus intrazellulär entstandenem Wasserstoffperoxid generiert werden. Auf der Ebene der MAP-Kinasen zeigte sich, dass DMSO sowohl die UV-bedingte Aktivierung von JNK als auch der ERK1/2 reduziert.

Zusammenfassend haben die Untersuchungen des Einflusses der Antioxidantien auf (i) die UV-vermittelte COX-2 Expression und (ii) Aktivierung der Signalwege gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies und möglicherweise Lipidperoxidationsprodukte ursächlich an der UV-induzierten COX-2 Expression beteiligt sind und daher die Modulation der COX-2 Expression unter Verwendung verschiedener Antioxidantien als vielversprechend erscheint. Spielt tatsächlich die Lipidperoxidation eine Rolle, so ist der Einsatz kombinierter Antioxidantien, die ihre Regeneration im Recyclingsystem der Antioxidantien zulassen, essentiell. Ferner müssen Antioxidantien stets in einem optimalen Konzentrationsbereich eingesetzt werden, da bei höheren Konzentrationen unter Umständen auch prooxidative Ereignisse beobachtet werden können. Desweiteren erscheint die Erfassung des Aktivierungsmusters der MAP-Kinasen zu einem einzigen Zeitpunkt für die Erklärung der Wirksamkeit eingesetzter Antioxidantien als unzureichend. Hier sollte die Aktivität über einen längeren Zeitraum untersucht werden.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung physiologisch relevanter UV-Expositionen auf die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in künstlicher menschlicher Epidermis auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Sowohl die Bestrahlung mit simuliertem UV-Sonnenlicht (SSL) als auch mit UVA-Licht (320 bis 400 nm) konnte die Expression der COX-2 stimulieren, wohingegen der UVA1-Anteil des SSL (350 bis 400 nm) keinen Effekt zeigte. Parallel zur gesteigerten Expression der COX-2 fand sich eine vermehrte Produktion von Prostaglandin E₂. Der UVA2-Anteil (320 bis 350 nm) war für etwa 65% der SSL-induzierten COX-2 Expression verantwortlich.

Sowohl durch SSL- und UVA- als auch durch UVA1-Licht wurden die MAP-Kinasen p38^{MAPK}, JNK und ERK1/2 transient aktiviert. Versuche mit spezifischen Inhibitoren zeigten, dass zum einen die Aktivität der p38^{MAPK} und zum anderen auch die der JNK essentiell für die SSL-induzierte COX-2-Expression ist, wohingegen ausschließlich JNK die UVA-bedingte Expression der COX-2 vermittelt.

Als Mechanismus für die Aktivierung der gesamten Signalwege durch UV kommt die UV-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Betracht. So wurde in der vorliegenden Arbeit die Bildung von Wasserstoffperoxid durch UV-Exposition nachgewiesen. Dabei ist ausschließlich der UVA-Anteil des SSL für diese Reaktion verantwortlich. Es zeigte sich, dass Riboflavin als Photosensibilisator fungiert, der in Gegenwart von Tryptophan oder HEPES zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt.

Die hier gewonnenen Daten zur Induktion der Expression von COX-2 durch simuliertes Sonnenlicht und UVA-Licht eröffnen Möglichkeiten der Intervention mit dem auf erhöhte COX-2 Aktivität zurückzuführenden Anteil an der UV-induzierten Erythembildung. Neben der Hemmung von Signalkaskaden, die die Expression der COX-2 regulieren, kommen hierfür Antioxidantien in Frage, die als zelluläre Schutzmechanismen vor UV-Licht durch Abfangen gebildeter ROS die Aktivierung der Signalkaskaden entkoppeln können. Für einige Antioxidantien (β -Carotin, Vitamin C) zeigte sich, dass neben den experimentellen Versuchsbedingungen der eingesetzte Konzentrationsbereich entscheidend für positive (antioxidative) oder negative (prooxidative) Ereignisse in Hautzellen ist, wohingegen AGR durchweg positive Eigenschaften hinsichtlich einer Verminderung der COX-2-Induktion zeigte.

6. Literatur

Adachi, M., Gazel, A., Pintucci, G., Shuck, A., Shifteh, S., Ginsburg, D., Rao, L. S., Kaneko, T., Freedberg, I. M., Tamaki, K., Blumenberg, M.: "Specificity in stress response: epidermal keratinocytes exhibit specialized UV-responsive signal transduction pathways", *DNA Cell Biol.*, **22**, 665-677, 2003.

Appleby, S. B., Ristimaki, A., Neilson, K., Narko, K., Hla, T.: "Structure of the human cyclooxygenase-2 gene", *Biochem. J.*, **302**, 723-727, 1994.

Assefa, Z., Garmyn, M., Bouillon, R., Merlevede, W., Vandenheede, J. R., Agostinis, P.: "Differential stimulation of ERK and JNK activities by ultraviolet B irradiation and epidermal growth factor in human keratinocytes", *J. Invest. Dermatol.*, **108**, 886-891, 1997.

Atkins, P. W.: "Einführung in die Physikalische Chemie", 1.Auflage, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 118-120, 1993.

Bachelor, M. A., Silvers, A. L., Bowden, G. T.: "The role of p38 in UVA-induced cyclooxygenase-2 expression in the human keratinocyte cell line, HaCaT", *Oncogene*, **21**, 7092-7099, 2002.

Bachem, A.: "Time factors of erythema and pigmentation, produced by ultraviolet rays of different wavelenghts", *J. Invest. Dermatol.* **25**, 215-218, 1954.

Bain, J., Mc Lauchlan, H., Elliott, M., Cohen, P.: "The specificities of protein kinase inhibitors: an update", *Biochem. J.*, **371**, 199-204, 2003.

Berg, R. J., Ruven, H. J., Sands, A. T., de Gruijl, F. R., Mullenders, L. H.: "Defective global genome repair in XPC mice is associated with skin cancer susceptibility but not with sensitivity to UVB induced erythema and edema", *J. Invest. Dermatol.*, **110**, 405-409, 1998.

Black, A. K., Greaves, M. W., Hensby, C. N., Pazzaglia, A., Plummer, N.: "Proceedings: Increase in prostaglandin E2 and F2alpha in inflammatory exudate at 4-48 h after UVB irradiation of human skin", *Br. J. Dermatol.*, **95** Suppl 14, 21-22, 1976.

Black, A. K., Greaves, M. W., Hensby, C. N.: "The anti-inflammatory and pharmacological effects of topically applied flurbiprofen on human skin 24 hours after ultraviolet B irradiation", *Prostaglandins Med.*, **5**, 405-413, 1980.

Brenneisen, P., Sies, H., Scharffetter-Kochanek, K.: "Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events", *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **973**, 31-43, 2002.

Bruls, W. A., Slaper, H., van der Leun, J. C., Berrens, L.: "Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths", *Photochem. Photobiol.*, **40**, 485-494, 1984.

Buckman, S. Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, G., Anast, J., Masferrer, J., Pentland, A. P.: "COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer", *Carcinogenesis*, **19**, 723-729, 1998.

Bulteau, A. L., Moreau, M., Nizard, C., Friguet, B.: "Impairment of proteasome function upon UVA- and UVB-irradiation of human keratinocytes", *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 1157-1170, 2002.

Bustin, S. A.: "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays", *J. Mol. Endocrinol.*, **25**, 169-193, 2000.

Cadet, J., Anselmino, C., Douki, T., Voituriez, L.: "Photochemistry of nucleic acids in cells", *J. Photochem. Photobiol. B.*, **15**, 277-298, 1992.

Chandrasekharan, N. V., Dai, H., Roos, K. L., Evanson, N. K., Tomsik, J., Elton, T. S., Simmons, D. L.: "COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **99**, 13926-13931, 2002.

Chen, C. Y., Shyu, A. B.: "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation", *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 465-470, 1995.

Chen, C. Y., Gherzi, R., Andersen, J. S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H. D., Mann, M., Karin, M.:“Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation”, *Genes Dev.*, **14**, 1236-1248, 2000.

Chen, W., Tang, Q., Gonzales, M. S., Bowden, G. T.:“Role of p38 MAP kinases and ERK in mediating ultraviolet-B induced cyclooxygenase-2 gene expression in human keratinocytes”, *Oncogene*, **20**, 3921-3926, 2001.

Chouinard, N., Valerie, K., Rouabhia, M., Huot, J.:“UVB-mediated activation of p38 mitogen-activated protein kinase enhances resistance of normal human keratinocytes to apoptosis by stabilizing cytoplasmic p53”, *Biochem. J.*, **365**, 133-145, 2002.

Chuong, C. M., Nickoloff, B. J., Elias, P. M., Goldsmith, L. A., Macher, E., Maderson, P. A., Sundberg, J. P., Tagami, H., Plonka, P. M., Thestrup-Pedersen, K., Bernard, B. A., Schröder, J. M., Dotto, P., Chang, C. H., Williams, M. L., Feingold, K. R., King, L. E., Kligman, A. M., Rees, J. L. and Christophers, E.:“What is the „true“ function of skin?“, *Exp. Dermatol.*, **11**, 159-187, 2002.

Cohen, D., DeLeo, V. A.:“Ultraviolet radiation-induced phospholipase A2 activation occurs in mammalian cell membrane preparations“, *Photochem. Photobiol.*, **57**, 383-90, 1993.

Cooper, T. G.:“Elektrophorese”, In: Cooper, T. G., *Biochemische Arbeitsmethoden*, Walter de Gruyter, Berlin, 179-221, 1980.

Crofford, L. J.:“ COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions”, *J. Rheumatol.*, **24**, 15-19, 1997.

De Boer, J., Hoeijmakers, J. H.:“Nucleotide excision repair and human syndromes”, *Carcinogenesis.*, **21**, 453-460, 2000.

Dixon, D. A., Kaplan, C. D., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M.:“Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region”, *J. Biol. Chem.*, **275**, 11750-11757, 2000.

Dixon, D. A., Tolley, N. D., King, P. H., Nabors, L. B., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M.: "Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells", *J. Clin. Invest.*, **108**, 1657-1665, 2001.

Douki, T., Perdiz, D., Grof, P., Kuluncsics, Z., Mustacchi, E., Cadet, J., Sage, E.: "Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role", *Photochem. Photobiol.*, **70**, 184-190, 1999.

Eckert, R.: "Tierphysiologie", 2. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 233-234, 1993.

Eichler, J. und Seiler, T.: "Lasertechnik in der Medizin: Grundlagen, System, Anwendungen", Springer Verlag Berlin, 1991.

Elias, P. M.: "Epidermal lipids, barrier function, and desquamation", *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 44s-49s, 1983.

Elstner, E. F.: "Der Sauerstoff, Biochemie, Biologie, Medizin", BI-Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich, 1990.

Finkel, P.: "Lichtschutzmittel", In: Kosmetik, Umbach, W. (Hrsg.), 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, 147-164, 1995.

Flower, R. J., Harvey, E. A., Kingston, W. P.: "Inflammatory effects of prostaglandin D2 in rat and human skin", *Br. J. Pharmacol.*, **56**, 229-233, 1976.

Förster, V. T.: "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz"; *Ann. Physiscs (Leipzig)*, **2**, 55-75, 1948.

Freeman, S. E., Gange, R. W., Matzinger, E. A., Sutherland, B. M.: "Higher pyrimidine dimer yields in skin of normal humans with higher UVB sensitivity", *J. Invest. Dermatol.*, **86**, 34-6, 1986.

Freeman, S. E., Hacham, H., Gange, R. W., Maytum, D. J., Sutherland, J. C., Sutherland, B. M.: "Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **86**, 5605-5609, 1989.

Fritsch, P.: "Dermatologie und Venerologie: Lehrbuch und Atlas", Springer Verlag Berlin, 1998.

Fuchs, J., Kern, H.: "Modulation of UV-light-induced skin inflammation by D-alpha-tocopherol and L-ascorbic acid: a clinical study using solar simulated radiation", *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 1006-1012, 1998.

Garavito, R. M., Mulichak, A. M.: "The structure of mammalian cyclooxygenases", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 183-206, 2003.

Giandomenico, A. R., Cerniglia, G. E., Biaglow, J. E., Stevens, C. W., Koch, C. J.: "The importance of sodium pyruvate in assessing damage produced by hydrogen peroxide", *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 426-434, 1997.

Giardiello, F. M., Hamilton, S. R., Krush, A. J., Piantadosi, S., Hyland, L. M., Celano, P., Booker, S. V., Robinson, C. R., Offerhaus, G. J.: "Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis", *N. Engl. J. Med.*, **328**, 1313-1316, 1993.

Gilchrest, B. A., Soter, N. A., Stoff, J. S. and Mihm, M. C.: "The human sunburn reaction: Histologic and biochemical studies", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **5**, 411-422, 1981.

Gilchrest, B. A., Soter, N. A., Hawk, J. L., Barr, R. M., Black, A. K., Hensby, C. N., Mallet, A. I., Greaves, M. W., Parrish, J. A.: "Histologic changes associated with ultraviolet A-induced erythema in normal human skin", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **9**, 213-219, 1983.

Grzelak, A., Rychlik, B., Bartosz, G.: "Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media", *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 1418-1425, 2001.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.: "Free radicals in biology and medicine", Clarendon Press Oxford, 1985.

Hawk, J. L., Black, A. K., Jaenicke, K. F., Barr, R. M., Soter, N. A., Mallett, A. I., Gilchrest, B. A., Hensby, C. N., Parrish, J. A., Greaves, M. W.: "Increased concentrations of arachidonic acid, prostaglandins E2, D2, and 6-oxo-F1 alpha, and histamine in human skin following UVA irradiation", *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 496-499, 1983.

Hawk, J. L. M., Parrish, J. A.: "Responses of normal skin to ultraviolet radiation". In: Parrish, J. A., Kriple, M. L., Morrison, W. L. (eds.), *Photoimmunology*, Plenum Medical Books, New York, 219-260, 1983.

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J. and Williams, P. M.: "Real time quantitative PCR", *Genome Res.*, **6**, 986-994, 1996.

Higashi, Y., Kanekura, T., Kanzaki, T.: "Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression", *Int. J. Cancer.*, **86**, 667-671, 2000.

Hinz, B., Brune, K.: "Cyclooxygenase-2--10 years later", *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **300**, 367-375, 2002.

Hla, T., Neilson, K.: "Human cyclooxygenase-2 cDNA", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **89**, 7384-7388, 1992.

Isoherranen, K., Punnonen, K., Jansen, C., Uotila, P.: "Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes", *Br. J. Dermatol.*, **140**, 1017-1022, 1999.

Jones, S. A., McArdle, F., Jack, C. I., Jackson, M. J.: "Effect of antioxidant supplementation on the adaptive response of human skin fibroblasts to UV-induced oxidative stress", *Redox Rep.*, **4**, 291-299, 1999.

Jurkiewicz, B. A., Buettner, G. R.: "Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study", *Photochem. Photobiol.*, **59**, 1-4, 1994.

Katiyar, S. K., Matsui, M. S., Elmets, C. A., Mukhtar, H.: "Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin", *Photochem. Photobiol.*, **69**, 148-153, 1999.

Katiyar, S. K., Perez, A., Mukhtar, H.: "Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light B-induced pyrimidine dimers in DNA", *Clin. Cancer Res.*, **6**, 3864-9, 2000.

Katiyar, S. K., Afaq, F., Perez, A., Mukhtar, H.: "Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress", *Carcinogenesis.*, **22**, 287-294, 2001.

Kielbassa, C., Roza, L., Epe, B.: "Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light", *Carcinogenesis*, **18**, 811-816, 1997.

Kirsch, M., Lomonosova, E. E., Korth, H. G., Sustmann, R., de Groot, H.: "Hydrogen peroxide formation by reaction of peroxyxynitrite with HEPES and related tertiary amines. Implications for a general mechanism", *J. Biol. Chem.*, **273**, 12716-12724, 1998.

Klotz, L.-O., Pellieux, C., Briviba, K., Pierlot, C., Aubry, J. M., Sies, H.: "Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA", *Eur. J. Biochem.*, **260**, 917-922, 1999.

Klotz, L.O., Holbrook, N. J., Sies, H.: "UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signalling events", *Curr. Probl. Dermatol.*, **29**, 95-113, 2001.

Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Uchida, K.: "Role of p38 mitogen-activated protein kinase in the 4-hydroxy-2-nonenal-induced cyclooxygenase-2 expression", *Arch. Biochem. Biophys.*, **397**, 240-245, 2002.

Kumakiri, M., Hashimoto, K., Willis, I.: "Biologic changes due to long-wave ultraviolet irradiation on human skin: ultrastructural study", *J. Invest. Dermatol.*, **69**, 392-400, 1977.

Laemmli, U. K.: "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature*, **227**, 680-685, 1970.

Lakowicz, J. R.: "Energy Transfer", In: Principles of Fluorescent Spectroscopy, Plenum Press, New York, USA, 303-339, 1983.

Leccia, M. T., Yaar, M., Allen, N., Gleason, M., Gilchrest, B. A.: "Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts", *Exp. Dermatol.*, **10**, 272-279, 2001.

Lee, L. G., Connel, C. R. and Bloch, W.: "Allelic discrimination by nicktranslation PCR with fluorogenic probes", *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3761-3766, 1993.

Leonhardt, H.: "Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen", 8. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1990.

Leung, H. W., Vang, M. J., Mavis, R. D.: "The cooperative interaction between vitamin E and vitamin C in suppression of peroxidation of membrane phospholipids", *Biochim. Biophys. Acta.*, **664**, 266-272, 1981.

Liu, X. H., Yao, S., Kirschenbaum, A., Levine, A. C.: "NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells", *Cancer Res.*, **58**, 4245-4249, 1998.

Longo, M. C.; Berninger, M. S. and Hartley, J. L.: "Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions", *Gene*, **93**, 125-128, 1990.

Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., Browner, M. F.: "Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2.", *Nature Struct. Biol.*, **3**, 927-933, 1996.

Mahns, A., Melchheier, I., Suschek, C. V., Sies, H. and Klotz, L.-O.: "Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide", *Free Rad. Res.*, **37**, 391-397, 2003.

Masaki, H., Atsumi, T., Sakurai, H.: "Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 474-479, 1995.

Mazière, C., Conte, M. A., Leborgne, L., Levade, T., Hornebeck, W., Santus, R., Mazière, J. C.:“UVA radiation stimulates ceramide production: relationship to oxidative stress and potential role in ERK, JNK, and p38 activation“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 289-294, 2001.

Meewes, C., Brenneisen, P., Wenk, J., Kuhr, L., Ma, W., Alikoski, J., Poswig, A., Krieg, T., Scharffetter-Kochanek, K.:“Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity“, *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 238-247, 2001.

Mikkelsen, R. B., Wardman, P.:“Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms“, *Oncogene.*, **22**, 5734-5754, 2003.

Mitchell, D. L., Haipek, C. A., Clarkson, J. M.:“(6-4)Photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane pyrimidine dimmers“, *Mutat. Res.*, **143**, 109-12, 1985.

Mitchell, D. L.:“The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells“, *Photochem. Photobiol.*, **48**, 51-57, 1988.

Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O.:“Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes“, *J. Biol. Chem.*, **251**, 2629-2636, 1976.

Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B. A., Morrison, A. R., Lefkowitz, J. B.:“Arachidonic acid metabolism“, *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 69-102, 1986.

Neufang, G., Fürstenberger, G., Heidt, M., Marks, F., Müller-Decker, K.:“Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin“, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **98**, 7629-7634, 2001.

Nohl, H., Jordan, W.:“The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide“, *Eur. J. Biochem.*, **111**, 203-210, 1980.

O'Banion, M. K., Winn, V. D., Young, D. A.: "cDNA cloning and functional activity of a glucocorticoid-regulated inflammatory cyclooxygenase", *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **89**, 4888-4892, 1992.

Oehlmann, R.: "Primer Express™ Manual, Version 2.0", PE Applied Biosystems (Weiterstadt), 1997.

Papadopoulos, N. G., Dedoussis, G. V. Z., Spanakos, G., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N. and Papamichail, M.: "An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry", *J. Immunol. Methods*, **177**, 101-111, 1994.

Petersen, A. B., Gniadecki, R., Vicanova, J., Thorn, T., Wulf, H. C.: "Hydrogen peroxide is responsible for UVA-induced DNA damage measured by alkaline comet assay in HaCaT keratinocytes", *J. Photochem. Photobiol. B.*, **59**, 123-131, 2000.

Peus, D., Vasa, R. A., Beyerle, A., Meves, A., Krautmacher, C., Pittelkow, M. R.: "UVB activates ERK1/2 and p38 signaling pathways via reactive oxygen species in cultured keratinocytes", *J. Invest. Dermatol.*, **112**, 751-756, 1999.

Ploegh, H.L.: "Post-translational modification: phosphorylation and phosphatases", In: Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L., Speicher, D. W. and Wingfield, P. T. (eds.), *Current protocols in protein science*, John Wiley & Sons, Inc., USA, Chapter 13, 1995.

Podda, M., Traber, M. G., Weber, C., Yan, L. J., Packer, L.: "UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin", *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 55-65, 1998.

Poswig, A., Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Hommel, C., Quel, G., Faisst, K., Dissemond, J., Briviba, K., Krieg, T., Scharffetter-Kochanek, K.: "Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation", *J. Invest. Dermatol.*, **112**, 13-18, 1999.

Puntarulo, S., Cederbaum, A. I.: "Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes", *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1324-1330, 1998.

Reunanen, N., Li, S. P., Ahonen, M., Foschi, M., Han, J., Kahari, V. M.: "Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization", *J. Biol. Chem.*, **277**, 32360-32368, 2002.

Rochette, P. J., Therrien, J. P., Drouin, R., Perdiz, D., Bastien, N., Drobetsky, E. A., Sage, E.: "UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells", *Nucleic. Acids Res.*, **31**, 2786-2794, 2003.

Rosenstein, B. S. and Mitchell, D. L.: "Action spectra for the induction of pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts", *Photochem. Photobiol.*, **45**, 775-780, 1987.

Rousseau, S., Morrice, N., Peggie, M., Campbell, D. G., Gaestel, M., Cohen, P.: "Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs", *EMBO J.*, **21**, 6505-6514, 2002.

Ruzicka, T., Printz, M. P.: "Arachidonic acid metabolism in skin: a review", *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **100**, 121-160, 1984.

Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F. A., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. und Arnheim, N.: "Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia", *Science*, **230**, 1350-1354, 1985.

Salahudeen, A. K., Clark, E. C., Nath, K. A.: "Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo", *J. Clin. Invest.*, **88**, 1886-1893, 1991.

Sato, K., Taguchi, H., Maeda, T., Minami, H., Asada, Y., Watanabe, Y., Yoshikawa, K.: "The primary cytotoxicity in ultraviolet-a-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide", *J. Invest. Dermatol.*, **105**, 608-612, 1995.

Schroer, K., Zhu, Y., Saunders, M. A., Deng, W. G., Xu, X. M., Meyer-Kirchrath, J., Wu, K. K.: "Obligatory role of cyclic adenosine monophosphate response element in cyclooxygenase-2 promoter induction and feedback regulation by inflammatory mediators", *Circulation*, **105**, 2760-2765, 2002.

Schul, W., Jans, J., Rijksen, Y. M., Klemann, K. H., Eker, A. P., de Wit, J., Nikaido, O., Nakajima, S., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H., van der Horst, G. T.: "Enhanced repair of cyclobutane pyrimidine dimers and improved UV resistance in photolyase transgenic mice", *EMBO J.*, **21**, 4719-4729, 2002.

Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Tzeng, B., Aziz, T., Nguyen, L., Packer, L.: "Recovery of antioxidants and reduction in lipid hydroperoxides in murine epidermis and dermis after acute ultraviolet radiation exposure", *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **10**, 183-191, 1994.

Sies, H.: "Oxidative stress: Introductory remarks". In: Sies, H. (ed), *Oxidative stress.*, Academic Press, London, 1-8, 1985.

Simon, L. S.: "Actions and toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs", *Curr. Opin. Rheumatol.*, **8**, 169-175, 1996.

Singh, R. P., Agarwal, R.: "Flavonoid antioxidant silymarin and skin cancer", *Antioxid. Redox Signal.*, **4**, 655-663, 2002.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C.: "Measurement of protein using bicinchoninic acid", *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85, 1985.

Snyder, D. S.: "Cutaneous effects of topical indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis, on UV-damaged skin", *J. Invest. Dermatol.*, **64**, 322-325, 1975.

Soter, N. A.: "Acute effects of ultraviolet radiation on the skin", *Semin. Dermatol.*, **9**, 11-15, 1990.

Spornitz, U.:“Anatomie und Physiologie: Lehrbuch und Atlas für die Fachberufe im Gesundheitswesen“, 2. Auflage, Springer Verlag Berlin, 1996.

Stäb, F., Wolber, R., Blatt, T., Keyhani, R., Sauermann, G.:“Topically applied antioxidants in skin protection”, *Methods Enzymol.*, **319**, 465-478, 2000.

Stege, H., Roza, L., Vink, A. A., Grewe, M., Ruzicka, T., Grether-Beck, S., Krutmann, J.:“Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in ultraviolet-B-irradiated human skin”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **97**, 1790-1795, 2000.

Stenn, K. S., Link, R., Moellmann, G., Madri, J. and Kuklinska, E.:“Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase“, *J. Invest. Dermatol.*, **93**, 287-290, 1989.

Stewart, M. S., Cameron, G. S., Pence, B. C.:“Antioxidant nutrients protect against UVB-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture”, *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 1086-1089, 1996.

Stryer, L.:“Biochemie“, 4.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 743-744, 1995.

Tang, Q., Chen, W., Gonzales, M. S., Finch, J., Inoue, H., Bowden, G. T.:“Role of cyclic AMP responsive element in the UVB induction of cyclooxygenase-2 transcription in human keratinocytes”, *Oncogene*, **20**, 5164-5172, 2001.

Thiele, J. J., Traber, M. G., Packer, L.:“Depletion of human stratum corneum vitamin E: an early and sensitive in vivo marker of UV induced photo-oxidation”, *J. Invest. Dermatol.*, **110**, 756-761, 1998.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.:“Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications”, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354, 1979.

Tripp, C. S., Blomme, E. A., Chinn, K. S., Hardy, M. M., LaCelle, P., Pentland, A. P.: "Epidermal COX-2 induction following ultraviolet irradiation: suggested mechanism for the role of COX-2 inhibition in photoprotection", *J. Invest. Dermatol.*, **121**, 853-861, 2003.

Trommer, H., Bottcher, R., Poppl, A., Hoentsch, J., Wartewig, S., Neubert, R. H.: "Role of ascorbic acid in stratum corneum lipid models exposed to UV irradiation", *Pharm. Res.*, **19**, 982-990, 2002.

Tyrrell, R. M., Pidoux, M.: "Endogenous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near-visible radiations", *Photochem. Photobiol.*, **44**, 561-564, 1986.

Tyrrell, R.M., Pidoux, M.: "Correlation between endogenous glutathione content and sensitivity of cultured human skin cells to radiation at defined wavelengths in the solar ultraviolet range", *Photochem. Photobiol.*, **47**, 405-412, 1988.

Ueda, M., Matsunaga, T., Bito, T., Nikaido, O., Ichihashi, M.: "Higher cyclobutane pyrimidine dimer and (6-4) photoproduct yields in epidermis of normal humans with increased sensitivity to ultraviolet B radiation", *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, **12**, 22-26, 1996.

Vadas, P., Wasi, S., Movat, H. Z., Hay, J. B.: "Extracellular phospholipase A2 mediates inflammatory hyperaemia", *Nature*, **293**, 583-585, 1981.

Vane, J. R.: "Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs", *Nat. New Biol*, **231**, 232-235, 1971.

Vane, J. R., Bakhle, Y. S., Botting, R. M.: "Cyclooxygenases 1 and 2", *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 97-120, 1998.

Wang, R. J., Nixon, B. R.: "Identification of hydrogen peroxide as a photoproduct toxic to human cells in tissue-culture medium irradiated with "daylight" fluorescent light", *In Vitro.*, **14**, 715-722, 1978.

Warin, A. P.: "The ultraviolet erythemas in man", *Br. J. Dermatol.*, **98**, 473-477, 1978.

Wenk, J., Brenneisen, P., Meewes, C., Wlaschek, M., Peters, T., Blaudschun, R., Ma, W., Kuhr, L., Schneider, L., Scharffetter-Kochanek, K.: "UV-induced oxidative stress and photoaging", *Curr. Probl. Dermatol.*, **29**, 83-94, 2001.

Willis, I., Cylus, L.: "UVA erythema in skin: is it a sunburn?", *J. Invest. Dermatol.*, **68**, 128-129, 1977.

Yokoyama, C., Tanabe, T.: "Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 888-894, 1989.

Yoshimura, A., Ohno, T.: "Lumiflavin-sensitized photooxygenation of indole", *Photochem. Photobiol.*, **48**, 561-565, 1988.

Young, A. R., Chadwick, C. A., Harrison, G. I., Nikaido, O., Ramsden, J., Potten, C. S.: "The similarity of action spectra for thymine dimers in human epidermis and erythema suggests that DNA is the chromophore for erythema", *J. Invest. Dermatol.*, **111**, 982-988, 1998.

Young, A. R., Sheehan, J. M., Chadwick, C. A., Potten, C. S.: "Protection by ultraviolet A and B sunscreens against in situ dipyrimidine photolesions in human epidermis is comparable to protection against sunburn", *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 37-41, 2000.

Zhang, X., Rosenstein, B. S., Wang, Y., Lebwohl, M., Wie, H.: "Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage", *Free Radic. Biol. Med.*, **23**, 980-985, 1997.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	„activating-protein 1“
APS	Ammoniumpersulfat
ATF	„activating transcription factor“
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CREB	„cAMP response-element-binding-protein“
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle Medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen Glycol-bis(β -Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
FAM	6-Carboxyfluorescein
g	gramm oder Gravitationskonstante der Erde
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
HRP	Meerrettich Peroxidase
Ile	Isoleucin
J	Joule
kb	kilo-Basenpaare
kDa	kilo-Dalton
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„messenger“-RNA

NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
PG	Prostaglandin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rRNA	ribosomale RNA
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
U	unit (Einheit der Enzymaktivität)
Val	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

7.2 Sequenzen

Tab. 7-1: Dargestellt ist die cDNA-Sequenz der humanen Cyclooxygenase-2 (M90100). Die Übergänge zweier aufeinanderfolgender Exon-Sequenzen wurden eingerahmt. Kursiv dargestellt ist die Sequenz des Signalpeptids und in fett sind die Sequenzen markiert, die mit den eingesetzten Primern bzw. der Sonde hybridisieren.

```

60  gtccaggaac tcctcagcag cgctccttc agctccacag ccagacgccc tcagacagca
120 aagcctaccc ccgcgcgcgc cctgcccgc cgctgcgatg ctgccccgcg cctgtctgct
180 gtgcgcggtc ctggcgctca gccatacagc aaatccttgc tgttcccacc catgtcaaaa
240 ccgaggtgta tgtatgagtg tgggatttga ccagtataag tgcgattgta cccggacagg
300 attctatgga gaaaactgct caacaccgga atttttgaca agaataaaaat tatttctgaa
360 accactcca aacacagtgc actacatact taccacttcc aagggatttt ggaacgttgt
420 gaataacatt cccttccttc gaaatgcaat tatgagttat gtgttgacat cagatcaca
480 tttgattgac agtccaccaa cttacaatgc tgactatggc taaaaagct gggaaagcctt
540 ctctaacctc tcctattata ctagagccct tcctcctgtg cctgatgatt gcccgactcc
600 cttgggtgtc aaggtaaaa agcagcttcc tgattcaaat gagattgtgg gaaaattgct
660 tctaagaaga aagttcatcc ctgatcccca gggctcaaac atgatgtttg cattctttgc
720 ccagcacttc acgcatcagt ttttcaagac agatcataag cgagggccag ctttcaccaa
780 cgggctgggc catgggtgg acttaaatca tatttacggt gaaactctgg ctgacagcgc
840 taaactgcgc cttttcaagg atggaaaaat gaaatatcag ataattgatg gagagatgta
900 tcctcccaca gtcaaagata ctcaggcaga gatgatctac cctcctcaag tccctgagca
960 tctacggttt gctgtggggc aggaggtctt tggctctggtg cctggctga tgatgatgc
1020 cacaatctgg ctgagggaac acaacagagt atgcgatgtg cttaaacagg agcatcctga
1080 atggggtgat gagcagttgt tccagacaag caggctaata ctgataggag agactattaa
1140 gattgtgatt gaagattatg tgcaacactt gagtggctat cacttcaaac tgaaatttga
1200 ccagaacta cttttcaaca aacaattcca gtaccaaaat cgtattgctg ctgaatttaa
1260 caccctctat cactggcatc cccttctgcc tgacaccttt caaattcatg accagaaata
1320 caactatcaa cagtttatct acaacaactc tatattgctg gaacatggaa ttaccagtt
1380 tgttgaatca ttcaccaggc aaattgctgg cagggttgct ggtggtagga atgttcacc

```

7. Anhang

cgcagtacag aaagtatcac aggcttccat tgaccagagc aggcagatga aataccagtc
1440 ttttaatgag taccgcaaac gctttatgct gaagccctat gaatcatttg aagaactta^c
1500 ^{aggag}aaaag gaaatgtctg cagagttgga agcactctat ggtgacatcg atgctgtgga
1560 gctgtatcct gcccttctgg tagaaaagcc tcggccagat gccatctttg gtgaaacat
1620 ggtagaagtt ggagcaccat tctccttgaa aggacttatg ggtaatgta tatgttctcc
1680 tgcctactgg aagccaagca cttttggtgg agaagtgggt tttcaaatca tcaacactgc
1740 ctcaattcag tctctcatct gcaataacgt gaagggctgt ccctttactt cattcagtgt
1800 tccagatcca gagctcatta aaacagtcac catcaatgca agttcttccc gctccggact
1860 agatgatata aatcccacag tactactaaa agaacgttcg actgaactgt agaagtctaa
1920 tgatcatatt tattttattta tatgaacat gtctattaat ttaattattt aataatattt
1980 atattaaact ccttatgtta cttaacatct tctgtaacag aagtcagtac tctgtttgcy
2040 gagaaaggag tcataacttgt gaagactttt atgtcactac tctaaagatt ttgctgttgc
2100 tgtaagttt ggaaaacagt ttttattctg ttttataaac cagagagaaa tgagttttga
2160 cgtcttttta cttgaatttc aacttatatt ataaggacga aagtaaagat gtttgaatac
2220 ttaaactacta tcacaagatg ccaaaatgct gaaagttttt aactgtcga tgtttccaat
2280 gcatcttcca tgatgcatta gaagtaacta atgtttgaaa ttttaaagta cttttgggta
2340 tttttctgtc atcaaacaaa acaggtatca gtgcattatt aaatgaatat ttaaattaga
2400 cattaccagt aatttcatgt ctacttttta aaatcagcaa tgaacaata atttgaaatt
2460 tctaaattca tagggtagaa tcacctgtaa aagcttgttt gatttcttaa agttattaaa
2520 cttgtacata taccaaaaag aagctgtctt ggatttaaatt ctgtaaaatc agatgaaatt
2580 ttactacaat tgcttgtaa aatattttat aagtgatggt cctttttcac caagagtata
2640 aaccttttta gtgtgactgt taaaacttcc ttttaaatac aaatgccaaa tttattaagg
2700 tgggtggagcc actgcagtgt tatctcaaaa taagaatata ctggtgagat attccagaat
2760 ctgtttatat ggctggtaac atgtaaaaac ccataaccc cgccaaaagg ggtcctaccc
2820 ttgaacataa agcaataacc aaaggagaaa agcccaaatt attggttcca aatttagggt
2880 ttaaactttt tgaagcaaac ttttttttag ccttgtgcac tgcagacctg gtactcagat
2940 tttgctatga ggttaatgaa gtaccaagct gtgcttgaat aacgatatgt tttctcagat
3000 tttctgttgt acagtttaatt ttagcagtc atatacatt gcaaaagtag caatgacctc
3060 ataaaatacc tcttcaaat gcttaaatc atttcacaca ttaattttat ctcaagtcttg
3120 aagccaattc agtaggtgca ttggaatcaa gcctggctac ctgcatgctg ttccttttct
3180 tttcttcttt tagccatttt gctaagagac acagtcttct caaacacttc gtttctccta
3240

7. Anhang

ttttgtttta ctagttttaa gatcagagtt cactttcttt ggactctgcc tatattttct
3300
tacctgaact tttgcaagtt ttcaggtaaa cctcagctca ggactgctat ttagctcctc
3360
ttaagaagat taaaaaaaaa aaaaaag
3387

Tab. 7-2: Dargestellt ist die cDNA-Sequenz der murinen 18S rRNA (X00686). Diese Sequenz ist zu über 98% identisch mit der humanen cDNA-Sequenz der 18S rRNA. Die Nukleotidsequenzen, an die die Primer und die Sonde hybridisieren sind fett dargestellt. Sowohl die Primer als auch die Sonde binden in gleicher Weise an die humane cDNA-Sequenz der 18S rRNA.

tacctggttg atcctgccag tagcatatgc ttgtctcaa gattaagcca tgcattgtcta
60
agtacgcacg gccggtacag tgaaactgcg aatggctcat taaatcagtt atggttcctt
120
tggtcgctcg ctctctctct acttgataa ctgtggtaat tctagagcta atacatgccg
180
acgggcgctg accccccttc ccgggggggg atgctgcat ttatcagatc aaaaccaacc
240
cggtgagctc cctcccggct ccggccgggg gtcgggccc ggccgcttg tgcactctaga
300
taacctcggg ccgatcgac gcccccgctg gcggcgacga ccatttcgaa cgtctgcctt
360
atcaactttc gatggtagtc gccgtgcta ccatggtgac cacgggtgac ggggaatcag
420
ggttcgattc cggagagggg gcctgagaaa **cggtaccac atccaaggaa** **gg**cagcaggc
480
gcgcaaatta cccactccc **a****ccgggggag** **gtagtgacga** **aaaataacaa** tacaggactc
540
tttcgaggcc ctgtaattgg aatgagtcca ctttaaatcc tttaacgagg atccattgga
600
gggcaagtct ggtgccagca gccgcggtaa ttccagctcc aatagcgtat attaaagttg
660
ctgcagttaa aaagctcgta gttggatctt gggagcgggc gggcgggtccg ccgcgaggcg
720
agtcaccgcc cgtccccgcc ccttgctct cggcgcccc tcgatgctct tagctgagtg
780
tcccgcgggg cccgaagcgt ttactttgaa aaaattagag tgttcaaagc agccccgagc
840
cgcttgata ccgcagctag gaataatgga ataggaccgc ggttctattt tgttggtttt
900
cggaactgag gccatgatta agagggacgg ccgggggcat tcgtattgcg ccgctagagg
960
tgaaattctt ggaccggcgc aagacggacc agagcgaag catttgcaa gaatgtttc
1020
attaatcaag aacgaaagtc ggaggttcga agacgatcag ataccgctgt agttccgacc
1080
ataaacgatg ccgactggcg atgcggcggc gttattocca tgaccgcccg ggcagcttcc
1140
gggaaaccaa agtctttggg ttccgggggg agtatggttg caaagctgaa acttaaagga
1200
attgacggaa gggcaccacc aggagtgggc ctgcccgtta atttgactca acacgggaaa
1260
cctcaccggg ccgggacacg gacaggattg acagattgat agctctttct cgattccgtg
1320

1380 ggtggtggtg catggccggt cttagttggt ggagcgattt gtctggtaa ttccgataac
 1440 gaacgagact ctggcatgct aactagttac gcgacccccg agcggtcggc gtcccccaac
 1500 ttcttagagg gacaagtggc gttcagccac ccgagattga gcaataacag gtctgtgatg
 1560 cccttagatg tccggggctg cacgcgcgct aactgactg gctcagcgtg tgctaccct
 1620 gcgcccggcag gcgcccggtaa cccgttgaac cccattcgtg atggggatcg gggattgcaa
 1680 ttattcccca tgaacgagga attcccagta agtgccgggtc ataagcttgc gttgattaag
 1740 tccctgcctt ttgtacacac cgcccgtcgc tactaccgat tggatggttt agtgaggccc
 1800 tcggatcggc cccgcccggg tcggcccacg gccctggcgg agcgcgtgaga agacggtcga
 1860 atttgactat ctagaggaag taaaagtcgt aacaaggttt ccgtaggtga acctgcggaa
 ggatcatta

Tab. 7-3: Dargestellt sind die für die TaqMan-PCR zur Quantifizierung der COX-2 Transkription verwendeten Oligonukleotide.

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz</i>
I. COX-2	
Forward Primer	att gta ccc gga cag gat tct atg
Reverse Primer	tgt ttg gag tgg gtt tca gaa a
Sonde	ctg ctc aac acc gga att ttt gac aag aat
II. 18S rRNA	
Forward Primer	ggc tac cac atc caa gga agg
Reverse Primer	ttc gtc act acc tcc ccg g
Sonde	cgc gca aat tac cca ctc ccg a

7.3 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: André Mahns
Geburtstag: 21.04.1975
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981 bis 1985 Grundschule Öjendorf
1985 bis 1994 Gymnasium Marienthal
Abschluss 1994 Abitur

Juli 1994 bis September 1995 Zivildienst in der Sozialstation Barsbüttel

Universität:

Ab Oktober 1995 Diplomstudiengang Biologie an der
Universität Hamburg
Oktober 1995 bis März 1998 Grundstudium
April 1998 bis April 2000 Hauptstudium
Mai 2000 bis Februar 2001 Diplomarbeit: "Klonierung verschiedener
Konstrukte der CVF- γ -Kette und deren Expression
in der Hefe *Pichia pastoris*"
Mai 2001 bis April 2004 Dissertation am Institut für Biochemie und
Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf in Kooperation mit der Beiersdorf AG,
Hamburg, Abteilung: Forschung Haut, Labor
Photobiologie: „Mechanismen der Induktion der
Expression der Cyclooxygenase-2 durch ultraviolette
Strahlung in künstlicher Epidermis“

7.4 Danksagung

Diese Zeilen möchte ich denjenigen widmen, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit so nicht denkbar gewesen wäre.

Im Speziellen möchte ich Herrn Prof. Sies, Lars-Oliver Klotz (Ole) sowie Prof. Wittern und den Dres. Wenck, Stüb und Wolber für die Bereitstellung dieses Themas sowie für die Möglichkeit einer solchen kooperativen Zusammenarbeit danken.

Desweiteren möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Alfermann für die spontane Übernahme dieser Arbeit als Zweitgutachter bedanken.

Herrn Prof. Sies möchte ich für die wegweisenden Besprechungen danken und darüber hinaus gilt mein Dank Ole für die zahlreichen Anregungen, Tipps und Besprechungen sowie für die motivierenden und unterstützenden Emails und Telefonate. Herrn Prof. Schewe möchte ich insbesondere für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei der oxygraphischen Bestimmung von Wasserstoffperoxid danken.

Rainer Wolber danke ich für die engagierte Betreuung und Unterstützung sowie dem stets „offenen Ohr“ für Fragen und Diskussionen.

Für die stete Hilfsbereitschaft und der guten Atmosphäre im Labor möchte ich mich beim gesamten Team der Forschung Haut sowie bei allen Kollegen aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I bedanken. An dieser Stelle auch eine Dankeschön an Marlies Scholtes für die Unterstützung in so manchen bürokratischen Angelegenheiten.

Mein besonderer Dank gilt Maike, die mich stets unterstützt, motiviert und darüber hinaus in allen Lebenslagen dazu beiträgt, immer das Beste geben zu können.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und insbesondere bei meinen Eltern bedanken, die mir alles ermöglichten und damit einen wesentlichen Beitrag zu dem leisteten, was ich bisher geschafft habe.

7.5 Schriftenverzeichnis

Originalarbeiten:

André Mahns, Ira Melchheier, Christopher V. Suschek, Helmut Sies and Lars-Oliver Klotz:“ Irradiation of cells with ultraviolet-A (320-400nm) in the presence of cell culture medium elicits biological effects due to extracellular generation of hydrogen peroxide“, *Free Radical Research*, **37(4)**, 391-397, 2003.

André Mahns, Rainer Wolber, Franz Stäb, Lars-Oliver Klotz and Helmut Sies:“ Contribution of UVB and UVA to UV-dependent stimulation of cyclooxygenase-2 expression in artificial epidermis“, *Photochemical and Photobiological Sciences*, **3(3)**, 257-262, 2004.

André Mahns, Rainer Wolber, Franz Stäb, Lars-Oliver Klotz and Helmut Sies:” Induction of cyclooxygenase-2 in artificial epidermis by solar ultraviolet (UV) radiation: Contribution of UVA and UVB”, *Signal Transduction* **2(3-4)**, 138, 2002.

Tagungsbeiträge:

André Mahns, Rainer Wolber, Franz Stäb, Lars-Oliver Klotz and Helmut Sies:” Induction of cyclooxygenase-2 in artificial epidermis by solar ultraviolet (UV) radiation: Contribution of UVA and UVB”, 6th Joint Meeting “Signal Transduction – Receptors, Mediators and Genes”, 07.11. – 09.11.2002, Weimar.

7.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

- André Mahns -

Düsseldorf, den 01.04.2004