

Aus der Klinik für Dermatologie und Venerologie des  
Universitätskrankenhauses Eppendorf  
Direktorin Frau Prof. Dr. med. I. Moll

**Die Bedeutung von Transthyretin und HSP 27  
in der alternden Epidermis**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Jessica A. Kieslich  
aus Hamburg

Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 19.12.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. K. Neuber

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof. Dr. C. Bamberger

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. V. Steinkraus

<b>1. Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung</b>	
2.1 Motivation und Ziel der Arbeit	2
2.2 Aufbau und Funktion der Haut	3
2.3 Die Epidermis: Aufbau und Funktion	3
2.4 Die Dermis: Aufbau und Funktion	5
2.5 Der Alterungsprozess	6
2.5.1 Das Hayflick-Limit	6
2.5.2 Die zelluläre Seneszenz und Telomerlänge	7
2.5.3 Alternsgene und Langlebigkeitsgene	7
2.5.4 Radikaltheorie	8
2.5.5 Die Immuntheorie	9
2.6 Die Hautalterung: intrinsisches und extrinsisches Altern	9
<b>3. Material</b>	
3.1 Herkunft der Spalthäute	12
3.2 Liste der verwendeten Materialien	12
3.2.1 Chemikalien	12
3.2.2 Geräte und Arbeitsmaterial	14
3.2.3 Lösungen, Medien und Puffer	15
3.2.4 Färbungen für die 2D-PAGE und Westernblots	17
3.2.5 Antikörper	18
<b>4. Methoden</b>	
4.1 Herstellung von Spalthauthomogenaten	19
4.2 Proteinbestimmung	20
4.3 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)	20
4.3.1 Die isoelektrische Fokussierung (IEF)	20
4.3.2 Die 2. Dimension (SDS-PAGE)	22
4.4 Gelanalyse	23
4.5 Spot-Picking	23
4.6 Nu-PAGE® (eindimensionale Gelelektrophorese)	23
4.7 Western-Blot	24

<b>5. Ergebnisse</b>	
5.1 Spalthaut zur Beurteilung der epidermalen Strukturen und Veränderungen während des Alterns .....	25
5.2 Unterschiede im Proteinmuster zwischen junger und gealterter Haut .....	28
5.3 Ansequenzierung und Identifikation der Proteinspots .....	37
5.3.1 Transthyretin (TTR).....	37
5.3.2 Heat shock 27 kD Protein (HSP27).....	38
5.4 Nachweis mittels Western Blot .....	39
5.4.1 Untersuchungen zum Gehalt von Transthyretin in Keratinozyten (Spalthaut) .....	39
5.4.2 Untersuchungen zum Transthyretingehalt in Epidermis und Dermis im Vergleich zu Spalthaut .....	40
5.4.3 Untersuchungen zum Gehalt von Heat Shock 27 kD Protein (HSP 27) in Keratinozyten (Spalthaut) .....	41
5.4.4 Untersuchung von HSP 27 und Transthyretin in Spalthauthomogenaten .....	42
<b>6. Diskussion</b>	
6.1 Das Keratinozyten-Proteom .....	43
6.2 Transthyretin in alternder Epidermis.....	44
6.3 HSP 27 in alternder Epidermis.....	46
6.4 HSP 27 und TTR in der alternden Epidermis .....	49
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	50
<b>8. Literaturverzeichnis</b> .....	51
<b>9. Danksagung</b> .....	58
<b>10. Lebenslauf</b> .....	59

## Glossar

---

Abb.	Abbildung
°C	Grad Celsius
D	Dermis
ddH <sub>2</sub> O	bidesitilliertes Wasser
E	Epidermis
ECL	Enhanced Chemoluminescence
f	Female
g	Gramm
h	Stunde (hour)
HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSP	Heat Shock Protein (Hitzechockprotein)
ID	Identität
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG-Strip	Immobilized pH gradient-strips
kD	Kilodalton
L	Liter
m	Male
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - time of flight
MG	Molekulargewicht
ml	Mililiter
mm	Milimeter
mM	milimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
pI	isoelektrischer Punkt
PVDF-Membran	Poly-Vinylidene Fluoride-Membran
RBP	Retinol binding protein
S	Spalthaut
TTR	Transthyretin
UV	ultraviolett
V	Volt
Vhrs	Voltstunden (volt hours)
v/v	Volumenprozent (volume percent)
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent (weight percent)
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

# **1 Arbeitshypothese und Fragestellung**

Der Alterungsprozess ist mit einer Vielzahl von Veränderungen im Organismus verbunden. Die Haut ist das Organ, bei dem der Alterungsprozess besonders deutlich sichtbar wird. Die Hautalterung ist die Summe verschiedener genetisch determinierter Faktoren wie auch von äußeren Stressoren. Der Alterungsprozess der Haut zeigt sich vor allem in dem Abbau der dermalen Matrixproteine im Bereich der Dermis, welche schließlich als Faltenbildung sichtbar werden. Über die eigentliche 'äussere Schicht' des Körpers, die Epidermis, welche zum größten Teil aus Keratinozyten besteht, sind kaum Alterungsmechanismen bekannt.

Der Begriff "Proteomics" bezeichnet die Analyse von Proteinen, die als funktionelle Einheit unter bestimmten Bedingungen exprimiert werden. Das Endprodukt der kodierenden Gene einer Zelle sind Proteine, die nach Transskription und Translation weiteren posttranslationalen Modifikationen wie Glykosylierungen und Phosphorylierungen unterzogen werden können. Das Proteom beschreibt somit die Gesamtheit der Proteine einer Zelle.

Im Rahmen dieser Arbeit soll mit Hilfe von Proteomics das Proteom von nativen Keratinozyten als Hauptbestandteil der Epidermis untersucht werden. Darauf aufbauend sollen anhand verschiedener Expressionsmuster junger und gealterter Epidermis Rückschlüsse auf die in den Alterungsprozess involvierten Proteine gezogen werden. Da Keratinozyten nur im Zellverband als Epidermis auftreten, werden Spalthäute zu den folgenden Untersuchungen verwendet.

## **2 Einleitung**

---

### **2.1 Motivation und Ziel der Arbeit**

Die Haut als äußere Barriere des Körpers hat vielfältige Funktionen, unterliegt aber auch einer großen Anzahl von äusseren Stressoren. Diesen Stressoren folgen verschiedene direkte Antwortmechanismen, sie beeinflussen aber auch die Entwicklung verschiedener Antwortmechanismen über Jahrzehnte, die schließlich als Hautalterung sichtbar werden. Es besteht gerade in der heutigen Zeit der Wunsch, die Hautalterung bzw. den Alterungsprozess im Allgemeinen zu verlangsamen. Dabei bestehen verschiedene invasive und weniger invasive Möglichkeiten, die Zeichen des Alterungsprozess abzuschwächen.

Der Alterungsprozess der Haut zeigt sich vor allem in dem Abbau der dermalen Matrixproteine und geht mit Faltenbildung einher. Über die eigentliche 'äussere Schicht' des Körpers, die Epidermis, sind kaum Alterungsmechanismen bekannt. Die Untersuchung von nativer Epidermis verschieden alter Probanden sollte im Mittelpunkt stehen, um verschiedene Stressoren der Epidermis wie sie im Laufe des Leben auftreten, zu berücksichtigen.

In dieser Arbeit sollte eine Proteinkarte von Keratinozyten, den Hauptbestandteil der Epidermis, mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese angefertigt werden. Anhand verschiedener Expressionsmuster junger und gealterter Epidermis sollten Rückschlüsse auf die in den Alterungsprozess involvierten Proteine gezogen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Proteinkarte nativer Epidermis in Form von Spalthauthomogenaten zu erstellen. Auf eine Isolierung der Epidermis wurde verzichtet, da es unter den Isolierungstechniken zu deutlichen Proteinabbauvorgängen kommen würde (enzymatische Abpräparation der Epidermis oder Hitzebehandlung). Die verschieden stark exprimierten Proteine der Spalthäute von jungen und gealterten Probanden sollten mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen analysiert werden.

## 2.2 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut ist die physikalische Barriere des Körpers zur Außenwelt. Der komplexe Aufbau ermöglicht der Haut, sich den Bewegungen und Formveränderungen des Körpers anzupassen und gleichzeitig einer Vielzahl von Aufgaben gerecht zu werden, die sich aus dieser Grenzstellung ergeben. Die Haut bildet einen wirksamen Schutz gegen physikalische, chemische und mikrobiologische Noxen, ist ein sehr fein einstellbares thermoregulatorisches System (Gefäßsystem und Schweißdrüsen), besitzt exkretorische Funktionen und eine Reihe von Sinnesrezeptoren. Die Haut eines erwachsenen Menschen bedeckt durchschnittlich 2m<sup>2</sup> und ist zwischen 1,5 und 4 mm dick. Sie besteht aus zwei Schichten, der Epidermis und der Dermis. Die Dermis stellt die Verbindung zur Subkutis dar, dem subdermalen Fettgewebe.

## 2.3 Die Epidermis: Aufbau und Funktion

Die Epidermis ist das terminale Abschlussgewebe der Haut. Ihr kommt vor allem eine Schutzfunktion zu. Sie reguliert den Wasserhaushalt des Körpers, bildet eine physikalische Barriere gegen den Eintritt pathogener Mikroorganismen und Viren, und bietet Schutz gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen wie ultravioletter Strahlung und Einwirkung von Chemikalien.

Die Epidermis ist ein mehrschichtig verhornendes Plattenepithel ektodermaler Herkunft, das einer Basallamina aufsitzt und zu 90% aus Keratinozyten besteht. Daneben finden sich noch die mit ihr symbiotisch lebenden Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen.

Die Keratinozyten weisen von innen nach außen einen wachsenden Grad an Differenzierung auf. Histologisch lässt sich die Epidermis in 4 (bis 5) Zellschichten einteilen und weist lokalisationsabhängig eine Dicke von 0,04 - 1,5 mm auf. Die einzelnen Schichten entsprechen den verschiedenen Differenzierungsstadien der Keratinozyten und produzieren als funktionelles Endprodukt die Hornschicht, das Stratum corneum, als Trägerin der Barrierefunktion der Haut. Nur die innerste Keratinozytenschicht, das Stratum basale, enthält mitotisch aktive Zellen, während die drei suprabasalen Zellschichten, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum ausschließlich aus postmitotischen, sich differenzierenden Zellen aufgebaut sind. Unter den mitotisch aktiven Zellen im Stratum basale unterscheidet man zwei Zellpopulationen, die epidermalen Stammzellen und die „transit amplifying cells“ (TA's) (Jones PH 1997). Während die epidermalen Stammzellen



einen Vorrat undifferenzierter Zellen bereitstellen, die zeitlebens an der Oberfläche abgestoßene Zellen ersetzen und das Epithel nach einer Verletzung regenerieren, sind die aus ihnen hervorgegangenen TA's bereits determinierte Keratinozyten, die nur noch ein begrenztes Proliferationspotential besitzen. Sie stellen ein Zwischenstadium dar, über das epidermale Stammzellen terminal differenzierte Zellen generieren.

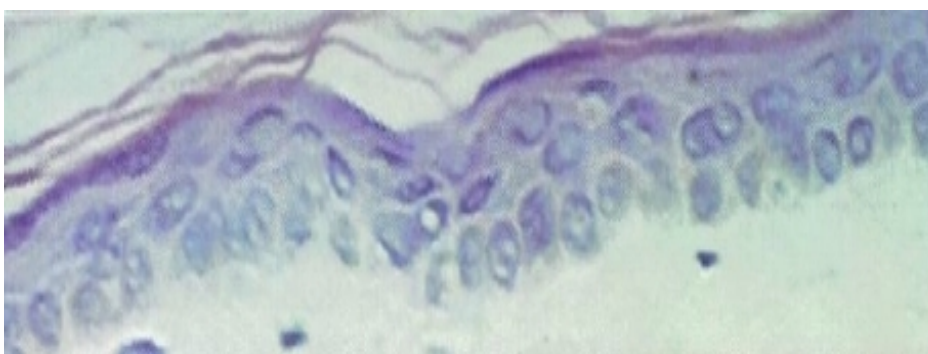
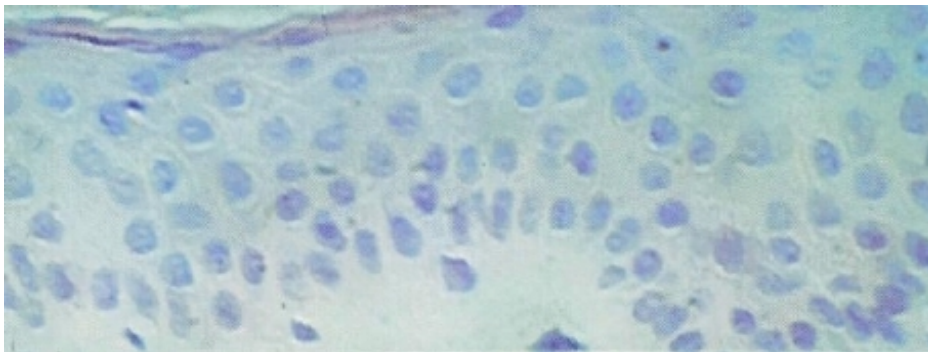
Der Differenzierungsvorgang von den Keratinozyten in die funktionstragende Hornschicht ist ein sich schlagartig, d.h. in Stunden, abspielender Prozess. Er wird eingeleitet, wenn Zellen im Stratum basale sich plötzlich von der Basalmembran ablösen, im Zellzyklus arretieren und in das folgende Stratum spinosum einwandern. Dort durchlaufen die Keratinozyten ein in seiner Abfolge genau abgestimmtes Differenzierungsprogramm, das mit einer Reihe morphologischer und biochemischer Veränderungen im Stratum spinosum und Stratum granulosum einhergeht. Nach einer Umstellung der Keratinsynthese werden zunehmend differenzierungsspezifische Keratine gebildet, die sich zu tonofibrillären Bündeln zusammenlagern. Im Stratum granulosum werden die Tonofibrillen zu makrofibrillären Kabeln gebündelt. Des Weiteren ist diese Schicht histologisch durch das Auftreten vieler Granulae gekennzeichnet, die verschiedene Produkte der Keratinozytendifferenzierung enthalten, die zur Ausbildung terminaler Keratinozyten Strukturen im Stratum corneum benötigt werden. Am Ende des etwa 3-4wöchigen Differenzierungsprozesses bilden sich im Stratum corneum terminal differenzierte, kernlose Keratinozyten, die in eine membranöse Hülle kreuzvernetzter Polypeptide, im „cornified envelope“, eingebettet sind. Diese Schicht versiegelt die Haut nach außen und ist für ihre Widerstandsfähigkeit verantwortlich.

Die Epidermis enthält keine Gefäße; die Versorgung erfolgt über Diffusion aus der darunter liegenden gefäßreichen Dermis, mit der sie dreidimensional über epidermale Reteleisten und bindegewebige dermale Papillen verbunden ist. Die Grenzfläche zwischen Epidermis und Dermis wird als dermoepitheliale Junctionszone bezeichnet.

## 2.4 Die Dermis: Aufbau und Funktion

Die Dermis ist mesodermalen Ursprungs und stellt eine bis zu 3mm dicke fibroelastische Schicht aus kollagenem Bindegewebe dar, die der Haut ihre hohe Zug- und Zerreißfestigkeit verleiht. Der obere Anteil, das Stratum papillare, ist Träger des Gefäß- und Nervensystems der Haut, während der tiefe, straffe Anteil, das Stratum reticulare, der Haut mechanische Festigkeit verleiht. Von der Dermis ziehen bindegewebige Septen in das darunter liegende subkutane Fettgewebe (Subkutis), teilen es in Lappen auf und verankern es an den tiefen Bindegewebsfaszien und am Periost (Retinacula cutis). Im Bindegewebe eingebettet liegen die Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen), die ektodermaler Herkunft sind.

Dieser grundsätzliche Aufbau der Haut unterliegt starken regionalen Schwankungen, die der Funktion und Charakteristik der jeweiligen Region angepasst sind.



**Abbildung 1:** Histologischer Schnitt der Haut eines jungen (oben) und eines alten Menschen (unten). Man sieht im Gegensatz zur jungen Epidermis eine starke Abnahme der suprabasalen Zellschichten, eine weniger scharf ausgerichtete Zellorganisation und eine Ausdünnung der epidermalen Strukturen im Alter.

## 2.5 Der Alterungsprozess

Das Altern wird allgemein als ein progressiver Verlust der (Organ-) Funktionen mit zunehmender Mortalität im Alter definiert. Er ist ein unausweichlicher Prozess, dessen biologische Mechanismen nur schwer zu definieren und erst unvollständig erforscht sind. Das Altern stellt im weitesten Sinne eine Funktion der Zeit dar und drückt sich durch nicht umkehrbare Veränderungen in einem Lebewesen aus. Der komplex ablaufende Alterungsprozess beinhaltet ineinander greifende Prozesse, die sich von der molekularen Ebene über Zellebene hin zu Geweben und Organen aufsummieren bis schließlich die Zeichen des Alterns in einem Individuum deutlich sichtbar sind.

Eine einheitliche Alterungstheorie konnte noch nicht formuliert werden. Die Vielzahl der derzeit existierenden Alterungstheorien greifen zwangsläufig nur Teilaspekte des Alterns heraus. Im Mittelpunkt dieser Theorien stehen jeweils spezifische zelluläre und molekulare Prozesse. Folgende Theorien geben einen Einblick in den Versuch den Alterungsprozess zu beschreiben.

### 2.5.1 Das Hayflick-Limit

Hayflick und Moorehead (1961) beschrieben erstmals ein Phänomen, das als zelluläre Seneszenz bezeichnet wird. Humane vermehrungsfähige Fibroblasten können in Kultur nur eine begrenzte Zahl von Teilungen durchführen bis sie schließlich einen irreversiblen Zustand des Wachstumsstillstands erreichen („Hayflick-Limit“). In der Kultur geht die Teilungsfähigkeit verloren. Dieser Verlust ist irreversibel und mit charakteristischen morphologischen, zellphysiologischen, molekularen und biochemischen Veränderungen verbunden. Die noch möglichen Zellteilungen sind dabei abhängig von der potentiellen Lebenserwartung der Art sowie dem Alter des Individuums, dem sie entstammen. Bei dem Verlust der Zellteilungsfähigkeit stehen der Mechanismus der Zellteilung, der Zellzyklus sowie Zellzyklus-assoziierte Gene im Mittelpunkt. Die kontrollierenden Proteine gehören zu den Proteinkinasen. Die Familie der cyclinabhängigen Proteinkinasen (CDK) können durch Phosphorylierung bestimmter Proteine Prozesse im Zellzyklus beeinflussen. Die aktivierten Proteine sind die Cycline, die an CDK-Proteine binden können und diese in ihrer Phosphorylierungsaktivität regulieren.

Daneben spielen noch verschiedene Gene eine zentrale Rolle für die Einleitung und das Fortschreiten der replikativen Seneszenz. Tumorsuppressorgene wie p53, die

Transkriptionsfaktoren darstellen, zeigen in alternden Zellen eine veränderte DNA-Bindungskapazität. Ebenso ist die Aktivität der p53-induzierten Transkriptionsaktivierung modifiziert (Bond 1996), so dass hier eine altersabhängige Funktionsveränderung vorliegt.

### 2.5.2 Die zelluläre Seneszenz und Telomerlänge

Ein Kontrollfaktor der zellulären Seneszenz scheint im Zusammenhang mit der Aktivität der Telomerase zu stehen. Telomere sind repetitive DNA-Sequenzen, die die Enden von eukaryontischen Chromosomen bilden. Telomerase kann DNA-Verluste, wie sie nach jeder Zellteilung an den Telomeren auftreten, durch Neusynthese kompensieren (Greider 1985). Sie schützen die genomische DNA vor Degradation und Rekombinationsereignissen. Da die DNA-Polymerase  $\alpha$  die Enden linearer DNA nicht replizieren kann, werden Telomere in normalen somatischen Zellen mit jeder Replikation kürzer. Dieser Prozess limitiert maßgeblich die maximale Zahl von Teilungen einer Zelle. Unterschreiten die Telomere eine kritische Grenze, können keine weiteren Zellteilungen mehr erfolgen.

Aber nicht nur die Telomerlänge scheint Einfluss zu nehmen auf die Telomerfunktion. Telomere kommen in einer „capped“ und „uncapped“ Form vor (Blackburn, 2000). „Uncapped“ Telomere sind DNA-Bruchstücke, die je nach Zellart die p53-vermittelte Apoptose oder einen seneszenten Phänotyp induzieren (van Steensel 1998, Karlseder 2002). Eine auffallende Ähnlichkeit besteht zwischen der zellulären Antwort auf DNA-Schäden durch ionisierende und ultraviolette Strahlung und durch bestimmte Chemikalien im Vergleich zu der experimentell hervorgerufenen Telomerschädigung. Die Telomer-DNA-Sequenz TTAGGG ist ein Hauptangriffspunkt für unter anderem UVB-Strahlung, bei der Pyrimidin-Dimere (Setlow 1966) und oxidative Schädigungen meist an Guanin-haltigen Abschnitten der DNA entstehen (Kasai 1991). Durch die Destabilisierung oder Schädigung der Telomerregion kann es somit zu einer vorzeitigen Telomer-Verkürzung, Seneszenz und Alterung kommen (Yaar 2002).

### 2.5.3 Alternsgene und Langlebigkeitsgene

Als eine weitere Komponente des Alterns können Alternsgene beschrieben werden, die den Alterungsprozess einleiten und steuern. Bei einer Reihe von Erkrankungen, die durch eine vorzeitige Alterung gekennzeichnet sind, finden sich Mutationen z.B. beim Cockayne

Syndrom in der DNA-Helikase (Weeda 1990). Die Ataxia Telangiektasia wird durch eine Mutation im ATM-Gen verursacht, das eine Kinase kodiert, die DNA-Schäden aufspürt (Savitsky 1995). Das Werner Syndrom, verursacht wahrscheinlich durch eine Mutation einer DNA Helikase, ist durch ein erhöhtes Auftreten von DNA-Fehlbildungen, erhöhten Telomerverlust und reduzierten Telomerreparaturmechanismen gekennzeichnet (Bohr 2003). Als Gegenspieler hierzu werden Langlebigkeitsgene („longevity genes“) diskutiert, die den Prozess des Alterns hemmen. Die derzeit bekannten „Longevity“-Gene kodieren für Proteine, die alle eine Aufgabe in der Kontrolle von Umweltstressoren besitzen. Das ras-2 Gen in Hefezellen, dessen Überexpression die Seneszenz verzögert, agiert als ein Sensor für verschiedene umweltbedingte Stressfaktoren wie Hunger, UV-Strahlung, oxidative Schäden und Hitzeschock (Sun 1994). Ebenso wie im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als auch in langlebigen Arten der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zeigt sich eine höhere Expression von Langlebigkeitsgenen. Sie verleihen diesen Arten zusätzlich eine höhere Resistenz gegenüber umweltbedingten Stressoren und können die Lebensspanne verdoppeln bis verdreifachen (Johnson 1987, Dudas 1995, Jazwinski 1996).

Es wird angenommen, dass beim Altern ein Dualismus zwischen diesen beiden Genotypen besteht, wobei der Einfluss der Alternsgene im Laufe des Lebens zunimmt.

#### **2.5.4 Radikaltheorie**

Die passive Komponente des Alterns ist vom Zellstoffwechsel abhängig, bei dem zahlreiche freie Radikale entstehen, die zelluläre Strukturelemente und die DNA schädigen können. Diese Defekte summieren sich mit der Zeit auf und führen zu Zeichen der Alterung (Wallace 1992). Vor allem ist die DNA der Mitochondrien gefährdet. Der in den Mitochondrien durch verschiedene Enzyme katalysierte Zitratzyklus liefert eine sehr hohe Energieausbeute, allerdings werden auch infolge der Anwesenheit von Sauerstoff sehr viele freie Radikale gebildet, die auch freigesetzt werden können. Schäden in der Mitochondrien-DNA, die auch genetisch bedingt sein können, sind neben zahlreichen Erkrankungen auch für Alterungsphänomene verantwortlich (Wallace 1992). So könnten Leistungseinschränkungen im Alter aufgrund einer verminderten Energieausbeute in Mitochondrien erklärt werden.

### **2.5.5 Die Immuntheorie**

Die Immuntheorie setzt eine Dysfunktion des Immunsystems voraus mit den sich daraus ergebenden entzündlichen Prozesse sowie zerstörerischen Aktivitäten von Immunmediatoren, die für das Altern verantwortlich gemacht werden (Cheney 1974).

Zusammenfassend spielen die Seneszenz und/oder die Apoptose eine grundlegende Rolle im Alterungsprozess. Diese durch bestimmte Gene verstärkten oder abgeschwächten Prozesse tragen mit den zellulären Stoffwechselprodukten stark zu der zellulären, organischen und schließlich den gesamten lebenden Mechanismus betreffenden Alterung bei.

### **2.6 Die Hautalterung: intrinsisches und extrinsisches Altern**

An der Haut wird der Alterungsprozess des Organismus am deutlichsten sichtbar. Der Alterungsprozess der Haut ist ein komplexer Prozess, wobei zwischen genetisch determiniertem intrinsischem Altern und extrinsischem Altern unterschieden wird.

Unter der intrinsischen Hautalterung versteht man den vorprogrammierten, nicht zu beeinflussenden physiologischen Alterungsprozess, der individuell verschieden schnell fortschreitet. Er ist durch zunehmenden Verlust der Zellzahl, der Substanz und der Funktion in allen Systemen der Haut gekennzeichnet (Uitto 1998).

Neben diesem nicht abwendbaren genetisch determinierten Prozess unterliegt die Haut auch einem extrinsischen Alterungsprozess, der die intrinsische Hautalterung verstärkt. Vor allem die UV-Strahlung, aber auch Umweltfaktoren wie z.B. Nikotinkonsum tragen zur Schädigung des dermalen Bindegewebes bei (Wlaschek 2001). UV-A- und UV-B-Strahlen lösen in der Haut über Interaktionen mit intrazellulären Chromophoren und Photosensitizern massiven oxidativen Stress aus, der zu transienten aber auch permanenten genetischen Veränderungen führen kann. Sie aktivieren unter anderem zytoplasmatische Signaltransduktionswege, die mit Wachstums-, Differenzierungs- und Abbauprozessen sowie mit der Seneszenz vergesellschaftet sind. Sowohl zelluläre Veränderungen als auch Änderungen der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung extrazellulärer dermaler Matrixmetalloproteine zeigen sich in einer reduzierten Elastizität der Haut mit Faltenbildung, Verdünnung der Epidermis, Dermis und Subkutis sowie Veränderungen des Immunsystems und einer verzögerten Wundheilung.

Zu den Stressproteinen zählen verschiedene Proteine, darunter unter anderem die Gruppe der Hitzeschock-Proteine. Dabei handelt es sich um eine Gruppe hoch konservierter Proteine, die in Zellen als Antwort auf Hitze oder andere physikalische oder chemische Stressoren exprimiert werden. Sie binden an andere zelluläre Proteine und nehmen an Proteinfaltungsvorgängen unter zellulären Stress, aber auch während der Neusynthese von Proteinen teil. Hitzeschock-Proteine verhindern bzw. sind an Reparaturmechanismen UV-geschädigter DNA beteiligt. Hitzeschockproteine werden sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis exprimiert. In der Epidermis beeinflussen sie verschiedene zelluläre Prozesse wie z.B. Entzündungs- und Immunantworten der Haut, und es scheint Verbindungen zwischen der Exprimierung von Hitzeschockproteinen und Hauterkrankungen zu bestehen (Charveron 1995).

Der Alterungsprozess wirkt sich unterschiedlich auf die verschiedenen Hautstrukturen aus. Gealterte Haut ist auf den ersten Blick durch das Auftreten von Falten, Schlaffheit und Altersflecken zu erkennen. Der Alterungsprozess wirkt sich in der Epidermis vor allem als Verlangsamung des Keratinozytenstoffwechsels und der Keratinozytenproliferation aus (Fenske 1986). Wie in der Abbildung 1 dargestellt nimmt die Dicke und die Zahl der Zelllagen in der Epidermis während des Alterns - alle 10 Jahre etwa um 6% ab (Hadshiew 2000). Neben der Zahl der Langerhans-Zellen und Melanozyten sind davon vor allem die suprabasalen Zellschichten betroffen. Die Dicke des Stratum corneums bleibt meist konstant und beträgt zeitlebens etwa 15 Zelllagen.

Im Laufe des Lebens findet sich auch eine abnehmende Zell- und Gefäßdichte in der Dermis. Im histologischen Schnitt ist zu erkennen, dass die Dermis unregelmäßige Strukturen und Auflockerungen enthält und weniger kompakt erscheint als in junger Haut (Abb.1). Bereits im Alter von 30 Jahren kommt es zu einem graduellen Rückgang der Zahl der Mikrofibrillen der elastischen Fasern (Varadi 1972). Des Weiteren nimmt mit dem Alter die Kollagensynthese ab (Uitto 1998) und in der Dermis kommt es zu einem Rückgang des subkutanen Fettgewebes. Es verändert sich die Struktur der epidermalen-dermalen Junctionszone. In der Basalmembran sind Dermis und Epidermis miteinander verankert. Untersuchungen haben gezeigt, dass dieser Zusammenhalt von Dermis und Epidermis im Alter geschwächt wird (Fenske 1986). Ein Grund ist die Abflachung dieser Grenzfläche, was zu einer Schwächung der Kohäsion zwischen Dermis und Epidermis führt. Ein anderer Grund sind strukturelle und

funktionelle Veränderungen in den Komponenten der Basalmembran. Hier spielt das Glykoprotein Laminin eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Ankerfibrillen, die die basalen Keratinozyten mit der darunter liegenden Dermis verbinden.

Die UV-Bestrahlung der Haut führt zu kurzfristigen reversiblen Reaktionen wie Erythembildung und Pigmentation, und zu langfristigen permanenten Reaktionen wie der Hautalterung und der Karzinogenese. Durch das sich gewandelte Freizeitverhalten ist eine erhöhte Inzidenz von malignen Melanomen schon im jungen Erwachsenenalter zu verzeichnen (Bosetti 2004, Durnick 2004). Bei der über Jahrzehnte der Sonne ausgesetzten Haut findet sich besonders bei hellhäutigen Menschen eine Akkumulation elastischen Materials in der oberen Dermis, die als solare bzw. senile Elastose bezeichnet wird (Bernstein 1994). Abschließend ist zu bemerken, dass mit der Hautalterung nicht nur verschiedene gutartige Hautveränderungen und prä-maligne Veränderungen bis hin zu semimaligen bzw. malignen Tumoren assoziiert sind.



## 3 Material

---

### 3.1 Herkunft der Spalthäute

Es wurden Reste von Spalthäuten (0,3mm dick), die zur therapeutischen Wunddeckung an der Hautklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf entnommen wurden, verwendet. Das Einverständnis der Patienten lag in schriftlicher Form vor.

### 3.2 Liste der verwendeten Materialien

#### 3.2.1 Chemikalien

---

Nicht ausdrücklich erwähnte Laborchemikalien wurden in p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Acrylamid-Bis, 29.1 : 0.9 (40%)	Merck
Agarose	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
BioRad Protein Färbereagenz	BioRad
Boehringer Blockierungsreagenz	Boehringer
Brilliant Blau G 250	Roth
Bromphenolblau Na-Salz	Roth
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck
CHAPS	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DryStrip Cover Fluid	Amersham Pharmacia Biotech
PBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline)	Sigma
ECL-Reagenz	Amersham Pharmacia Biotech
EDTA Dinatriumsalz Titriplex III	Roth
Eisessig	Roth
Ethanol vergällt	Bundesmonopolverwaltung
Formaldehyd 37%	Sigma
Glycerol 86 %	Roth

Glycin	Roth
Harnstoff	Roth
HEPES	Roth
I-Block Reagenz Tropix	Tropix, Bedford, MA, USA
Iodacetamid	Merck
IPG-Buffer, pH 3-10 NL	Amersham Pharmacia Biotech
IPG-Buffer, pH 4-7	Amersham Pharmacia Biotech
IPG-Buffer, pH 6-11	Amersham Pharmacia Biotech
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
Natriumacetat Trihydrat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumcarbonat wasserfrei	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Roth
NuPAGE <sup>®</sup> 4-12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen
NuPAGE <sup>®</sup> MES-Puffer 20 x	Invitrogen
NuPAGE <sup>®</sup> Transfer-Puffer 20x	Invitrogen
Ovalalbumin/ Albumin Chicken egg	Sigma
PBS	Sigma
Ponceau-S-Konzentrat	Sigma
Pufferlsg. für pH-Wert Kalibrierung pH 4,00	Merck
Pufferlsg. für pH-Wert Kalibrierung pH 7,00	Merck
Pufferlsg. für pH-Wert Kalibrierung pH 9,00	Merck
Pufferlsg. für pH-Wert Kalibrierung pH 10,01	Roth
Regenbogenmarker	Amersham Pharmacia Biotech
Roti-Load 4x-Konz. Reduzierend	Roth
Salzsäure 2N (HCL)	Merck
Salzsäure 25% (HCL)	Roth
Sealing gel	Amersham Pharmacia Biotech
Silbernitrat	Roth
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth

Sodiumthiosulfat	Roth
TBS	Roth
TEMED	Merck
Thimerosal	Roth
Tricin	Roth
Tris [Tris(hydroxymethyl)-aminomethan]	Roth
Triton X-100	Roth
Tween-20	AppliChem

### **3.2.2 Geräte und Arbeitsmaterial**

---

Cleaning Solution, Strip Holder	Amersham Pharmacia Biotech
Dispergierer DIAX 900 (Ultraturrax)	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Equilibration Tube Set	Amersham Pharmacia Biotech
Ettan DALT Buffer Seal Removal Tool	Amersham Pharmacia Biotech
Ettan DALT Cassette Removal Tool	Amersham Pharmacia Biotech
Ettan DALT Gel Casting Cassette, 1,0mm	Amersham Pharmacia Biotech
Ettan DALT II Gel Casting System	Amersham Pharmacia Biotech
Ettan DALT II System: Separation Unit and Power Supply / Control Unit	Amersham Pharmacia Biotech
Ettan DALT Separator sheets, 0,5mm	Amersham Pharmacia Biotech
Färbewannen	Roth
Filterpapier 3MM	Whatman
Immobiline DryStrips pH 3-10 L, 24cm	Amersham Pharmacia Biotech
Immobiline DryStrips pH 4-7 L, 24cm	Amersham Pharmacia Biotech
Immobiline DryStrips pH 6-9 L, 24cm	Amersham Pharmacia Biotech
IPGphor Isoelectric focusing unit	Amersham Pharmacia Biotech
IPG Strip Holder	Amersham Pharmacia Biotech
Mixermill	Quiagen
NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen
NuPAGE® Bis-Tris Electrophoresis Systems	Invitrogen
PVDF Membran	Milipore, Eschborn

Röntgenfilme	Fuji RX Super
Röntgenfilmentwickler	Agfa
Strip holders (Immobiline DryStrip, 24cm)	Amersham Pharmacia Biotech
X-finity pro 42 Scanner	Quatographic AG

### **3.2.3 Lösungen, Medien und Puffer**

---

- **Homogenisierungspuffer (HP)**  
10mM Tris, 5mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% (w/v) Chaps, ddH<sub>2</sub>O.
- **Rehydratationspuffer**  
8M Harnstoff, 2% (w/v) Chaps, 0,5% (v/v) IPG-Puffer, ddH<sub>2</sub>O. Zum Einfärben einige Körnchen Bromphenolblau. 18,2µl 1M DTT / 1000µl Rehydratationspuffer vor Gebrauch hinzufügen
- **Equilibrierungspuffer 1**  
50 mM Tris/HCl pH 8.8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, ddH<sub>2</sub>O. Zum Einfärben einige Körnchen Bromphenolblau. Vor Gebrauch 100 mg DTT / 10 ml Equilibrierungspuffer hinzufügen.
- **Equilibrierungspuffer 2**  
50 mM Tris/HCl pH 8.8, 6 M Harnstoff, 30 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, ddH<sub>2</sub>O. Zum Einfärben einige Körnchen Bromphenolblau. Vor Gebrauch 100 mg Iodacetamid / 10 ml Equilibrierungspuffer hinzufügen.
- **Elektrophoresepuffer 5-fach konzentriert:**  
25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, ddH<sub>2</sub>O.
- **Gel-Lösung für 14 Gele (900 ml), 12.5%**  
287 ml Acrylamid-Bis, 29.1: 0.9 (40%), 225 ml 1.5M Tris/HCl, pH 8.8, 9 ml 10% SDS, 385 ml ddH<sub>2</sub>O, 3.3 ml 10% APS, 0.6 ml TEMED

- **Verdrängungslösung**  
25 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8, 50 ml Glycerol (86 %), 25 ml ddH<sub>2</sub>O, einige Körnchen Bromphenolblau zum Anfärben der Lösung
- **Gel-Aufbewahrungslösung**  
250 ml/L 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8, 10 ml/L 10 %-ige SDS
- **NuPAGE<sup>®</sup> 4-12 % Bis-Tris Gel**
- **NuPAGE<sup>®</sup> MES-SDS-Running Buffer**  
5 % NuPAGE<sup>®</sup> MES-Puffer 20x , ddH<sub>2</sub>O.
- **NuPAGE<sup>®</sup> Transfer Buffer**  
5 % NuPAGE<sup>®</sup> Transfer-Puffer 20x , 10% Methanol, ddH<sub>2</sub>O.
- **10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (10x TBS)**  
1.37 M NaCl und 200 mM Tris in ddH<sub>2</sub>O gelöst und mit 25 %-iger Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt.
- **1x TBS-T**  
10 % 10x-TBS, 0.05 % Tween-20
- **Boehringer Blockierungspuffer, pH 7.5**  
100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, 0.005 % Thimerosal, 1 % Boehringer Blockierungsreagenz
- **Tropix-Blockierungspuffer**  
0,2 % I-Block Reagenz Tropix, 0,005 % Thimerosal in 1x TBS-T
- **BSA-Blockierungspuffer**  
5 % BSA in 1x TBS-T

### **3.2.4 Färbungen für die 2D-PAGE und Westernblots**

---

- **MALDI-kompatible Silberfärbung (nach Heukeskoven et al. 1985)**
  - Fixierungslösung: 40 % Ethanol, 10 % Eisessig
  - Sensitivierungslösung: 30 % Ethanol, 0.4 % Natriumthiosulfatlösung (2.5 % w/v), 0.125 M Natriumacetat-Trihydrat
  - Silberlösung: 10 % Silbernitrat-Lösung (2.5 % w/v), 0.04 % Formaldehyd (37 %w/v, Merck)
  - Entwicklungslösung: 0.06 M Natriumcarbonat, 0.02 % Formaldehyd (37 % w/v)
  - Stop-Lösung: 9.8 mM EDTA-NA x 2H<sub>2</sub>O
  - Aufbewahrungslösung: 20 % Ethanol, 10 % Glycerol
  
- **Ponceau-Färbung**  
20% Ponceau-S-Konzentrat in ddH<sub>2</sub>O
  
- **ECL Reagenz**

### **3.2.5 Antikörper**

---

#### **Primärantikörper**

- Rabbit polyclonal IgG Anti-Prealbumin (sc-13098), Verdünnung 1 : 1000, Santa Cruz Biotechnology
- Mouse monoclonal IgG<sub>2a</sub> Anti-HSP27 Ab-1 (clone G3.1, monoclonal), Verdünnung 1 : 5000, Santa Cruz Biotechnology

#### **Sekundärantikörper**

- Rabbit anti-mouse, HRP conjugated (315-035-003), Verdünnung 1 : 4000, Jackson Immuno Research
- Mouse anti-rabbit IgG (H+L) (211-035-109), HRP conjugated, Verdünnung 1 : 4000, Jackson Immuno Research

## 4 Methoden

---

### 4.1 Herstellung von Spalthauthomogenaten

Die Proben wurden in physiologischer Kochsalzlösung transportiert, in PBS gewaschen, ausgewogen und ca. 300mg wurden benötigt, um eine ausreichende Proteinausbeute mit dem Ultraturrax zu erreichen, nur ca. 100mg bei der Aufarbeitung mit einer Mixermill, die aber erst zu einem späteren Zeitpunkt zur Probenaufarbeitung eingesetzt wurde. Nichtbenötigtes Probenmaterial wurde bei  $-86^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die Probenaufbereitung erfolgte auf Eis bzw. die Zentrifugation bei  $+4^{\circ}\text{C}$ .

**Aufarbeitung mit Ultraturrax:** Die abgewogene Menge Spalthaut wurde mit einem Skalpell in ca. 1 x 1 mm große Stücke zerkleinert und anschließend in 1000 $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer suspendiert. Der entstandene Schaum wurde zwischendurch immer wieder herunterzentrifugiert. Nach Zentrifugation der Spalthautsuspension bei 800 x g für 5 Minuten wurde der Überstand abgenommen und dieser nochmals bei 10000 x g für 2 Minuten zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Aus diesem Überstand wurde die Proteinkonzentration nach Bradford mit dem Bio-Rad® Protein Assay bestimmt.

**Aufarbeitung mit Mixermill:** Die Spalthäute wurden mit einem Skalpell in ca. 1x1mm große Stücke zerkleinert, in ein Eppendorf Tube mit 250 $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer und einer kleinen Wolframkugel zusammengeführt. Bei 30Hz wurden die Spalthäute 3x 90sec „zermahlen“, zwischen den einzelnen hochfrequenten Schütteldurchgängen wurden die Proben 2 Minuten bei 3500 x g zentrifugiert. Nach dem letzten Mahlvorgang 2 Minuten bei 1000 x g. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals bei 10000 x g 2 Minuten zentrifugiert, um unlösliches Material zu entfernen. Aus diesem Überstand wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Die Spalthauthomogenate wurden entweder direkt für die isoelektrische Fokussierung, der ersten Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese, verwendet bzw. wurden sie bei  $-86^{\circ}\text{C}$  bis zu der weiteren Verwendung gelagert. Spalthautpools junger und alternder Haut wurden aus den Einzelproben zu gleichen Proteinanteilen gebildet.



## 4.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Als Standard wurden 0, 4, 8, 12 und 16µg Ovalalbumin verwendet, die zuvor angesetzt und in Aliquots tiefgefroren waren. Zur Proteinbestimmung wurden die Aliquots aufgetaut, je 100µl Standard mit 600µl ddH<sub>2</sub>O und 100µl 0,5M NaOH, von den Proben wurden 5µl mit 700µl ddH<sub>2</sub>O und 100µl 0,5M NaOH zusammen pipettiert. Anschließend wurden die Standards und Proben mit 200µl BioRad® Färbereagenz versetzt und gevortext, in Küvetten umgefüllt und die Extinktion bei 595nm gemessen.

## 4.3 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Das Proteom einer Zelle oder eines Mikroorganismus besteht aus vielen tausend Proteinen. Die Methode der Wahl zur Auftrennung eines komplexen Proteingemischs ist die zweidimensionale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (2D-PAGE) (O'Farrell 1975, Klose 1975), mit deren Hilfe Proteine gemäß ihrem isoelektrischen Punkt in der isoelektrischen Fokussierung (IEF) und ihrer Größe bzw. ihrem Molekulargewichts (MG) über die Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) in der zweiten Dimension aufgetrennt werden. Die zweidimensionale Gelelektrophorese bietet damit die Möglichkeit, ein komplexes Proteingemisch hoch auflösend aufzutrennen.

### 4.3.1 Die isoelektrische Fokussierung (IEF)

Proteine sind amphoterische Moleküle, d.h. sie tragen je nach dem pH-Wert ihrer Umgebung positive oder negative Ladungen, bzw. verhalten sie sich an ihrem isoelektrischen Punkt (pI), an dem ihre Nettoladung - die Summe aller negativen und positiven Ladungen an den Aminosäuren-Seitengruppen - Null beträgt, als ein neutral geladenes Molekül. Während der isoelektrischen Fokussierung werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen innerhalb eines pH-Gradienten in einem elektrischen Feld nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung ist eine Endpunktmethode, bei der die Proteine auf der gesamten Trennstrecke in scharfe Proteinzonen voneinander abgegrenzt werden.

Die isoelektrische Fokussierung wurde auf einem IPGphor™ Isoelectric Focusing System mit immobilisierten linearen IPG-Strips (Immobiline DryStrips®) durchgeführt. Eine Übersicht der Proteinmuster wurde in dem pH-Bereich 3-10 erreicht, für die weitere Analyse wurden die Proteine in Zoom-in-Bereichen pH 4-7 und pH 6-9 aufgetrennt. Dazu wurden 250µg Protein für den pH-Bereich 3-10, 500µg Protein für pH 4-7 und 6-9 aufgetragen. Die Spalthauthomogenate wurden mit dem Homogenisierungspuffer auf die folgenden Konzentrationen verdünnt, um gleich bleibende Salzkonzentrationen während der ersten Dimension zu gewährleisten und somit auch eine bessere Vergleichbarkeit der 2D-Gele miteinander: 2,5mg/ml für den pH-Bereich 3-10 und 5mg/ml für die pH-Bereiche 4-7 bzw. 6-9. Jeweils 100µl Homogenat wurden mit Rehydratationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 450µl gebracht. Die Proben wurden an ein Ende der IPG-Kammern (IPG strip holders) pipettiert, die Immobiline DryStrips® mit der Gelseite zum Proben-Rehydratationspuffer-Gemisch aufgelegt, so dass die Probe den gesamten IPG-Strip benetzte. Die IPG-Strips wurden daraufhin mit Cover Fluid® überschichtet, um ein Austrocknen des IPG-Strips und der Probe während der folgenden 12-stündigen Rehydrierung bei 20°C zu vermeiden. Nach dieser Rehydrierung wurde die isoelektrische Fokussierung mit ansteigendem Spannungsaufbau automatisch gestartet (IPGphor isoelectric focusing system): 1h à 500V, 1h à 1000V und abschließend eine Spannung von 8000V angelegt, die je nach pH-Bereich verschieden lange aufrecht erhalten wurde (siehe Tab.1). Nach der IEF wurden die Strips entweder bei -86°C gelagert oder sofort equilibriert (siehe unten) und auf die zweite Dimension aufgetragen.

**Tabelle 1:** Zeitschema für die isoelektrische Fokussierung in den jeweiligen pH-Bereichen für das IPGphor isoelectric focusing system (Amersham).

	<b>IEF to the steady state</b>	<b>Voltstunden (Vhrs) gesamt</b>
<b>IEF pH 3-10</b>	7h à 8000V	gesamt 56 000 Vhrs
<b>IEF pH 4-7</b>	8h à 8000V	gesamt 64 000 Vhrs
<b>IEF pH 6-9</b>	12h à 8000V	gesamt 96 000 Vhrs
<b>IEF pH 4.5-5.5</b>	14 h à 8000V	gesamt 112 000 Vhrs
<b>IEF pH 5.5-6.7</b>	14 h à 8000V	gesamt 112 000 Vhrs

### 4.3.2 Die 2. Dimension (SDS-PAGE)

Es wurden 1mm dicke, 12.5%-ige Acrylamid-Gele (24 cm x 18 cm) im EttanDalt II Gel Casting System selbst gegossen. Wurden nicht alle Gele zugleich verwendet wurden die Gelplatten in Gel-Aufbewahrungslösung bei +4°C aufbewahrt.

Die IPG-Strips wurden nacheinander in Equilibrierungspuffer 1 und anschließend in Equilibrierungspuffer 2 inkubiert. Dazu wurden die IPG-Strips in einen Plastiktube (Equilibration Tube Set) gelegt und in 4ml Equilibrierungspuffer 1 bzw. 2 für jeweils 15 Minuten auf einem Taumelschüttler leicht geschwenkt. Nach dem zweiten Equilibrierungsschritt wurden die IPG-Strips in Elektrodenpuffer getaucht, um überschüssigen Equilibrierungspuffer zu entfernen, abgestreift und auf die 2. Dimension, dem SDS-Gel, aufgetragen. Die equilibrierten IPG-Strips wurden mit der Plastikbeschichtung an die hintere Glasplatte und mit dem sauren Ende zur linken Seite weisend auf die SDS-Polyacrylamidgele gelegt, mit einem Spatel leicht ans Gel gedrückt und mit heißer 0.5%iger Agarose (gelöst im Elektrophoresepuffer) überschichtet. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein Regenbogenmarker verwendet. Es wurden 3µl auf ein ca. 2 x 2mm großes Stück Filterpapier pipettiert, eine kleine Tasche mit einem Spatel in die erkaltete Agarose am sauren Ende der IPG-Strips geritzt, das Filterpapier mit dem Regenbogenmarker neben dem IPG-Strip platziert und anschließend die Tasche wieder mit warmer Agarose verschlossen. Nachdem die Agarose erkaltet war, wurden bis zu 12 Gelkammern senkrecht hintereinander in das EttanDalt II System platziert und die Elektrophoresekammer mit 10L Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Zunächst ließ man die Proteinprobe 30 Minuten bei 5 W/Gel in das Gel einlaufen, danach wurde die Elektrophorese bei 20 W/Gel (maximal 120 W Gesamtspannung, 20°C) gestartet, bzw. bei 100 V über Nacht, bis die Bromphenolblau-Linie das untere Ende des Gels erreicht hatte. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gelkammern geöffnet, die Gele mit Hilfe einer Folie von den Gelkammern aufgenommen, in Färbewannen gelegt und je nach dem weiteren Färbevorgang entsprechend fixiert (siehe MALDI-taugliche Silberfärbung).

#### 4.4 Gelanalyse

Die 2D-Gele wurden mit dem X-finity pro 42 Scanner digitalisiert. Die Bildanalyse erfolgte anschließend manuell auf dem Leuchttisch.

#### 4.5 Spot-Picking

Nach der Auswertung der 2D-Gele wurden Spots, die unterschiedlich stark in Gelen verschiedener Altersgruppen exprimiert waren, aus den Gelen gestanzt. Dies erfolgte mit Hilfe einer Pipette. Die Pipettenspitze wurde auf die Größe des Spots zugeschnitten, der Spot ausgestanzt, mit der Pipette angesaugt und in ein Eppendorf Tube überführt. Um eine möglichst hohe Konzentration an Protein für die Analyse im Massenspektrometer zu erreichen, wurden dieselben Spots aus mehreren Gelen ausgestanzt und gepoolt.

#### 4.6 Nu-PAGE® (eindimensionale Gelelektrophorese)

Zum Nachweis von quantitativen Veränderungen der Proteinkonzentration zwischen alter und junger Spalthaut der im MALDI-Q-TOF identifizierten Spots wurden die Spalthauthomogenate zunächst durch eindimensionale Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen bei neutralen pH-Bedingungen mit Hilfe des NuPAGE® Bis-Tris Electrophoresis Systems entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die dazu verwendeten Gele setzen sich aus einem Gradientengel (4-12%) zusammen. Die Spalthauthomogenate wurden auf 13,3µg/10µl mit Homogenisierungspuffer eingestellt und mit 4x SDS-Probenpuffer im Verhältnis 4:1 gemischt. Die Endkonzentration betrug somit 1µg/µl. Die enthaltenen Proteine wurden anschließend durch fünfminütiges Aufkochen bei 95°C mit Roti-Load denaturiert. Jeweils 20µg Probe pro Well wurde auf ein NuPAGE®-Gel geladen, und die Proteine anschließend mit Hilfe eines kontinuierlichen MES-SDS-Puffers bei einer konstanten Spannung von 200V pro Gel innerhalb von 35 Minuten fraktioniert.

## 4.7 Western-Blot

Beim Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von einem Trenngel auf einen Trägerfilter, hier eine PVDF-Membran, übertragen. Dabei wird eine Kopie des Gels erzeugt, wobei die Proteine auf den Filtern immobilisiert werden. Das ursprünglich im Gel enthaltene Trennmuster der Proteinmoleküle bleibt nach der Übertragung erhalten und unter geeigneten Bedingungen bleibt beim Transfer sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten. Nach dem Transfer sind die Proteine für die Behandlung mit z.B. Antikörpern zugänglich, so dass qualitative und quantitative Bestimmungen einzelner Proteine in einem komplexen Proteingemisch als auch deren Identifikation möglich sind.

Gleiche Mengen Spalthauthomogenat wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend in Transferpuffer bei einer Spannung von 30V pro Gel auf eine PVDF-Membran in 60-90 Minuten übertragen. Für den Elektrotransfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde die NuPAGE<sup>®</sup> Blotkammer verwendet. Dazu wurden die acht Blotpads, zwei Filterpapiere und die zuvor kurz in Methanol geschwenkte und anschließend kurz in ddH<sub>2</sub>O gespülte PVDF-Membran mit Transferpuffer getränkt. Zwei Blotpads wurden daraufhin auf die Kathode des Blotmodules gelegt, darauf das erste Filterpapier, das Gel, die PVDF-Membran und schließlich das zweite Filterpapier. Zum Abschluss wurden die verbliebenen Blotpads und die Anode aufgelegt, in die Apparatur gestellt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Durch Aufsetzen der Anode wurde das System geschlossen und für 1h eine Spannung von 30V angelegt.

Die Blockierung der Membran erfolgte mit Blockierungspuffer (Tropix-Boehringer- oder BSA-Blockierungspuffer je nach dem Verhalten des primären Antikörpers) für 1h bei Raumtemperatur, um unspezifische Bindungen der später auf die Membran gebrachten Antikörper weitestgehend zu reduzieren. Nach zweimaligen Schwenken der Membran in TBS-T folgte die Inkubation des primären Antikörpers für 1h bei Raumtemperatur. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit TBS-T folgte die einstündige Inkubation mit dem jeweiligen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Membran wurde zur Entfernung von unspezifisch gebundenem Sekundärantikörper erneut viermal fünf Minuten mit TBS-T gewaschen, und der HRP-gekoppelte Sekundärantikörper nach dem Prinzip der verstärkten Chemolumineszenz entsprechend dem Herstellerprotokoll nachgewiesen.

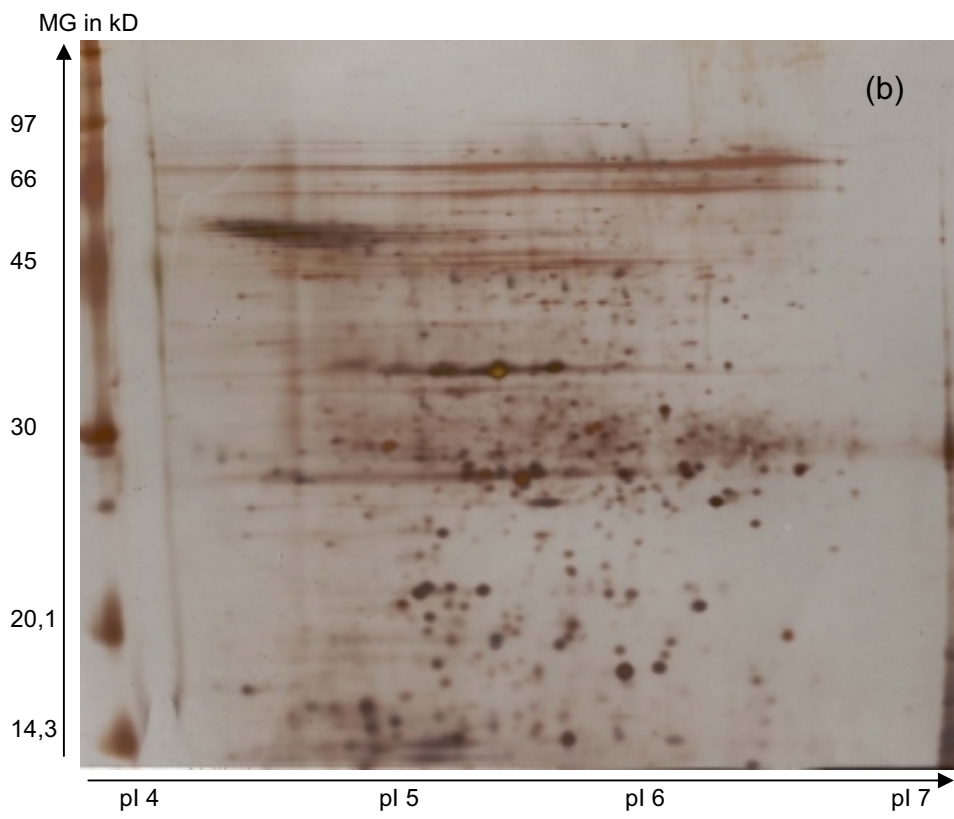
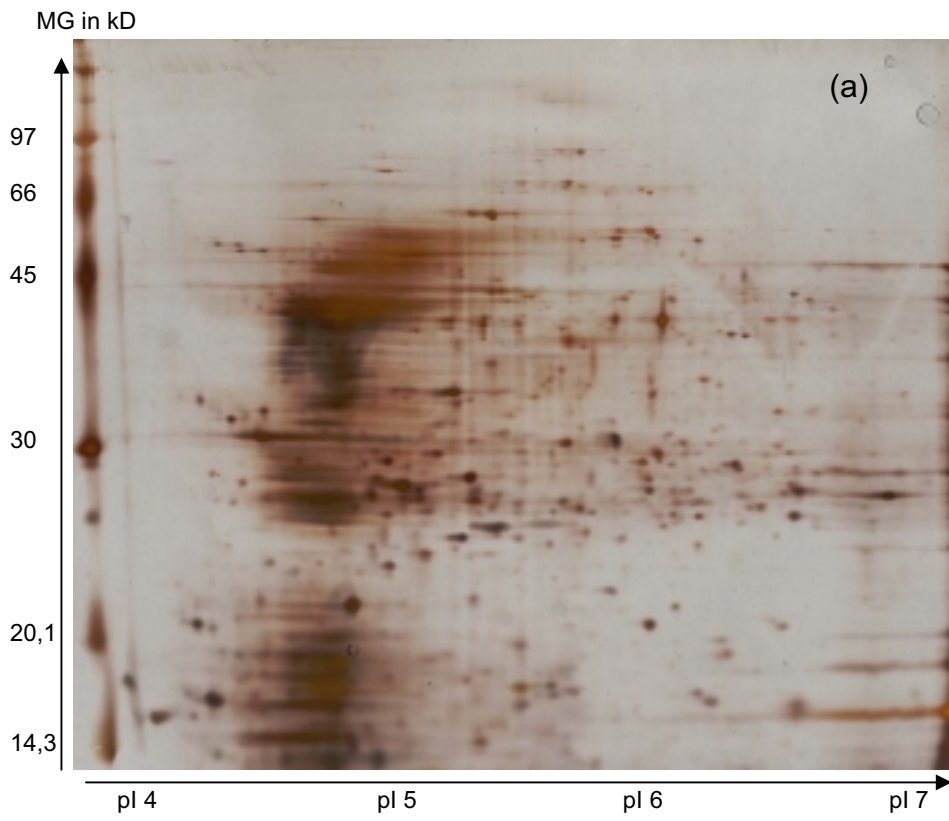
## 5 Ergebnisse

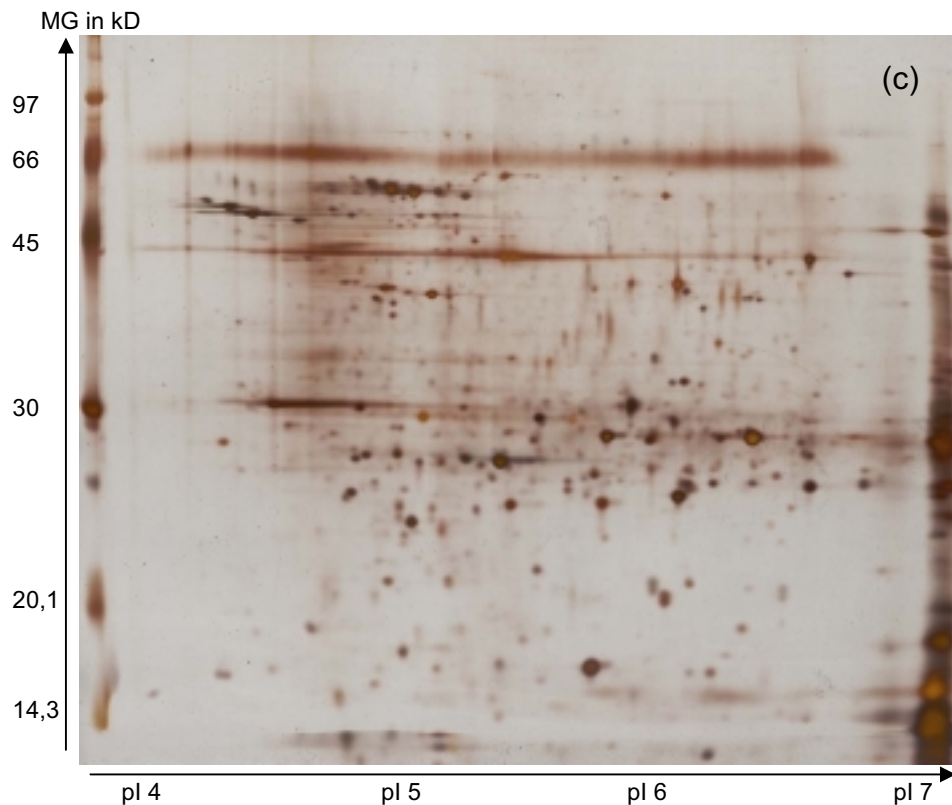
---

### 5.1 Spalthaut zur Beurteilung der epidermalen Strukturen und Veränderungen während des Alterns

Zur Untersuchung der in Abschnitt 1 formulierten Fragestellungen galt es zunächst ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Epidermis zu finden. Epidermis ist mit der unter ihr liegenden Dermis verzahnt und über die epidermale-dermale Junctionszone verankert. Diese Junctionszone hält massiven Scherkräften stand. Um die Epidermis isoliert betrachten zu können, muss man Vollhaut einer enzymatischen Behandlung unterziehen und anschließend die Epidermis abpräparieren. Unter der enzymatischen Behandlung mit Thermolysin werden nicht nur Strukturproteine der Junctionszone zerstört, sondern auch die zu untersuchenden Proteine der Epidermis. Um einen qualitativen Vergleich von 2D-Gelen durchführen zu können ist man auf scharf umschriebene Proteinspots und wenig ‚Hintergrundrauschen‘ angewiesen.

Im Folgenden wurde das Proteinmuster des epidermalen und dermalen Anteils Thermolysin-behandelter Vollhaut, sowie Spalthaut eines Patienten untersucht (Proben wurden freundlicher Weise von Prof. Das, Amsterdam zur Verfügung gestellt). Wie zu erwarten, ist das Proteinmuster des epidermalen Anteils stark ‚verunreinigt‘. In Abbildung 2a) erkennt man die durch eine Silberfärbung sichtbaren Proteinflächen, die scheinbar aus Proteinfragmenten bestehen, die sich nicht weiter auftrennen lassen (um pI 5). Im dermalen Anteil (Abbildung 2b) zeigen sich weniger flächenhafte Proteinfelder, wahrscheinlich aufgrund der Beschaffenheit der Dermis mit überwiegendem Anteil von Strukturproteinen (Kollagen), die relativ Hitze- und Enzym-beständig sind. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 2c) das Proteinmuster nicht-enzymatisch behandelter Spalthaut desselben Probanden.





**Abbildung 2:** 2D-PAGE von Thermolysin-behandelter Vollhaut zur Separation von Epidermis (a) und Dermis (b) im Vergleich zu einer Spalthautprobe (c) desselben Probanden (Proben wurden freundlicherweise von Prof. Das, Amsterdam zur Verfügung gestellt). Es wurden je 500 $\mu$ g Proteinhomogenat auf einen IPG-Streifen aufgetragen und mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) fokussiert. Anschließend erfolgte die zweite Dimension, die elektrophoretische Auftrennung der Proteine auf einem 12,5%-SDS-Gel nach den jeweiligen Molekulargewichten. Abb. 2 (a) zeigt ein rein epidermales Proteinmuster. Es sind nur wenige markante Proteinspots abgrenzbar. Ein Großteil des Materials konnte zwischen pI 4 und 5 nicht sauber aufgetrennt werden, wahrscheinlich als Ausdruck von angedauten Proteinfragmenten. In Abb. 2 (b) wurde das Homogenat des dermalen Anteils der Thermolysin-behandelten Vollhaut aufgetrennt. Hier scheinen die Proteine weniger stark durch die Enzymbehandlung geschädigt worden zu sein, was u.a. auch auf den hohen Anteil an Kollagenen und anderen fibrillären Proteinen zurückzuführen ist. Abb. 2 (c) zeigt ein Spalthauthomogenat desselben Probanden. Hier finden sich die geringsten Artefakte und eine relativ scharfe Proteinauftrennung.



## 5.2 Unterschiede im Proteinmuster zwischen junger und gealterter Haut

Die von den Patienten gewonnenen Spalthäute wurden in zwei Gruppen bezüglich ihres Alters aufgeteilt. Bis einschließlich dem 40. Lebensjahr wurden die Spalthäute der Gruppe A (= jung) zugeteilt. Dieser Gruppe konnten insgesamt 9 Probanden zugeordnet werden. Der Gruppe B (=alt) wurden alle Probanden älter als 55 Jahre zugeordnet. Die Spalthäute wurden aus gesunden Hautarealen zur Wunddeckung gewonnen.

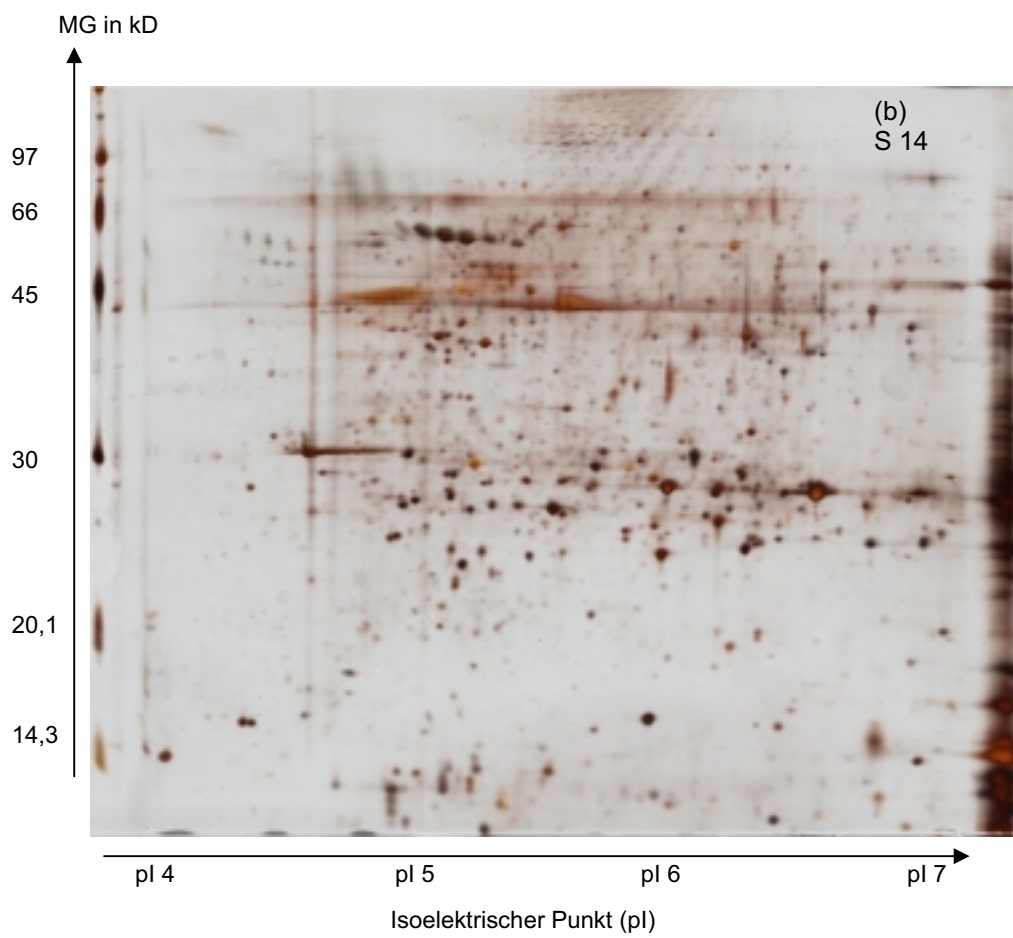
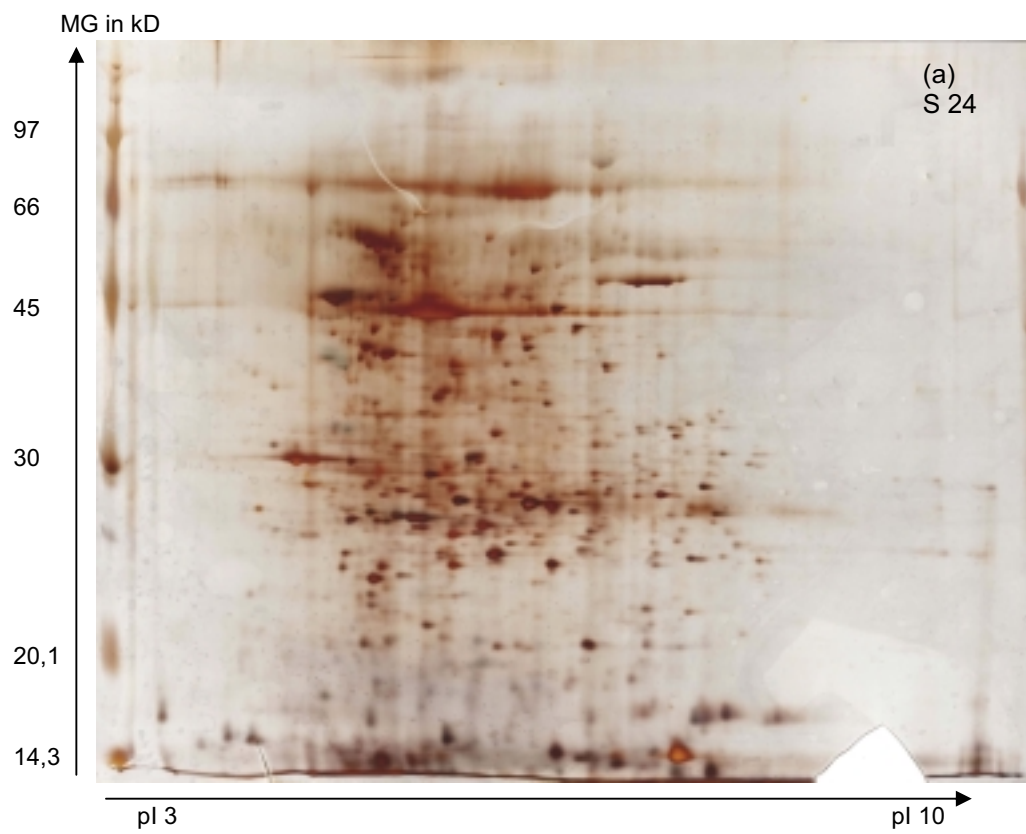
### Gruppe A:

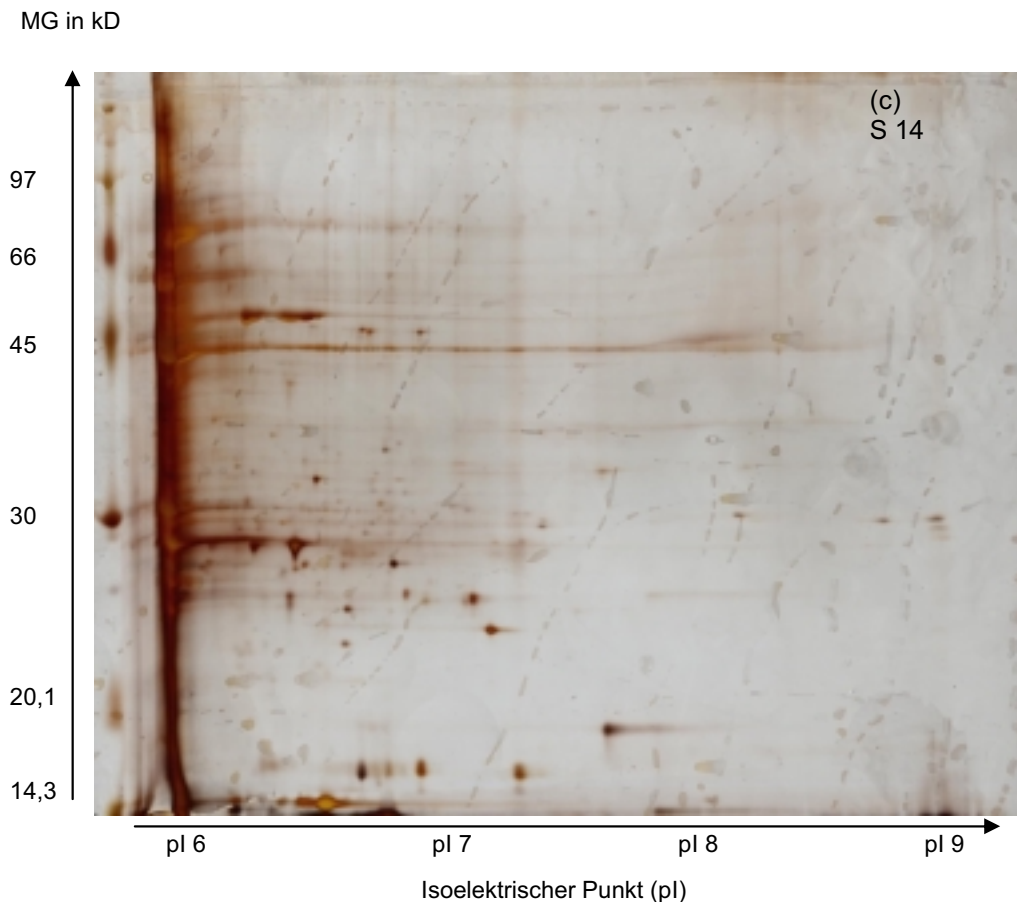
<b>ID</b>	3	4	5	6	11	12	13	15	16
<b>Age</b>	33	30	25	31	19	30	29	39	32
<b>Sex</b>	m	m	f	m	f	f	m	m	m

### Gruppe B:

<b>ID</b>	1	2	7	8	9	10	17	18	19	21	22	23	24	25	26	27	40
<b>Age</b>	72	67	88	65	61	78	64	61	56	64	90	65	62	69	63	90	76
<b>Sex</b>	f	f	f	f	m	f	m	f	m	m	m	m	m	m	f	f	f

Die folgenden 2D-Gele zeigen die Proteinmuster aus homogenisierter Spalthaut. Die Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese von Proteinextrakten erfolgte zunächst im pH-Bereich 3-10, um einen groben Überblick über das Proteinmuster der Keratinozyten zu erhalten. In einem weiteren Schritt lassen sich die Proteine in engeren pH-Bereichen auftrennen, mit dem Ziel einzelne Proteinspots vergleichen und identifizieren zu können. In den Abbildungen 3b) und 3c) sind Spalthauthomogenate in den isoelektrischen Bereichen zwischen 4 und 7 sowie 6 und 9 aufgetrennt worden. Der Großteil des Proteoms von Keratinozyten scheint zwischen den isoelektrischen Punkten 4 und 7 zu liegen. Das Übersichts-2D-Gel lässt sich mit dem „Zoom-in“-2D-Gel nur relativ schlecht vergleichen. Man kann aber einige grobe Proteinpunkte (Abbildung 3) aufgrund des ungefähren Molekulargewichts einander zuordnen. Im „Zoom-in“-Bereich zwischen pI 6 und 9 gestaltet sich dies schwieriger, da weniger markante Proteinspots in den höheren pH-Bereichen vorhanden sind.



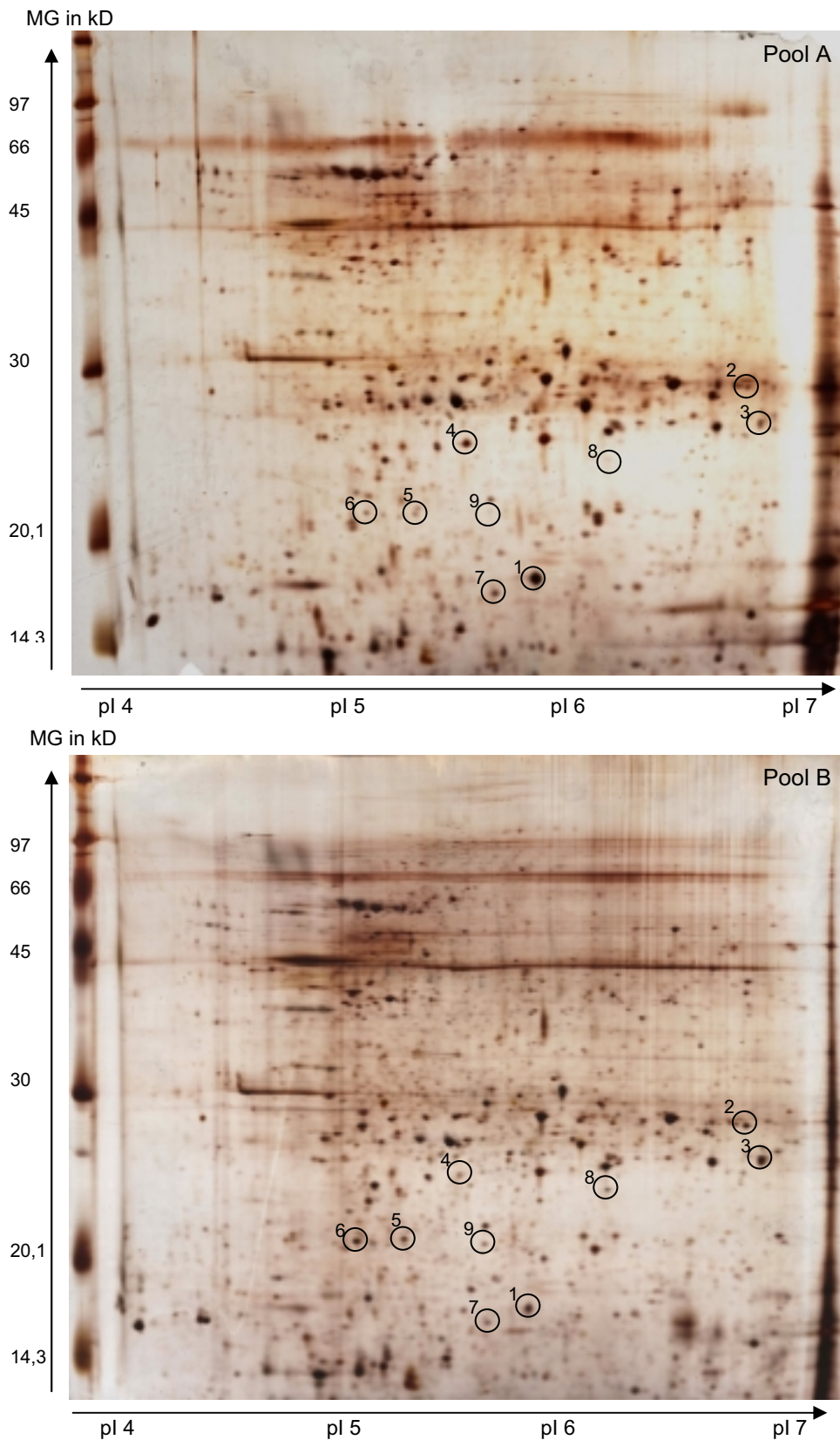


**Abbildung 3:** 2D-PAGE von Spalthauthomogenaten im pH-Bereich 3-10 (a), 4-7 (b) und 6-9 (c). Für den pH-Bereich 3-10 wurden 250 $\mu$ g Protein aufgetragen, in den pH-Bereichen 4-7 und 6-9 jeweils 500 $\mu$ g Protein. Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden sie auf einem 12.5% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Großteil der Proteine findet sich zwischen pI 4 und 8, so dass in den nachfolgenden Zoom-in-Bereichen die Proteine weiter aufgefächert wurden. Der Hauptanteil der auftrennbaren Proteine liegt zwischen pI 4 und 7, so dass dieser Bereich für die folgenden Untersuchungen ausgewählt wurde.

Da die Auftrennung in stark basischen ( $>10$ ) und stark sauren ( $<3$ ) pH-Bereichen sehr schwierig und kaum reproduzierbar ist, wurde darauf nicht weiter eingegangen. Im pH-Bereich 4-7 konnten die besten Ergebnisse bezüglich der Auflösung und der Proteinverteilungsbreite der Spalthäute erreicht werden. Die einzelnen Proteinspots lassen sich in diesem pH-Bereich gut auftrennen, ohne dass massive Überlagerungen auftreten. Die Auftrennung der höhermolekularen Proteine war nur möglich durch längere Elektrophoresezeiten und den Verlust der niedermolekularen Proteine bei einer fraglichen Reproduzierbarkeit, so dass ebenfalls auf die weitere Auftrennung der höher molekularen Proteine verzichtet wurde.

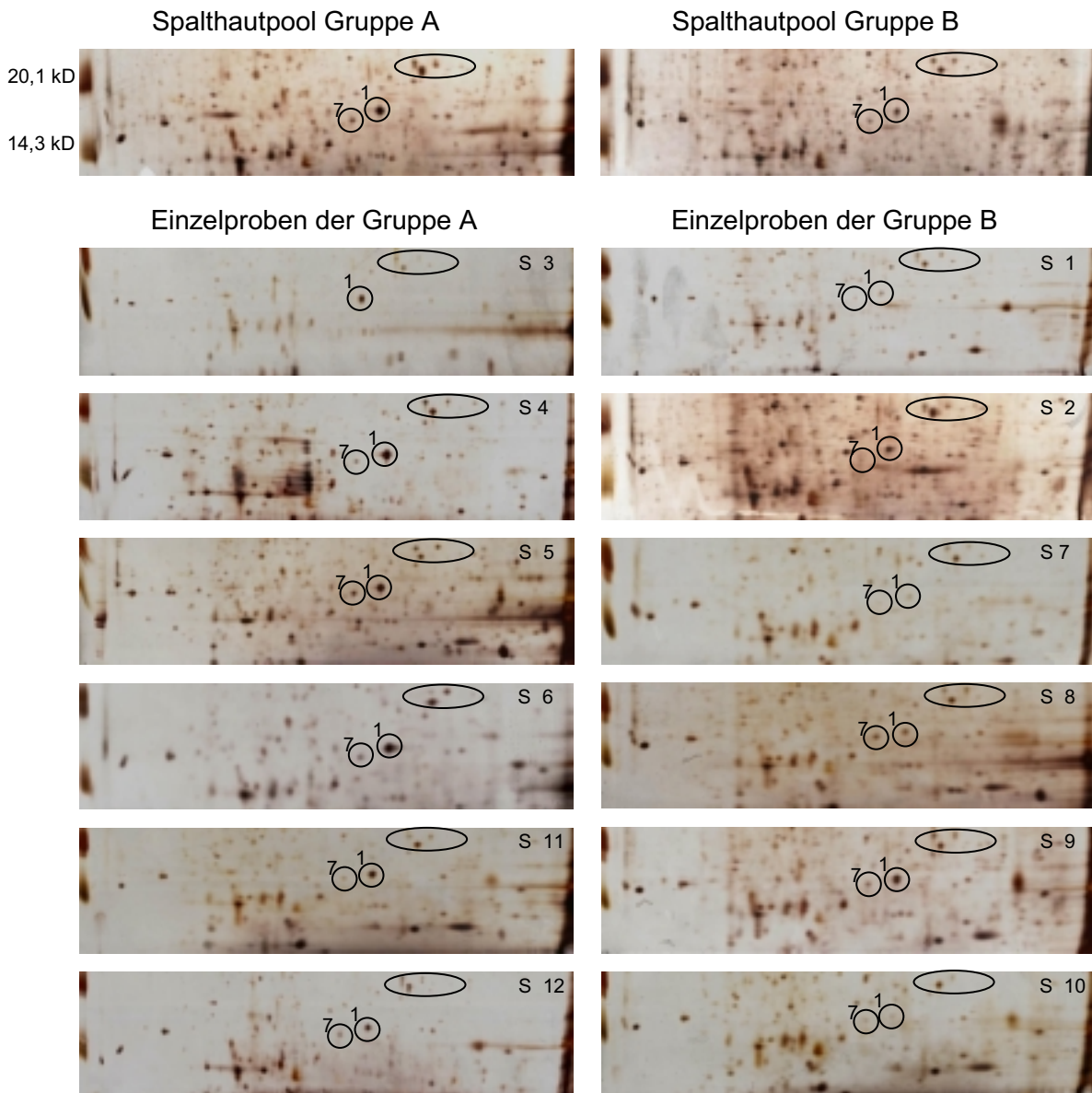
Von den Spalthauthomogenaten der Gruppe A sowie von den Spalthauthomogenaten der Gruppe B wurden jeweils zwei Spalthautpoole mit anteilig denselben Proteinkonzentrationen gebildet, um zunächst eine grobe Übersicht über die Proteinmuster zwischen Keratinozyten junger und gealterter Probanden zu erhalten. Pool A enthält Spalthauthomogenat 3, 4, 5, 6, 11 und 12, Pool B Spalthauthomogenat 1, 2, 7, 8, 9 und 10. Die Proteinauftrennung erfolgte zwischen den isoelektrischen Punkten 4 und 7. Abbildung 4 zeigt die Pool-2D-Gele der Gruppe A und Gruppe B. Wie zu vermuten war, zeigen sich unterschiedliche Proteinmuster in den beiden Altersgruppen. Vor allem im niedermolekularen Bereich zeigen sich Abweichungen im Proteinmuster. In den Bereichen höheren Molekulargewichts können aufgrund der schwächeren Auftrennung keine eindeutigen Veränderungen beschrieben werden (siehe Abb. 4). Einige ausgesuchte Spots der mit einer sensitiven Silberfärbung (Heukeshoven/Dernick, 1985) dargestellten Proteinveränderungen sind in den folgenden beiden Gelen der gepoolten Spalthauthomogenate markiert. Es fällt auf, dass vor allem Spot 1 in der Gruppe A stärker exprimiert zu sein scheint als in Gruppe B. Ebenso scheint dies der Fall mit Spot 4 und Spot 7 zu sein. In der Gruppe B dagegen scheinen die Spots 2, 3, 5, 6, 8 und 9 stärker exprimiert zu sein. Die vergleichende Analyse der beiden Pool-2D-Gele ließe noch weitere unterschiedliche Expressionsmuster bestimmter Proteinmotive zu. Die folgenden Einzelgele der jeweiligen Poole werden zeigen, dass sich diese Veränderungen nicht homogen einer bestimmten Gruppe zuordnen lassen. Da in dieser Arbeit speziell auf altersabhängige Proteinveränderungen eingegangen werden soll, wurden solche interindividuellen Veränderungen vernachlässigt.

Um die scheinbar verschieden stark exprimierten Proteine in den 2D-Gelen der Einzelproben besser vergleichen zu können, wurden die 2D-Gele überlappend in drei Fragmente unterteilt, und diese mit dem entsprechenden 2D-Pool-Gel verglichen.

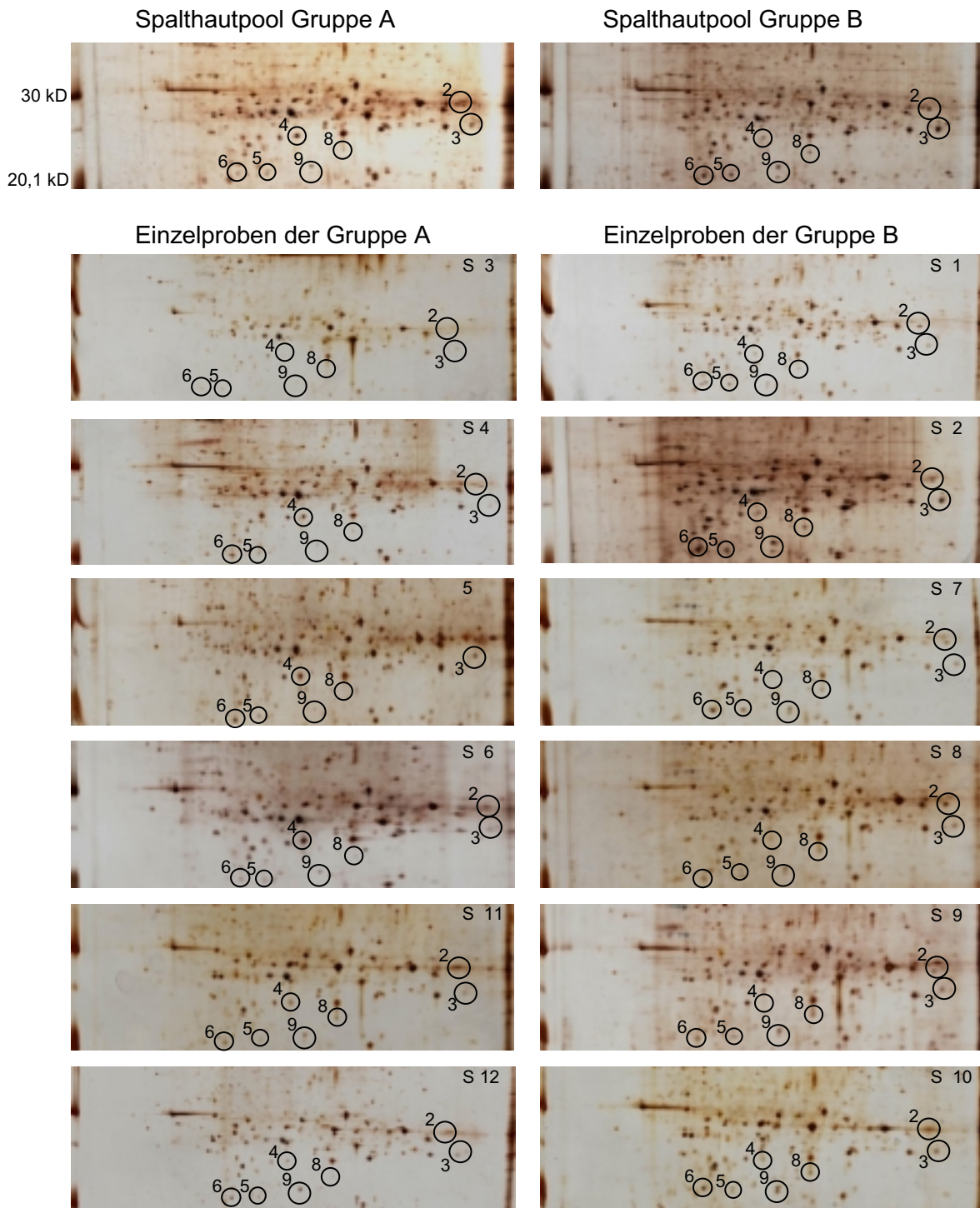


**Abbildung 4:** Zweidimensionale Gelelektrophorese eines Spalthautpools der Gruppe A (oben) und der Gruppe B (unten). Je 500 µg Protein wurden auf einen IPG-Strip pH 4-7 aufgetragen und isoelektrisch fokussiert, bevor sie auf einem 12,5% SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Anschließend wurden die Proteine mittels einer Silberfärbung dargestellt und die Gele digitalisiert. Es sind mehrere Spots markiert, die unterschiedlich stark exprimiert scheinen.

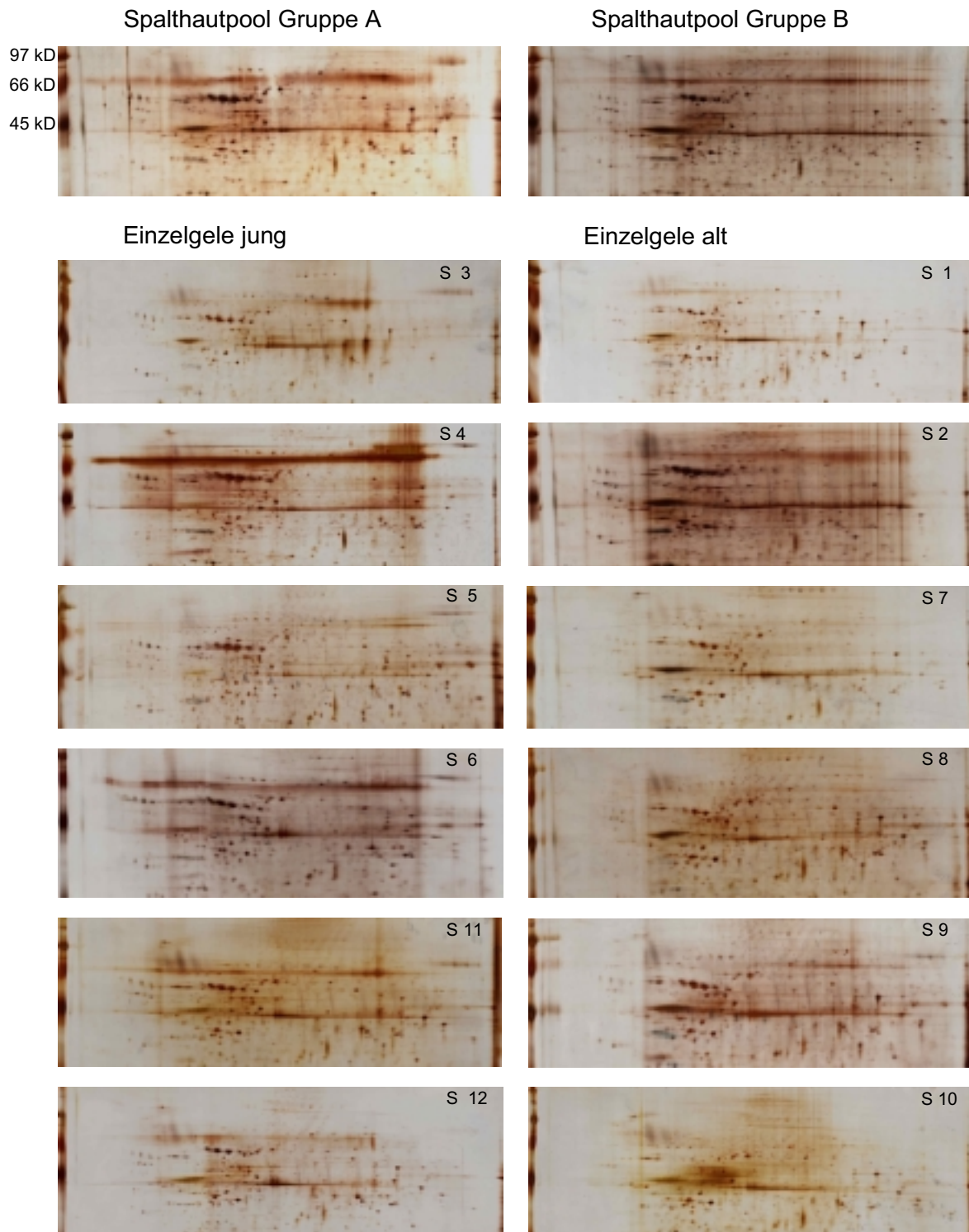




**Abbildung 5** zeigt Ausschnitte der 2D-Gele aus Spaltheadpools und den Einzelproben im Bereich um 14,3 bis 20,1 kD. Links sind die entsprechenden Einzelgele, die den Spalthead-Pool Gruppe A (jung) bilden, rechts die Einzelgele, die den Spalthead-Pool der Gruppe B (alt) bilden. Spot 1 und 7 scheinen in den Einzelgelen der Gruppe A durchgängig stärker exprimiert zu sein. Zur besseren Orientierung wurde ein in allen 2D-Gele auftretendes Proteinmotiv markiert (Ellipse).



**Abbildung 6** zeigt Ausschnitte der 2D-Gele aus Spalthautpools und den Einzelproben im Bereich um 20,1 bis 30 kD. Links die entsprechenden Einzelgele der Gruppe A (jung), rechts die Einzelgele der Gruppe B (alt). Spot 4 scheint in der Gruppe A, die Spots 2, 3, 5, 6, 7, 8 und 9 stärker in der Gruppe B exprimiert zu sein.



**Abbildung 7** zeigt Ausschnitte der 2D-Gele aus Spalthautpools und den Einzelproben im Bereich um 45 bis 97 kD. Links die entsprechenden Einzelgele der Gruppe A (jung), rechts die Einzelgele der Gruppe B (alt). Aufgrund der geringeren Auflösung der Proteine in den höhermolekularen Bereichen wird eine vergleichende Gelanalyse erschwert und es lassen sich nicht eindeutig bestimmte Variationen der Proteinmuster identifizieren.



Es zeigt sich, dass bestimmte Proteinspots in der 2D-PAGE in der Gruppe A und der Gruppe B etwa gleich exprimiert scheinen. Diejenigen Proteinspots, die in der vergleichenden Gelanalyse eine abweichende Expressierung zwischen den beiden Gruppen erfahren, wurden markiert.

Im Folgenden wurden die markierten Spots aus den Gelen gestanzt, um sie einer weiteren Analyse zu unterziehen. Dabei wurden die entsprechenden Proteinspots innerhalb einer Gruppe aus verschiedenen Gelen heraus gestanzt, gepoolt und der weiteren Proteinanalyse im MALDI-Q-TOF zugeführt.

### 5.3 Ansequenzierung und Identifikation der Proteinspots

#### 5.3.1 Transthyretin (TTR)

Die Identifizierung im MALDI-Q-TOF ergab, dass es sich bei Spot 1 um Transthyretin mit einem theoretisch ermitteltem Molekulargewicht von 12,835 kDa und einem kalkulierten isoelektrischen Punkt (pI) 5,33 handelt. Das aus dem 2D-Gel ermittelte Molekulargewicht liegt etwa bei 18 kD und der isoelektrischen Punkt bei etwa 5,5. Mit Hilfe von zwei Peptidfragmenten konnten die ermittelten Aminosäuresequenzen über die NCBI-nr-Datenbank genau diesem Protein zugeordnet werden. Ein 28 Aminosäuren umfassendes Peptid **TSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTK** mit einem ‚total score‘ von 42 und ein zweites 24 Aminosäuren umfassendes Peptid **YTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE** mit einem ‚total score‘ von 56 konnten Transthyretin (Prealbumin) zugeordnet werden. In einer zusätzlichen massenspektrometrischen Untersuchung konnte neben den bereits oben genannten Peptiden ein weiteres, 13 Aminosäuren umfassendes Peptid **GSPAINVAVHVFR** identifiziert werden. Die Peptide decken zusammen 44% von Transthyretin ab (Abbildung 8).

```

1   MASHRLLLLC LAGLVFVSEA GPTGTGESKC PLMVKVLDAV RGSPAINVAV
51  HVFRKAADDT WEPFASGKTS ESGELHGLTT EEEFVEGIYK VEIDTKSYWK
101 ALGISPFHEH AEVVFTANDS GPRRYTIAAL LSPYSYSTTA VVTNPKE

```

**Abbildung 8:** Vergleich der im MALDI-Q-TOF identifizierten Peptide aus Spot 1 mit der Sequenz von Transthyretin. Die übereinstimmenden Peptide sind unterstrichen.

### 5.3.2 Heat shock 27 kD protein

Die MALDI-Q-TOF-Analyse von Spot 2 ergab, dass es sich um ein Heat Shock Protein von 27 kD handelt mit einem theoretisch ermittelten Molekulargewicht von 22 754 kD und einem kalkulierten isoelektrischen Wert von 5,98. Das 17 Aminosäuren große Peptid **LATQSNEITIPVTFESR** sowie das 10 Aminosäuren umfassende Peptid **LFDQAFGLPR** stimmen in 12 % mit dem Heat Shock 27 kD Protein überein.

```

1    MTERRVPFSL LRGPSWDPFR DWYPHSRLFD QAFGLPRLPE EWSQWLGGSS
51   WPGYVRPLPP AAIESPAVAA PAYSRALSRQ LSSGVSEIRH TADRWRVSLD
101  VNHFAPDERT VKTKDGVVEI SGKHEELQDE HGYISRCFTR KYTLPPGVDP
151  TQVSSSLSPE GTLTVEAPMP KLATQSNEIT IPVTFESRAQ LGGPEAAKSD
201  ETAAK

```

**Abbildung 9:** Vergleich der im MALDI-Q-TOF identifizierten Peptide aus Spot 2 mit der Sequenz von Heat Shock 27 kD Protein. Die übereinstimmenden Peptide sind unterstrichen.

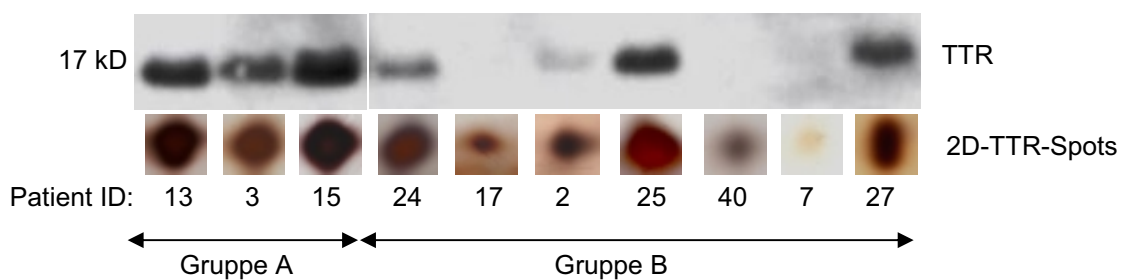
Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden von Herrn Dr. Friedrich Buck, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, UKE, vorgenommen.

Die Spots 4, 7, 8 und 9 konnten nicht identifiziert werden, da keine Massen detektiert werden konnten.

## 5.4 Nachweis mittels Western Blot

### 5.4.1 Untersuchungen zum Gehalt von Transthyretin in Keratinozyten (Spalthaut)

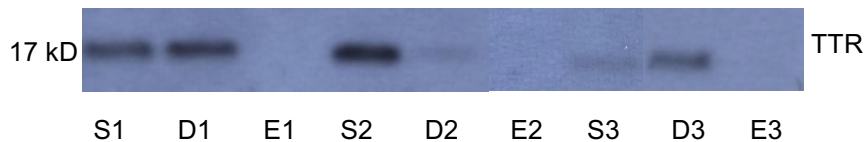
Die massenspektrometrische Untersuchung der identifizierten Proteine sollte in den folgenden Versuchen verifiziert werden. Die Abbildung 10 zeigt einen Immunoblot mit Transthyretin von Proben der Gruppe A und B. Nur die Proben 3, 2 und 7 sind die bereits bekannten Proben aus den Pool-2D-Gelen. Zum weiteren Vergleich sind die dem identifizierten Transthyretin entsprechenden Proteinspots zum Vergleich darunter dargestellt. Es besteht eine Korrelation zwischen den durch die Silberfärbung detektierten Proteine der 2D-Gele und der im Western Blot nachgewiesenen Konzentrationen von Transthyretin.



**Abbildung 10:** Transthyretin-Immunoblot von Spalthauthomogenaten. Je 100µg Probe wurden nach elektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Blotting auf eine PVDF-Membran auf Transthyretin detektiert. Die Proben zeigen verschieden starke Detektionsmuster, die in Relation mit den entsprechenden Transthyretin-Spots der 2D-Gele (Ausschnitte) stehen.

#### 5.4.2 Untersuchungen zum Transthyretin Gehalt in Epidermis und Dermis im Vergleich zu Spalthaut

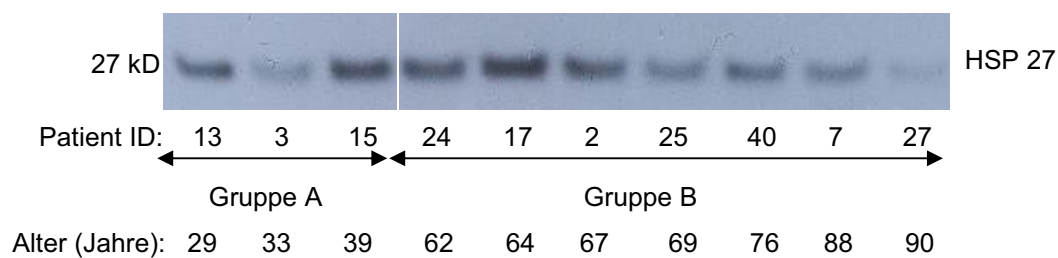
Transthyretin ließ sich, wie es auch schon die Analyse der zweidimensional aufgetrennten Proteine vermuten ließ, überwiegend in der Gruppe A nachweisen. In einer weiteren Untersuchung wurden die Spalthautproben sowie die enzymatisch getrennte Epidermis und Dermis von jeweils drei Probanden auf Transthyretin untersucht. Transthyretin konnte nur in der Spalthaut und etwas schwächer in der enzymatisch behandelten Dermis detektiert werden. In der enzymatisch behandelten Epidermis ließ sich Transthyretin nicht nachweisen.



**Abbildung 11:** Transthyretin-Immunoblot von Spalthaut (S1, S2, S3), Thermolysin-behandelter Dermis (D1, D2, D3) und Thermolysin-behandelter Epidermis (E1, E2, E3). Je 100µg Homogenat wurden mit einem Antikörper gegen Transthyretin (TTR) detektiert. Die Proben S1, D1 und E1, S2, D2 und E2 bzw. S3, D3 und E3 stammen jeweils von einem Patienten.

### 5.4.3 Untersuchungen zum Gehalt von Heat Shock 27 kD Protein (HSP 27) in Keratinozyten (Spalthaut)

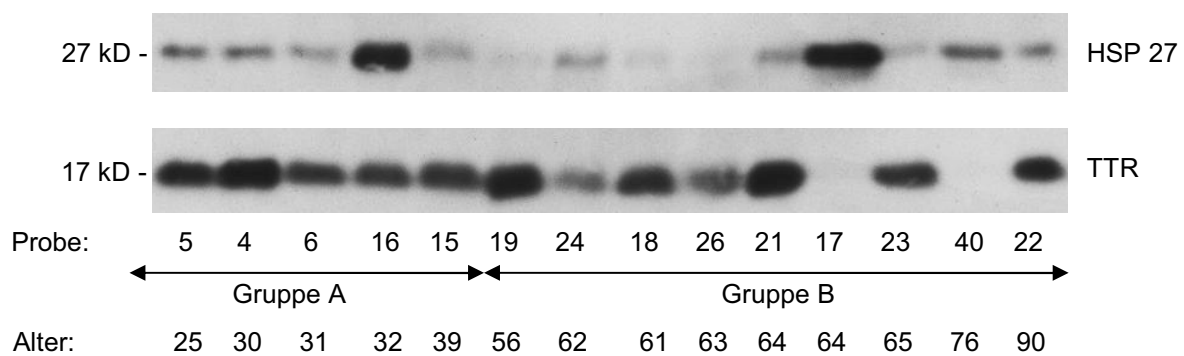
Der massenspektrometrische Nachweis vom Heat Shock 27 kD (HSP 27) Protein sollte in den folgenden Versuchen verifiziert werden. Die Abbildung 12 zeigt einen Immunoblot von Spalthauthomogenaten mit Nachweis von HSP 27. Die Proben wurden dabei chronologisch nach dem Alter aufgetragen, um eventuelle altersabhängige Veränderungen zu erkennen. HSP 27 wird in den drei Proben der Gruppe A relativ inkonstant exprimiert. In der Gruppe B scheint es zunächst in höheren Konzentrationen vorzuliegen, um dann wieder mit zunehmendem Alter scheinbar abzufallen.



**Abbildung 12:** HSP 27-Immunoblot von Spalthauthomogenaten. Die Proben zeigen verschieden stark ausgeprägte Detektionsmuster von HSP 27.

#### 5.4.4 Untersuchung von HSP 27 und Transthyretin in Spalthauthomogenaten

Abbildung 13 zeigt einen direkten Vergleich zwischen Transthyretin und HSP 27 der aufgetragenen Proben im Western Blot. In zwei Proben zeigt sich eine deutliche Expression von HSP 27 (Probe 16 und 17), und eine etwas geringere in Probe 40. Es scheint, als würde die Expression von HSP 27 und TTR negativ miteinander zu korrelieren mit der Ausnahme von Probe 16. Zusätzlich zeigt dieser Immunoblot eine mit dem Alter eher zunehmende Konzentration von HSP 27. In der Gruppe B wiederholen sich zu Versuch 5.4.3. nur die Proben 17, 40 und 27.



**Abbildung 13:** Transthyretin- und HSP 27 von Spalthauthomogenaten. Jeweils 100µg Spalthauthomogenat wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

## **6 Diskussion**

---

In den vorliegenden Untersuchungen wurde eine Kombination aus 2D-PAGE und Massenspektrometrie angewendet, um Proteinmuster aus Keratinozyten, und im Besonderen altersveränderliche Proteinexpressionen darzustellen. Als Modell dienten dabei Spalthäute, um möglichst einen hohen Anteil nativer Keratinozyten zu erhalten. Es konnte gezeigt werden, dass ein solches Spalthautmodell einsetzbar ist, und dass Proteine aus Keratinozyten mittels 2D-PAGE dargestellt werden können. Es konnten in den Proteinmustern verschieden stark exprimierte Proteine gezeigt werden. Massenspektrometrisch konnten zwei Proteine identifiziert werden. Dazu zählen das Plasmaprotein Transthyretin und das kleine Hitzeschockprotein HSP 27, das in mehreren Spots identifiziert werden konnte.

### **6.1 Das Keratinozyten-Proteom**

In dieser Arbeit ist es gelungen, dass Proteom von Epidermis über Spalthäute mit der Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung darzustellen. Dabei wurde versucht, die Spalthautproben möglichst zügig und nativ weiter zu verarbeiten, um den Proteinabbau bzw. die Proteinmodifikationen gering zu halten.

Es konnten einige hundert Proteine dargestellt werden, und es zeigten sich Unterschiede in der Proteinexpression zwischen junger und gealterter Haut. Von den markanten Proteinveränderungen in den gepoolten 2D-Gelen konnten allerdings nur zwei Proteinspots identifiziert werden. Aufgrund der sensitiven Silberfärbung kombiniert mit einer relativ geringen Probenmenge stand für die anschließende massenspektrometrische Analyse nicht ausreichend Material zur Verfügung. Die beiden Proteine konnten eindeutig als Transthyretin und HSP 27 identifiziert werden.

Celis et al. (1995) konnten in einer Proteomics-basierten humanen Keratinozyten-Datenbank über 3000 Proteine identifizieren, von denen ein Großteil auf post-translationale Modifikationen zurückzuführen ist. Um reine Keratinozytenproben zu gewinnen wurden die Hautproben einer mindestens 24-stündigen enzymatischen Behandlung unterworfen, um die Epidermis und damit im folgendem auch die Keratinozyten zu isolieren. Es bleibt fraglich, welche Proteinmodifikationen allein diese Behandlung hervorrufen kann, da sich die Zellen in einer Art Stresssituation befinden, und entsprechend neue Genprodukte produziert werden. Der Vorteil in diesem Verfahren liegt eindeutig darin, dass reine Keratinozytenlysate gewonnen werden können. Unter den hier identifizierten Proteinen finden sich auch die kleinen Hitzeschock-Proteine, die im Zytoplasma lokalisiert sind. Es finden sich verschiedene



Modifikationen von HSP 27 und HSP 28 mit variierenden pI-Werten, die am ehesten auf den Phosphorylierungsgrad der kleinen Hitzeschockproteine zurück schließen lassen.

Da in den von Celis et al. durchgeführten Untersuchungen Keratinozytenlysate verwendet wurden, wurde das reine Keratinozytenproteom untersucht. Proteine, die ebenfalls eine essentielle Rolle im Verband der Keratinozyten, der Epidermis, haben könnten, wurden hierbei nicht berücksichtigt. Transthyretin wurde nicht unter den von Celis et al. analysierten Proteinen beschrieben. Als ein extrazellulär vorliegendes Protein, das die Epidermis über die sie versorgende Dermis erreicht (Torma et al. 1983), kann Transthyretin nicht als Bestandteil des Keratinozytenproteoms nachgewiesen werden.

## 6.2 Transthyretin in alternder Epidermis

Transthyretin ist ein Plasmaprotein, das am Transport von Retinol über das Retinol-bindende Protein (RBP) und von Schilddrüsenhormonen beteiligt ist. Es wird überwiegend in der Leber synthetisiert. Die Haut gehört neben der Skelettmuskulatur zu den Hauptabbauorten. Als Transportprotein stellt es der Haut über RBP Retinol zur Verfügung. Retinol stellt einen kritischen Faktor des Differenzierungsprozesses der Keratinozyten dar. Es ist für das initiale Wachstum und die Reifung der Epidermis notwendig (eine reduzierte Retinolkonzentration in basalen epidermalen Strukturen führt zu vermindertem Heranreifen von transienten Keratinozyten), andererseits führt erst eine Abnahme der Retinolkonzentration zur Differenzierung der Keratinozyten (Fuchs E, 1981). Der proliferative Effekt von Retinoiden ist abhängig vom aktuellen proliferativen Status der Zelle (Varani, 1998). Befinden sich die Zellen in einem schnell proliferativen Zustand wirkt es inhibierend bzw. proliferativ bei sich in Wachstumsstillstand befindlichen Zellen. Des Weiteren induziert es gleichermaßen das Zellwachstum von UV-exponierter und auch UV-geschützter Haut (Varani, 1994). Le (2000) konnte zeigen, dass Retinoide das Wachstum von Mamma-Karzinomzellen, Ovarial-Karzinomzellen sowie von Plattenepithelkarzinomen (Squamous cell carcinoma, SCC) hemmen. Vahlquist (1996) stellte in einer Arbeit dar, dass die Retinoidkonzentration in Keratoakanthomen und Plattenepithelkarzinomen wesentlich höher ist im Vergleich zu Basalzellkarzinomen und seborrhoischen Keratosen, deren Retinoidkonzentrationen in etwa denen von gesunder Haut entsprachen. Daraus lässt sich schließen, dass die Einnahme von Vitamin A Präparaten einen gewissen Schutz vor der Entstehung bestimmter Tumorarten bieten könnte. Einige Untersuchungen an Mäusemodellen bestätigten zunächst die Theorie, dass Vitamin A in Form von Retinolsäure die epitheliale Zelldifferenzierung beeinflusst, und dass eine Tumorbelastung und ein Tumorprogress der Haut durch hoch dosierte Retinol-

Diäten reduziert werden kann (De Luca 1996). Fung et al. (2002 und 2003) zeigten dagegen, dass die Einnahme von Vitamin A Komponenten keine protektive Maßnahme gegenüber der Entstehung von Basalzellkarzinomen und von Plattenepithelkarzinomen darstellt. Es zeigte sich in der ersten klinischen Studie vielmehr ein kleines, aber signifikant höheres Risiko für die Probanden an BCC zu erkranken, die hochdosiert Vitamin A und Retinol zu sich genommen haben.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die epidermale Transthyretin-Konzentration im Alter abnimmt. Sowohl in der zweidimensionalen als auch in dem anschließend durchgeführten Western Blots konnte eine Abnahme der Transthyretin-Konzentration im Alter beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass den Keratinozyten möglicherweise im Alter ein entsprechend geringeres Angebot an Retinoiden zur Verfügung steht.

Ob die Abnahme von Transthyretin im Alter Ausdruck eines verringerten Retinolangebots, einer verminderten Syntheseleistung oder durch eine unzureichende nutritive Versorgung verursacht wird, ist nicht geklärt. Eine ausreichende nutritive Versorgung stellt besonders bei älteren Menschen ein schwerwiegendes Problem dar. Ob dies im Zusammenhang mit den niedrigen Transthyretin-Spiegeln steht, lässt sich nicht eindeutig beantworten. Auffällig ist zumindest, dass in unseren Versuchen die Transthyretin-Konzentrationen lediglich bei zwei Probanden der Gruppe B erhöht waren, nämlich bei einem 69-jährigen männlichen Probanden und einer 90-jährigen weiblichen Probandin. Chevalier (1999) hat den Retinol-Metabolismus bei länger andauernder Nahrungsrestriktion bei Ratten untersucht. Er konnte zeigen, dass sich zwar die hepatische Genexpression von RBP und Transthyretin weder mit dem Alter noch durch eine Nahrungsrestriktion verändert, allerdings waren die Plasma- und Leber-RBP-Konzentrationen bei mangelernährten Tieren niedriger als in ad libitum ernährten Tieren. Die allgemein gering erhöhten Plasma- Transthyretin und -Retinolsäuren-Konzentrationen wertete Chevalier als Adaptationsmechanismus auf post-transkriptionale Veränderungen bzw. einem erhöhten Abbau von RBP, um Retinoid-abhängige Funktionen aufrechterhalten zu können. Da wir keine Blutuntersuchungen der Probanden zu Transthyretin und Retinol vornahmen, lassen sich diese Ergebnisse nur mit Vorbehalt auf die hier untersuchten Probanden übertragen.

Transthyretin scheint in der Epidermis nicht intrazellulär vorzukommen, sondern nur extrazellulär in Form eines Transportproteins. Torma et al (1983) haben die Bestandteile bei subepidermaler und intraepidermaler Blasenbildung untersucht. Sie konnten zeigen, dass Transthyretin (= Prealbumin), RBP und Retinol extrazelluläre Bestandteile der Epidermis sind, welche die Epidermis passiv über die sie mit Nährstoffen versorgende Dermis erreichen. Aufgrund der Tatsache, dass Retinoide den Differenzierungsgrad der Keratinozyten erhöhen können, könnte ein Mangel an Transthyretin (als ein Transportprotein für Retinol zusammen

mit RBP) in alternder Epidermis die Entstehung von aktinischen Keratosen und Spinaliomen begünstigen. Andersson (2003) untersuchte die Wirkung von UV-Strahlung auf den zellulären Signalweg über die Expression von Retinoid-Rezeptoren in Keratinozyten und Melanozyten. Er zeigte, dass UV-Strahlung ein rasches Abfallen der Retinoid-Rezeptoren zur Folge hatte, die sich im Vergleich zu den Retinoid-Rezeptoren der Melanozyten nur langsam erholten. Daneben wurde das Proto-Onkogen c-jun untersucht, welches nach UV-Strahlung in Keratinozyten kaum verändert, in Melanozyten sogar stärker exprimiert wurde. Aufgrund dieser Konstellationen stünden insbesondere den Keratinozyten nach UV-Strahlung geringere Retinolkonzentrationen bei relativ erhöhten c-jun-Spiegeln gegenüber, welche die zelluläre Signaltransduktion beeinflussen und somit zu einer Tumorentwicklung mit beitragen könnten. Des Weiteren zeigte sich eine deutlich erhöhte Apoptoserate.

Transthyretin nimmt in der Differenzierung von Keratinozyten, zusammen mit RBP, als ein Transportprotein für Retinol eine entscheidende Rolle ein. Ob Transthyretin zusätzlich einen direkten Einfluss auf Keratinozyten ausübt, neben der Funktion als ein Transportprotein für Retinol, konnte in unseren Untersuchungen nicht geklärt werden. Es scheint aber für das intakte Wachstum der Epidermis unerlässlich zu sein.

### 6.3 HSP 27 in alternder Epidermis

Die Hitzeschock-Proteine (Heat Shock Protein, HSP) zählen zu den hoch konservierten Stressproteinen. Sie werden sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter Stressbedingungen wie z.B. UV-Exposition und Hitzeeinwirkung vermehrt exprimiert. Sie wirken als molekulare Chaperone im Proteinstoffwechsel. Molekulare Chaperone inhibieren die Aggregation von denaturierten Proteinen und entfalten sie ATP-abhängig. Des Weiteren sind Hitzeschockproteine an der Regulation und Kontrolle des Zellwachstums beteiligt, und besitzen wichtige regulatorische Eigenschaften in der Kontrolle der Apoptose und bei der Regulation von Rezeptoren, Kinasen und Strukturproteinen. Über eine „Prekonditionierung“ können sie tief greifende Verletzungen bzw. Zerstörungen von Gewebe vermindern (Morris 1996). HSP 27 zählt zu den kleinen Hitzeschockproteinen, die sowohl in Tumorzellen als auch in normalen Zellen auftreten. HSP 27 kann in verschiedenen humanen Zelltypen nachgewiesen werden wie im Uterus, Cervix, Plazenta, Thrombozyten und auch in der Haut (Ciocca 1993). Die Expression der HSP-Gene (HSPB1) wird über ein DNS-Motiv (heat shock element) reguliert. Es wirkt als molekulares Chaperon und in verschiedenen Signaltransduktionswegen als regulatorisches Protein nach dem Auftreten von zellulärem Stress und von toxischen Agenzien.

In Endometrium-Karzinomen korreliert die Expression von HSP 27 mit der Tumordifferenzierung, auch in Zervix-Karzinomen lässt sich HSP 27 überwiegend in gut differenzierten bis mäßig differenzierten Plattenepithelkarzinomen nachweisen. In der Haut wird HSP 27 hauptsächlich in suprabasalen Keratinozyten exprimiert. In einigen Hautveränderungen konnte HSP 27 ebenfalls nachgewiesen werden. Dazu zählen die Psoriasis und seborrhoische Keratosen (Trautinger 1995, Gandour Edwards 1994). In der Epidermis werden auch unter physiologischen Bedingungen neben HSP 27 vor allem die Hitzeschock-Proteine 60, 90 und 110 exprimiert (Wilson 2000). Jedes Hitzeschock-Protein übt eine spezifische essentielle Funktion innerhalb der Haut aus, was in verschiedenen Studien gezeigt wurde (Trautinger 1993, Chaveron 1995, Laplante 1998). HSP 27 korreliert mit dem zunehmenden Differenzierungsgrad der Keratinozyten und schützt die sich differenzierenden Zellen vor einer vorzeitigen Apoptose (Jantitsch 1998, Morris 2002). Laplante (1998) zeigte durch indirekte Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Mäuseepidermis nur eine geringe Expression von HSP 27 in basalen und niedrigen suprabasalen Keratinozyten. Dieses Phänomen wurde bereits von Trautinger (1995) beschrieben. HSP 27 wurde hier überwiegend in der suprabasalen Epidermis exprimiert, während in basalen Zellschichten keine Expression nachgewiesen werden konnte. Trautinger stellte zur Diskussion, ob HSP 27 daher ein Marker für differenzierte Epidermis bzw. seine Abwesenheit ein Marker für neoplastische Veränderungen darstellen könnte.

Der Zusammenhang zwischen den kleinen Hitzeschock-Proteinen und neoplastisch entarteten Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass sie in unterschiedlichen Geweben im Rahmen einer neoplastischen Veränderung vermehrt exprimiert werden, was unter anderem zu einer Hitze- und Medikamentenresistenz der transformierten Zellen führen kann (Landry 1989, Richards 1996). Sie zeigen auch, dass Hitzeschockproteine mit p53 einen Komplex bilden können. Insbesondere wurde dies bei HSP 70 nachgewiesen (Hainaut 1992, Pinhasi-Kimhin 1986). Quenneville (2002) untersuchte den Einfluss von p53 auf die Expression des Hitzeschockproteins 72 in Keratinozyten. Es zeigte sich eine deutliche Überproduktion von HSP 72 in Keratinozyten von p53-Knock-out-Mäusen bzw. eine Inhibition in Anwesenheit von p53. p53, das zu einem Grossteil in humanen Neoplasien mutiert ist, wurde daher als ein entscheidender Regulator der Stressantwort der Zelle gewertet.

In Versuch 5.4.3 zeigt sich in Gruppe B zunächst eine erhöhte Expression von HSP 27 (bei den 60 bis 70-jährigen Probanden), dann mit zunehmendem Alter wieder eine verminderte Expression. Dies könnte auf eine Abnahme der sich differenzierenden Zellschichten der Epidermis im Alter zurückzuführen sein. Bezogen auf die in der Einleitung erwähnte Alterungstheorie und direkt auf die *in vivo* Situation übertragen, könnte das Hayflick-Limit

bzw. die sich daraus indirekt ergebene Verkürzung der Telomerregion zu einer verminderten bis aufgehobenen Zellteilung führen und damit zu einer verminderten Differenzierung und Expression von HSP 27. Daneben könnte ein im Rahmen des Alterungsprozess' auftretendes Ungleichgewicht in verschiedenen physiologischen Systemen einen weiteren Ansatzpunkt für die ungleichmäßige Expression von HSP 27 darstellen. Als Folge eines Ungleichgewichts verschiedener protektiver Funktionen könnten Hitzeschock-Proteine im Allgemeinen weniger stark exprimiert werden. Studien haben gezeigt, dass die HSP 70-Expression in Hitze-gestressten Zellen z.B. der Lunge, Leber, Milz und des Herzens, sowie in ischämischen Situationen mit dem Alter zurückgeht. Als Ursache könnte eine altersabhängige Zunahme von funktionslosen oder denaturierten Proteinen vorliegen, die mit Hitzeschock-Faktoren (HSF) interagieren, und nachfolgend die Bindung an Hitzeschock-Elementen (HSE) stören und somit nicht an die Hitzeschockproteingen-Promoter-Region binden und die Transkription negativ beeinflussen (Pockley 2001).

Mit fortschreitendem Alter ist insgesamt eine höhere Belastung der Zellen mit fehlerhaft exprimierten Proteinen z.B. aufgrund von Störungen in Proteinfaltungsvorgängen oder erhöhter Radikalbildung anzunehmen. Insofern sollte sich bei intakter Syntheseleistung eine erhöhte Expression von Hitzeschockproteinen einstellen. In Versuch 5.4.4 zeigt sich in der Gruppe A eine relativ gleichmäßige Expression von HSP 27 und in Gruppe B vor allem bei den älteren Probanden eine deutliche Expression von HSP 27. Diese vermehrte Expression von HSP 27 könnte analog zu den Experimenten von Quenneville (2002) einen Hinweis auf den Stresszustand der Zelle geben. Direkte Stressfaktoren wie Hitze, UV-Strahlung, zytotoxische Substanzen aber auch neoplastische Veränderungen, die eine vermehrte Expression von HSP 27 als zytoprotektiven Faktor induzieren, könnten ursächlich in das Geschehen involviert sein. In Basalzellkarzinomen, die zu den häufigsten neoplastischen Veränderungen der Haut zählen und überwiegend durch UV-Kumulation induziert werden, konnte HSP 27 ebenfalls nachgewiesen werden (Bayerl 1999). Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass HSP 27 eine protektive Funktion im Rahmen der neoplastischen Veränderungen der Keratinozyten ausübt. Dagegen zeigen Plattenepithelkarzinome, keine Expression von HSP 27 (Gandour-Edwards 1994). Da Basalzellkarzinome zu den undifferenzierten Tumoren der Epidermis zählen, sollte HSP 27 eher weniger als ein Differenzierungsmarker betrachtet werden. Seine Abwesenheit könnte vielmehr einen Hinweis auf ein neoplastisches Geschehen geben können.

Ob die geringere Expression von HSP 27 in Versuch 5.4.3 auf einen geringeren Differenzierungszustand, auf neoplastische Veränderungen oder nur auf Zellen in weniger gestressten Zustand zurückzuführen ist, bleibt unklar.

#### 6.4 HSP 27 und TTR in der alternden Epidermis

In Versuch 5.4.4 (Abbildung 13) ist der Immunoblot von HSP 27 und Transthyretin dargestellt. Setzt man voraus, dass sich die Proben in einem vergleichbaren Differenzierungszustand befinden scheint eine gewisse Abhängigkeit im direkten Vergleich von HSP 27 mit Transthyretin zu existieren. In der Gruppe der älteren Probanden scheint es sogar, als würde HSP 27 negativ zu Transthyretin korrelieren. Dabei ist die Transthyretin-Konzentration in der Gruppe B nicht so homogen ausgebildet wie in der Gruppe A bzw. konnten bei zwei Proben der Gruppe B sogar überhaupt kein Transthyretin nachgewiesen werden. Die HSP 27 Konzentration viel dagegen bei diesen Proben deutlich ausgeprägter als bei den anderen. In der Literatur sind bislang keine Zusammenhänge von HSP 27 und Transthyretin beschrieben worden. Als Plasmaprotein liegt Transthyretin extrazellulär vor, während HSP 27 intrazellulär im Zytosol seinen Funktionen nachkommt. Ein direkter Zusammenhang erscheint daher unwahrscheinlich.

Transthyretin übt eine entscheidende Funktion in der zerebrospinalen Flüssigkeit (CSF) aus. Es verhindert die Ausbildung von beta-Amyloid-Fibrillen über die Sequesterung von beta-Amyloid (Serot 1997, Schwarzmann 1994). Im Allgemeinen sieht man auch in der zerebrospinalen Flüssigkeit eine Reduktion von Transthyretin mit dem Alter (Serot 1997). Unter physiologischen Bedingungen kommt Transthyretin in der CSF in deutlich höheren Konzentrationen vor als im Blutplasma. Transthyretin wird dabei überwiegend vom Plexus choroidealis synthetisiert und nach Reabsorption über die ‚arachnoid villi‘ in der Leber, der Muskulatur und der Haut abgebaut (Ingenbleek 1994). Bei Alzheimer Patienten ist die Transthyretin-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe sogar noch weiter reduziert, so dass es vermehrt zu Amyloid-Ablagerungen kommt. Insofern könnte in diesem Zusammenhang Transthyretin auch als Alterungsmarker interpretiert werden, der ein relatives Risiko für Proteinablagerungen in Zellen und Geweben impliziert, was ebenfalls zu Stresssituationen führen kann. Damit verbunden wäre eine vorzeitige Funktionseinschränkung bzw. der Alterungsprozess. Bei niedrigeren Syntheseraten von Transthyretin im Alter zieht dies auch eine geringere Konzentration von Transthyretin in der Epidermis nach sich. Da Transthyretin als Transportprotein für Retinoide, denen bei der Zellproliferation und auch Zelldifferenzierung der Keratinozyten eine entscheidende Rolle zukommt, könnte bei geringeren Einfluss von Retinoiden auf die epidermale Differenzierung ein gewisser Stresszustand in den Zellen ausgelöst werden, die mit einer vermehrten Produktion von Hitzeschockproteinen beantwortet werden.

## **7 Zusammenfassung**

---

Es konnten in dieser Arbeit Proteine aus Spalthäuten als Epidermisäquivalent mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese dargestellt werden. Im Vergleich von jungen zu älteren Spalthautspendern konnte festgestellt werden, dass es zu altersabhängigen Proteinveränderungen kommt. Dazu zählen unter anderem ein kleines Hitzeschockprotein (HSP 27) sowie das Plasmaprotein Transthyretin, die mittels MALDI-Q-TOF identifiziert und anschließend über Western Blot Verfahren verifiziert wurden. Es konnte festgestellt werden, dass das Plasmaprotein Transthyretin nicht in der Epidermis synthetisiert wird, allerdings als Transportprotein für ihre intakte Funktion unerlässlich scheint. Es ist ein essentielles Transportprotein für Retinol-Derivate, die eine entscheidende Rolle bei der initialen Differenzierung der Keratinozyten spielen. Des Weiteren scheint im Rahmen des allgemeinen Alterungsprozess' die Konzentration von Transthyretin innerhalb der Epidermis abzunehmen. Das kleine Hitzeschockprotein HSP 27 scheint ein Marker für den Stresszustand der Haut darzustellen. Dabei ist auffällig, dass HSP 27 in gealterter Haut ungleichmäßig exprimiert wird. Ursächlich für eine verstärkte Expression scheint ein erhöhter Stresszustand bei gleichzeitig differenzierten Keratinozyten zu sein, da HSP 27 überwiegend in suprabasalen Zelllagen der Epidermis exprimiert wird. Neben einem ungestressten Zustand der Keratinozyten im Alter kann auch eine Reduktion der Epidermisschichten im Alter ursächlich sein für eine reduzierte HSP 27 Expression. Andererseits kann aber auch eine altersabhängige Zunahme von funktionslosen oder denaturierten Proteinen, die nachfolgend die Transkription von Hitzeschock-Proteinen negativ beeinflussen, eine reduzierte HSP 27 Expression zur Folge haben. Mit den fehlenden protektiven Funktionen des kleinen Hitzeschockproteins könnte dies auch ein erhöhtes Neoplasierisiko im Alter bedeuten.

## **8 Literaturverzeichnis**

---

Andersson E, Rosdahl I, Torma H, Vahlquist A. Differential effects of UV irradiation on nuclear retinoid receptor levels in cultured keratinocytes and melanocytes. *Exp Dermatol.* 2003; 12: 563-71.

Bayerl C, Dorfner B, Rzany B, Fuhrmann E, Coelho CC, Jung EG. Heat shock protein HSP 27 is expressed in all types of basal cell carcinoma in low and high risk UV exposure groups. *Eur J Dermatol.* 1999; 9: 281-4.

Bernstein EF, Chen YQ, Tamai K, Shepley KJ, Resnik KS, Zhang H, Tuan R, Mauviel A, Uitto J. Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol.* 1994; 103: 182-6.

Blackburn E. Telomere states and cell fates. *Nature.* 2000; 408: 53-56.

Bohr VA. Werner syndrome and its protein: clinical, cellular and molecular advances. *Mech Ageing Dev.* 2003; 124: 1073-82.

Bond J, Haughton M, Blaydes J, Gire V, Wynford-Thomas D, Wyllie F. Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene* 1996; 13: 2097-104.

Bosetti C, La Vecchia C, Naldi L, Lucchini F, Negri E, Levi F. Mortality from cutaneous malignant melanoma in Europe. Has the epidemic levelled off? *Melanoma Res.* 2004; 14: 301-309.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.

Celis JE, Rasmussen HH, Gromov P, Olsen E, Madsen P, Leffers H, Honore B, Dejgaard K, Vorum H, Kristensen DB, et al. The human keratinocyte two-dimensional gel protein database (update 1995): mapping components of signal transduction pathways. *Electrophoresis.* 1995; 16: 2177-240.



Charveron M, Calvo M, Gall Y. Cell stress and implications of the heat-shock response in skin. *Cell Biol Toxicol.* 1995;11: 161-5.

Cheney KE, Walford RL. Immune function and dysfunction in relation to aging. *Life Sci.* 1974; 14: 2075-84.

Chevalier S, Blaner WS, Azais-Braesco V, Tuchweber B. Dietary restriction alters retinol and retinol-binding protein metabolism in aging rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1999; 54: 384-92.

Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SA. Biological and clinical implications of heat shock protein 27,000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 1558-70.

De Luca LM, Darwiche N, Celli G, Kosa K, Jones C, Ross S, Chen LC. Vitamin A in epithelial differentiation and skin carcinogenesis. *Nutr Rev.* 1994; 52: 45-52.

De Luca LM, Tarone R, Huynh M, Jones CS, Chen LC. Dietary retinoic acid inhibits mouse skin carcinogenesis irrespective of age at initiation. *Nutr Cancer.* 1996; 25: 249-57.

Dudas SP, Arking R. A coordinate upregulation of antioxidant gene activities is associated with the delayed onset of senescence in a long-lived strain of *Drosophila*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1995; 50: 117-27.

Durnick A, Stolz W, Landthaler M, Vogt T. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in young adults. *Dermatol Surg.* 2004; 30: 813-6.

Effros RB. Replicative senescence in the immune system: impact of the Hayflick limit on T-cell function in the elderly. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 1003-7.

Fenske NA, Lober CW. Structural and functional changes of normal aging skin. *J Am Acad Dermatol.* 1986; 15: 571-85.

Fuchs E, Green H. Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell*. 1981; 25: 617-25.

Fung TT, Hunter DJ, Spiegelman D, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. Vitamins and carotenoids intake and the risk of basal cell carcinoma of the skin in women (United States). *Cancer Causes Control*. 2002; 13: 221-30.

Fung TT, Spiegelman D, Egan KM, Giovannucci E, Hunter DJ, Willett WC. Vitamin and carotenoid intake and risk of squamous cell carcinoma of the skin. *Int J Cancer*. 2003; 103: 110-15.

Gandour Edwards R, McClaren M, Isserhoff RR. Immunolocalization of low-molecular-weight stress protein HSP 27 in normal skin and common cutaneous lesions. *Am J Dermatopathol* 1994; 16: 504-509.

Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 1985; 43: 405-13.

Hadshiew IM, Eller MS, Gilchrest BA. Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. *Am J Contact Dermat*. 2000; 11: 19-25.

Hainaut P, Milner J. Interaction of heat-shock protein 70 with p53 translated in vitro: evidence for interaction with dimeric p53 and for a role in the regulation of p53 conformation. *EMBO J*. 1992; 11: 3513-20.

Hayflick L, Moorehead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 1961; 25: 585-621.

Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 1985; 6:103-112.

Ingenbleek Y, Young V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Annu Rev Nutr*. 1994; 14: 495-533.

Jantschitsch C, Kindas-Mugge I, Metze D, Amann G, Micksche M, Trautinger F. Expression of the small heat shock protein HSP 27 in developing human skin. *Br J Dermatol.* 1998; 139: 247-53.

Jazwinski SM. Longevity, genes, and aging. *Science.* 1996; 273: 54-9.

Johnson TE. Aging can be genetically dissected into component processes using long-lived lines of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 3777-81.

Jones PH. Epithelial stem cells. *Bioessays.* 1997; 19: 683-90.

Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science.* 2002; 295: 2446-9.

Kasai H, Nishimura S. Formation of 8-Hydroxydeoxyguanosine in DNA by oxygen radicals and its biological significance. *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants.* London, England: Academic press, Ltd.; 1991: 99-116.

Kindas-Mugge I, Trautinger F. Increased expression of the M(r) 27,000 heat shock protein (hsp27) in in vitro differentiated normal human keratinocytes. *Cell Growth Differ.* 1994; 5: 777-81.

Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 1975; 26: 231-43.

Landry J, Chretien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J Cell Biol.* 1989; 109: 7-15.

Laplante A, Moulin V, Auger FA, et al. Expression of heat shock proteins in mouse skin during wound healing. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46: 1291-301

Le Q, Dawson MI, Soprano DR, Soprano KJ. *Oncogene.* 2000; 19: 1457-65.

Morris SD, Cumming DVE, Latchman DS, Yellon DM. Specific induction of 70 kDa HSPs by Herbimycin-A protects cardiomyocytes: a pharmacological route to cytoprotection. *J Clin Invest.* 1996; 97: 706-12.

Morris SD. Heat shock proteins and the skin. *Clin Exp Dermatol.* 2002; 27: 220-4.

Pinhasi-Kimhi O, Michalovitz D, Ben-Zeev A, Oren M. Specific interaction between the p53 cellular tumour antigen and major heat shock proteins. *Nature.* 1986; 320: 182-4.

Pockley AG. Heat shock proteins in health and disease: therapeutic targets or therapeutic agents? *Expert Rev Mol Med.* 2001; 3: 1-21.

O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975; 250: 4007-21.

Quenneville LA, Trotter MJ, Maeda T, Tron VA. p53-dependent regulation of heat shock protein 72. *Br J Dermatol.* 2002; 146: 786-91.

Richards EH, Hickey E, Weber L, Master JR. Effect of overexpression of the small heat shock protein HSP27 on the heat and drug sensitivities of human testis tumor cells. *Cancer Res.* 1996; 56: 2446-51.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995; 268: 1749-53.

Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, Bhasin R, Silverman J, Weisgraber KH, Coyle PK, et al. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 8368-72.

Serot JM, Christmann D, Dubost T, Couturier M. Cerebrospinal fluid transthyretin: aging and late onset Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997; 63: 506-8.

Setlow RB, Carrier WL. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's. *J Mol Biol.* 1966; 17: 237-54.

van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 1998; 92: 401-13.

Sun J, Kale SP, Childress AM, Pinswasdi C, Jazwinski SM. Divergent roles of RAS1 and RAS2 in yeast longevity. *J Biol Chem.* 1994; 269: 18638-45.

Torma H, Vahlquist A. Vitamin A transporting proteins in human epidermis and blister fluids. *Arch Dermatol Res.* 1983; 275: 324-8.

Trautinger F, Trautinger I, Kindas-Mügge I et al. Human keratinocytes in vivo and in vitro constitutively express the 72 kD heat shock protein. *J Invest Dermatol.* 1993; 101: 334-8

Trautinger F, Kindas-Mugge I, Dekrout B, Knobler RM, Metze D. Expression of the 27-kD heat shock protein in human epidermis and in epidermal neoplasms: an immunohistological study. *Br J Dermatol.* 1995; 133: 194-202.

Uitto J, Bernstein EF. Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 1998; 3: 41-4.

Vahlquist A, Andersson E, Coble BI, Rollman O, Torma H. Increased concentrations of 3,4-didehydroretinol and retinoic acid-binding protein (CRABP II) in human squamous cell carcinoma and keratoacanthoma but not in basal cell carcinoma of the skin. *J Invest Dermatol.* 1996; 106: 1070-4

Varadi DP. Studies on the chemistry and fine structure of elastic fibers from normal adult skin. *J Invest Dermatol.* 1972; 59: 238-46.

Varani J, Perone P, Griffith CEM, Inman DR, Fligiel SEG, Voorhees JJ. All-trans retinoic acid (RA) stimulates events in organ-cultured human skin that underlie repair. *J Clin Invest* 1994; 94: 1747-1757.

Varani J, Fisher GJ, Kang S, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of intrinsic skin aging and retinoid-induced repair and reversal. *J Invest Dermatol Symp Proc* 1998; 3: 57-60.

Wallace DC. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science*. 1992; 256: 628-32

Weeda G, van Ham RC, Vermeulen W, Bootsma D, van der Eb AJ, Hoeijmakers JH. A presumed DNA helicase encoded by ERCC-3 is involved in the human repair disorders xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome. *Cell*. 1990; 62: 777-91.

Wilson N, McArdle A, Guerin D et al. Hyperthermia to normal human skin in vivo upregulates heat shock proteins 27, 60, 72 and 90. *J Cutan Pathol*. 2000; 27: 176-82.

Wlaschek M, Tancheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Schuller J, Scharffetter-Kochanek K. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B*. 2001; 63: 41-51.

Yaar M. Mechanisms of aging. *Arch Dermatol*. 2002; 138: 1429-1432.

## 9 Danksagung

---

Ich möchte Herrn Prof. K. Neuber, UKE, für die Bereitstellung des Themas sowie Herrn Prof. F. Leidenberger, IHF und Herrn Dr. A. Mukhopadhyay, IHF für die Ermöglichung und Unterstützung der experimentellen Arbeit danken. Besonderen Dank gelten Frau Monika Kistler für die ausdauernde Einarbeitung und die vielen Ideen sowie Frau Dr. B. Willipinski-Stapelfeldt. Weiterhin danken möchte ich den Mitarbeitern des IHF's, die mir als Medizin-Studentin unter all den Naturwissenschaftlern immer wieder hilfsbereit zur Seite standen, und meine teilweise noch so banalen Fragen und Unsicherheiten gelassen ertragen haben. Für die massenspektrometrische Analyse der 2D-PAGE-Spots möchte ich Herrn Dr. Friedrich Buck und Sönke Harder vom Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie am UKE danken.

Besonderen Dank gilt auch, wie oben bereits genannt Monika Kistler, Björn Ehlers, Dr. Niels Grabe und Dr. Matthias König, die mir insbesondere bei Gel-Casting-Misserfolgen, Scanner-Herausforderungen, Antikörper-Testexzessen mit Ideen, Umsetzungsversuchen und viel Cappuccino immer unter die Arme bzw. „Gele“ gegriffen haben. Ohne euch, wäre hier wohl nie ein vernünftig separiertes 2D-PAGE, geschweige denn ein gescanntes 2D-PAGE abgebildet gewesen. Vielen, vielen Dank!

Besonders möchte ich mich bei Matthias bedanken, der den Prüfungsstress, den normalen Berufsalltag, und zwischendrin die vielen Wochenenden der Ausarbeitung dieser Arbeit mit all meinen depressiven Episoden überstanden hat, und mich immer wieder motiviert und angetrieben hat. Vielen Dank!

Und zu guter letzt geht der größte Dank an meine Eltern, die von je her während all meiner nicht-wissenschaftlichen Experimente hinter mir standen, und mich immer alles machen und entscheiden ließen. Danke !!!!

## 10 Lebenslauf

---

Name	Jessica Annette Kieslich
Geburtsdatum	12.03.1977
Geburtsort	Hamburg
Schulbildung	
1983-1987	Wolfgang Borchert Schule, Hamburg
1987-1996	Heilwig Gymnasium, Hamburg
Medizinstudium	
10/1997 – 09/2003	Universität Hamburg Physikum März 2000 1. Staatsexamen April 2001 2. Staatsexamen September 2003
10/2003 – 10/2004	Universität Göttingen 3. Staatsexamen Oktober 2004
Assistenzärztin	
Seit November 2004	Tätigkeit als Assistenzärztin in der Inneren Medizin III am Klinikum Bremen-Mitte, Bremen



## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Jessica Kieslich