

# **Molekulare Untersuchungen zur Expression humaner Hautalterungsmarker**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.**

**des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg**

**vorgelegt von**

**Christine Lahmann**

**Hamburg**

**Februar 2002**

Referent: Prof. Dr. W. Schäfer

Korreferent: Prof. Dr. K. Harbers

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2002

Die vorliegende Arbeit wurde am  
PAUL GERSON UNNA FORSCHUNGSZENTRUM  
der Beiersdorf AG Hamburg  
angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....                                  | <b>1</b>  |
| <b>ABKÜRZUNGEN</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>1 EINLEITUNG</b> .....  | <b>9</b>  |
| <b>1.1 UV-bedingte Schädigung der Haut</b> .....                 | <b>9</b>  |
| 1.1.1 Die Haut .....   | 9         |
| 1.1.2 UV-Strahlung .....   | 12        |
| 1.1.3 Photoageing .....  | 14        |
| <b>1.2 Matrixmetalloproteinasen</b> .....                        | <b>16</b> |
| 1.2.1 Einteilung und Struktur der MMPs .....                     | 17        |
| 1.2.2 Chromosomale Lokalisation der MMPs .....                   | 20        |
| 1.2.3 Regulation der MMPs der Haut .....                         | 20        |
| 1.2.3.1 Regulation der MMP-Genexpression .....                   | 21        |
| 1.2.3.2 Regulation der MMPs durch Zymogenaktivierung .....       | 23        |
| 1.2.3.3 Inhibition der MMP-Aktivität durch TIMPs .....           | 24        |
| <b>1.3 Neutrophile Elastase</b> .....                            | <b>25</b> |
| <b>1.4 Fragestellung</b> .....                                   | <b>25</b> |
| <b>2 MATERIAL</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>2.1 Geräte</b> .....  | <b>27</b> |
| <b>2.2 Verbrauchsmaterialien</b> .....                           | <b>29</b> |
| <b>2.3 Chemikalien und Reagenzien</b> .....                      | <b>29</b> |
| <b>2.4 Kits</b> .....  | <b>31</b> |
| <b>2.5 Puffer und Medien</b> .....                               | <b>32</b> |
| <b>2.6 HDF-Zellkulturen (<i>in vitro</i> Hautmaterial)</b> ..... | <b>33</b> |

---

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| <b>2.7</b> | <b>Stanzbiopsien (<i>in vivo</i> Hautmaterial)</b> .....            | <b>33</b> |
| <b>2.8</b> | <b>Oligonukleotide</b> .....  | <b>35</b> |
| 2.8.1      | Northern-Sonden .....   | 35        |
| 2.8.2      | TaqMan <sup>®</sup> RT-PCR Primer und Sonden .....                  | 36        |
| <b>3</b>   | <b>METHODEN</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Zellkulturtechnik</b> .....                                      | <b>37</b> |
| 3.1.1      | Isolierung von HDF-Zellen .....                                     | 37        |
| 3.1.2      | Kultivierung von Zellkulturen .....                                 | 37        |
| 3.1.3      | Zellzahlbestimmung nach Fuchs-Rosenthal .....                       | 38        |
| 3.1.4      | Einfrieren und Auftauen von Zellen .....                            | 38        |
| <b>3.2</b> | <b>Inkubation von HDF-Zellen mit verschiedenen Substanzen</b> ..... | <b>39</b> |
| 3.2.1      | Inkubation mit $\alpha$ -Tocopherol .....                           | 39        |
| 3.2.2      | Inkubation mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                  | 40        |
| <b>3.3</b> | <b>Zytotoxizitätstest mit Neutralrot</b> .....                      | <b>40</b> |
| <b>3.4</b> | <b>UV-Bestrahlung</b> .....   | <b>41</b> |
| 3.4.1      | UVA-Bestrahlung von HDF-Zellkulturen .....                          | 41        |
| 3.4.2      | SSR-Bestrahlung <i>in vivo</i> .....                                | 42        |
| 3.4.2.1    | Time Course Studie .....  | 43        |
| 3.4.2.2    | Dose Response Studie .....  | 43        |
| 3.4.2.3    | Reproduzierbarkeits- bzw. Epidermis-Dermis Trennstudie .....        | 43        |
| 3.4.2.4    | Repetitive UV-Expositionsstudie .....                               | 43        |
| 3.4.3      | UVA-Bestrahlung <i>in vivo</i> .....                                | 44        |
| 3.4.4      | UVB-Bestrahlung <i>in vivo</i> .....                                | 45        |
| <b>3.5</b> | <b>Probenentnahme von <i>in vivo</i> Hautmaterial</b> .....         | <b>46</b> |
| <b>3.6</b> | <b>RNA-Isolierung</b> .....   | <b>46</b> |
| 3.6.1      | RNA-Isolierung aus HDF-Zellkulturen .....                           | 46        |
| 3.6.2      | RNA-Isolierung aus Stanzbiopsien .....                              | 47        |
| <b>3.7</b> | <b>RNA-Quantifizierung mittels GeneQuant<sup>®</sup></b> .....      | <b>47</b> |
| <b>3.8</b> | <b>Gelelektrophorese</b> .....                                      | <b>48</b> |

---

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>3.9</b>  | <b>Northern-Analyse</b> .....   | <b>49</b> |
| 3.9.1       | Northern-Blotting.....  | 49        |
| 3.9.2       | Hybridisierung.....   | 50        |
| 3.9.3       | Chemilumineszenz-Detektion.....   | 50        |
| <b>3.10</b> | <b>TaqMan® RT-PCR</b> .....   | <b>51</b> |
| 3.10.1      | Prinzip der Real-Time TaqMan®-PCR.....  | 51        |
| 3.10.2      | Design der Primer- und Sondensysteme.....                                       | 54        |
| 3.10.3      | TaqMan® RT-PCR Assay.....   | 56        |
| 3.10.4      | TaqMan® RT-PCR Analyse.....   | 57        |
| <b>3.11</b> | <b>Proteindetektion mittels ELISA</b> .....                                     | <b>61</b> |
| 3.11.1      | MMP-1 ELISA.....  | 61        |
| 3.11.2      | TIMP-1 ELISA.....   | 62        |
| 3.11.3      | MMP-1/TIMP-1 Komplex ELISA.....   | 63        |
| <b>3.12</b> | <b>Statistik</b> .....  | <b>63</b> |
| <b>4</b>    | <b>ERGEBNISSE</b> .....   | <b>64</b> |
| <b>4.1</b>  | <b>Etablierung der TaqMan® RT-PCR-Systeme</b> .....                             | <b>64</b> |
| 4.1.1       | Manganacetat-Optimierung.....   | 64        |
| 4.1.2       | Primer-Optimierung.....   | 67        |
| 4.1.3       | Effizienzvergleich.....   | 69        |
| <b>4.2</b>  | <b>Relative Quantifizierung von MMP-1 und TIMP-1 mRNA <i>in vivo</i></b> .....  | <b>70</b> |
| 4.2.1       | Erhöhte MMP-1 mRNA Expression bei Rauchern.....                                 | 70        |
| 4.2.2       | SSR Time Course Studie.....   | 72        |
| 4.2.3       | SSR Dose Response Studie.....   | 76        |
| 4.2.4       | Reproduzierbarkeits- bzw. Epidermis-Dermis Trennstudie (SSR).....               | 79        |
| 4.2.5       | UVA-Studie.....   | 82        |
| 4.2.6       | UVB-Studie.....   | 85        |
| 4.2.7       | Repetitive UV-Expositionsstudie (SSR).....                                      | 89        |
| <b>4.3</b>  | <b>Relative Quantifizierung von MMP-1 und TIMP-1 mRNA <i>in vitro</i></b> ..... | <b>92</b> |
| 4.3.1       | UVA Time Course Studie.....   | 93        |
| 4.3.2       | UVA Dose Response Studie.....   | 95        |
| 4.3.3       | Einfluss von $\alpha$ -Tocopherol.....  | 97        |
| 4.3.4       | Einfluss von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....                                | 99        |

---

|            |  |            |
|------------|--|------------|
| <b>4.4</b> | <b>Quantifizierung von MMP-1 und TIMP-1 Protein <i>in vitro</i></b> .....          | <b>101</b> |
| <b>4.5</b> | <b>Relative Quantifizierung von Elastin und Elastase mRNA <i>in vivo</i></b> ..... | <b>102</b> |
| 4.5.1      | SSR Time Course Studie .....   | 103        |
| 4.5.2      | SSR Dose Response Studie .....   | 105        |
| <b>5</b>   | <b>DISKUSSION</b> .....  | <b>108</b> |
| <b>5.1</b> | <b>MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression <i>in vivo</i></b> .....                       | <b>108</b> |
| 5.1.1      | Erhöhte MMP-1 mRNA Expression bei Rauchern .....                                   | 109        |
| 5.1.2      | UV-induzierte MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression <i>in vivo</i> .....                | 110        |
| <b>5.2</b> | <b>MMP-1 und TIMP-1 Expression <i>in vitro</i></b> .....                           | <b>117</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Elastin und Elastase mRNA Expression <i>in vivo</i></b> .....                   | <b>121</b> |
| <b>6</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....   | <b>125</b> |
| <b>7</b>   | <b>LITERATUR</b> .....   | <b>127</b> |
| <b>8</b>   | <b>ANHANG</b> .....  | <b>139</b> |
| <b>8.1</b> | <b>Sequenzen der TaqMan® RT-PCR Systeme</b> .....                                  | <b>139</b> |
| 8.1.1      | GAPDH TaqMan® RT-PCR System .....  | 139        |
| 8.1.2      | MMP-1 TaqMan® RT-PCR System .....  | 140        |
| 8.1.3      | TIMP-1 TaqMan® RT-PCR System .....   | 141        |
| 8.1.4      | Elastin TaqMan® RT-PCR System .....  | 142        |
| 8.1.5      | Elastase TaqMan® RT-PCR System .....   | 143        |
| <b>8.2</b> | <b>Leistungsspektren der verwendeten UV-Lampen</b> .....                           | <b>144</b> |

## Abkürzungen

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| %                              | Prozent  |
| °C                             | Grad Celsius   |
| μ                              | mikro-   |
| 7700 SDS                       | 7700 Sequence Detection System   |
| AP-1                           | „activating protein-1“   |
| ATF-2                          | „activating transcription factor-2“  |
| BDF                            | Beiersdorf AG  |
| BLAST                          | Basic Local Alignment Search Tool  |
| BLU                            | Boehringer Light Units   |
| bp                             | Basenpaare   |
| bzw.                           | beziehungsweise  |
| cDNA                           | komplementäre DNA  |
| CIE                            | Commission Internationale de l'Eclairage (Internationale Beleuchtungskommission)   |
| CO <sub>2</sub>                | Kohlendioxid   |
| COLIPA                         | European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Industry   |
| CPD                            | Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer   |
| CPD- <i>Star</i> <sup>TM</sup> | 2-Chlor-5-(4-Methoxy Spiro {1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor) Tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz |
| C <sub>T</sub>                 | „threshold cycle“ (Schwellenwert)  |
| Da                             | Dalton   |
| dATP                           | 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat   |
| dCTP                           | 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat  |
| DEPC                           | Diethylpyrocarbonat  |
| dGTP                           | 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat   |
| DIG                            | Digoxigenin  |
| DMEM                           | Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium  |
| DMSO                           | Dimethylsulfoxid   |
| DNA                            | Desoxyribonukleinsäure   |
| dTTP                           | 2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat   |

---

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| dUTP                          | 2'-Desoxyuridin-5'-triphosphat                    |
| ECM                           | Extrazelluläre Matrix                             |
| EDTA                          | Ethylendiamintetraessigsäure                      |
| EGF                           | Epidermaler Wachstumsfaktor                       |
| ELISA                         | „enzyme-linked immunosorbent assay“               |
| ERK                           | „extracellular signal regulated kinase“           |
| EtBr                          | Ethidiumbromid                                    |
| F                             | weiblich  |
| Fab-Fragment                  | Antigenbindende Einheit von Immunglobulinen       |
| FAM                           | 6-Carboxyfluorescein                              |
| FCS                           | Fötale Kälberserum                                |
| FGF                           | Fibroblasten Wachstumsfaktor                      |
| F-Pr.                         | Forward Primer                                    |
| GAPDH                         | Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase          |
| h                             | Stunde(n)   |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Wasserstoffperoxid                                |
| HCl                           | Salzsäure   |
| HDF                           | Humane dermale Fibroblasten                       |
| HEPES                         | [4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure  |
| HPLC                          | „high pressure liquid chromatography“             |
| HRP                           | „horseradish peroxidase“ (Meerrettich Peroxidase) |
| IL                            | Interleukin                                       |
| J                             | Joule   |
| JNK                           | Jun N-terminale Kinase                            |
| Kst.                          | Kostenstelle                                      |
| l                             | Liter   |
| M                             | männlich  |
| -m                            | Meter   |
| m-                            | milli-  |
| M                             | Mol   |
| MAPK                          | Mitogen-aktivierte Proteinkinase                  |
| MED                           | Minimale Erythemale Dosis                         |
| MgCl <sub>2</sub>             | Magnesiumchlorid                                  |
| min                           | Minute(n)   |

---

|                     |   |
|---------------------|---|
| MMP-1               | Matrixmetalloproteinase-1                           |
| MOPS                | Morpholinopropansulfonsäure                         |
| mRNA                | „messenger“ RNA                                     |
| MT                  | membranständig                                      |
| n-                  | nano-   |
| NaCl                | Natriumchlorid                                      |
| NaOH                | Natriumhydroxid                                     |
| Neutralrot          | 2-Amino-3-methyl-7-dimethylamino-phenazoniumchlorid |
| NHEK                | Normale humane epidermale Keratinozyten             |
| NTC                 | „no template control“                               |
| $^1\text{O}_2$      | Sauerstoff Singulett-Zustand                        |
| $\text{O}_2^-$      | Superoxidanion                                      |
| $\text{OH}^\bullet$ | Hydroxylradikal                                     |
| PBMC                | Periphere mononukleäre Zellen des Blutes            |
| PBS                 | „phosphate buffered saline“                         |
| PCR                 | Polymerase Kettenreaktion                           |
| $R_n$               | normalisierter Reporterfarbstoff                    |
| RNA                 | Ribonukleinsäure                                    |
| ROS                 | Reaktive Sauerstoffspezies                          |
| ROX                 | 6-Carboxy-X-rhodamin                                |
| rpm                 | Umdrehungen pro Minute                              |
| R-Pr.               | Reverse Primer                                      |
| RT                  | Raumtemperatur                                      |
| S                   | <i>Svedberg</i> -Einheit                            |
| SAPK                | Stress-aktivierte Proteinkinase                     |
| SD                  | Standardabweichung                                  |
| SDS                 | Natriumdodecylsulfat                                |
| sec                 | Sekunde(n)  |
| SEM                 | „standard error of the mean“                        |
| SSC                 | „standard saline citrat“-Puffer                     |
| SSR                 | „solar simulated radiation“                         |
| TAMRA               | 6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin             |
| <i>Taq</i>          | <i>Thermus aquaticus</i>                            |
| TBE                 | Tris Borat EDTA                                     |

|                |   |
|----------------|---|
| TIMP-1         | „tissue inhibitor of metalloproteinases“-1    |
| T <sub>m</sub> | Schmelztemperatur                             |
| TMB            | 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin                 |
| TNF            | Tumor Nekrose Faktor                          |
| Tris           | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan              |
| U              | Unit (Einheit der Enzymaktivität)             |
| u. a.          | unter anderem                                 |
| UNG            | AmpErase <sup>®</sup> Uracil N-Glykosylase    |
| UpM            | Umdrehungen pro Minute                        |
| UV             | Ultraviolett                                  |
| V              | Volt  |
| v/v            | Volumen pro Volumen                           |
| VIC            | Fluoreszenzfarbstoff (Formel patentgeschützt) |
| W              | Watt  |
| w/v            | Gewicht pro Volumen                           |
| z. B.          | zum Beispiel                                  |
| Zn             | Zink  |

### Symbole für Aminosäuren

|   |                               |   |                             |
|---|-------------------------------|---|-----------------------------|
| A | Alanin                        | M | Methionin                   |
| B | Asparagin oder Asparaginsäure | N | Asparagin                   |
| C | Cystein                       | P | Prolin                      |
| D | Asparaginsäure                | Q | Glutamin                    |
| E | Glutaminsäure                 | R | Arginin                     |
| F | Phenylalanin                  | S | Serin                       |
| G | Glycin                        | T | Threonin                    |
| H | Histidin                      | V | Valin                       |
| I | Isoleucin                     | W | Tryptophan                  |
| K | Lysin                         | Y | Tyrosin                     |
| L | Leucin                        | Z | Glutamin oder Glutaminsäure |

# 1 Einleitung

## 1.1 UV-bedingte Schädigung der Haut

Ultraviolette (UV) Strahlung ist die Hauptursache für die exogene Schädigung der menschlichen Haut. Neben den akuten UV-induzierten Effekten wie dem Erythem (Sonnenbrand) und der Immunsuppression können schwerwiegende Langzeitfolgen wie Hautkrebs und frühzeitige Hautalterung (Photoaging) auftreten (Young 1990). Bei diesen chronischen Hautschädigungen kommt der Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) eine bedeutende Rolle zu (Tschesche und Farr 1998).

### 1.1.1 Die Haut

Die humane Haut ist mit einer Gesamtfläche von 1,5-2 m<sup>2</sup> das größte Organ des menschlichen Körpers und stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar (Jung 1995). Zu ihren Funktionen zählt neben dem Schutz vor physikalischen (Druck, Temperatur, UV-Strahlung), chemischen und mikrobiologischen Umwelttoxinen auch die Erhaltung des Feuchtigkeitshaushaltes und die Thermoregulation. Außerdem ist die Haut an der Vermittlung von Tast-, Temperatur- und Schmerzempfindungen beteiligt.

Histologisch lässt sich die Haut in Epidermis, Dermis und Subcutis untergliedern (siehe Abbildung 1.1).

Die Epidermis als äußere Schicht der Haut ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel mit einer Dicke von 30-300µm. Die Haupt-Zellpopulationen der Epidermis sind die Keratinozyten, die in unterschiedlichen Differenzierungsstadien auftreten. Die kubischen Zellen des einschichtigen Stratum basale sitzen der Basalmembran auf, die an die Dermis grenzt. In ihnen finden die mitotischen Zellteilungen des klassischen Proliferationsgewebes Epidermis statt. Etwa alle zwanzig Tage teilt sich eine Basalzelle, wobei eine der Tochterzellen basal erhalten bleibt, während die andere in suprabasale Schich-

ten entlassen wird. Diese Zelle wandert unter kontinuierlicher Differenzierung vom vielschichtigen Stratum spinosum (Stachelzellschicht) über das ein- bis mehrschichtige Stratum granulosum (Körnerzellschicht) zum Stratum lucidum (Glanzschrift), bis sie innerhalb von zwei Wochen das Stratum corneum (kernlose Hornzellschicht) erreicht. Dort wird sie als Hornschuppe an der Hautoberfläche abgeschilfert. Neben den Keratinozyten kommen in der Epidermis außerdem Merkel-Zellen, Melanozyten, die antigen-präsentierenden Langerhans-Zellen und Lymphozyten vor.

Die 30-150 nm dünne Basalmembran der Epidermis besteht aus zwei Hauptschichten, der Lamina lucida und der Lamina densa, die den Austausch von Zellen und Molekülen zwischen der Epidermis und der Dermis kontrollieren.

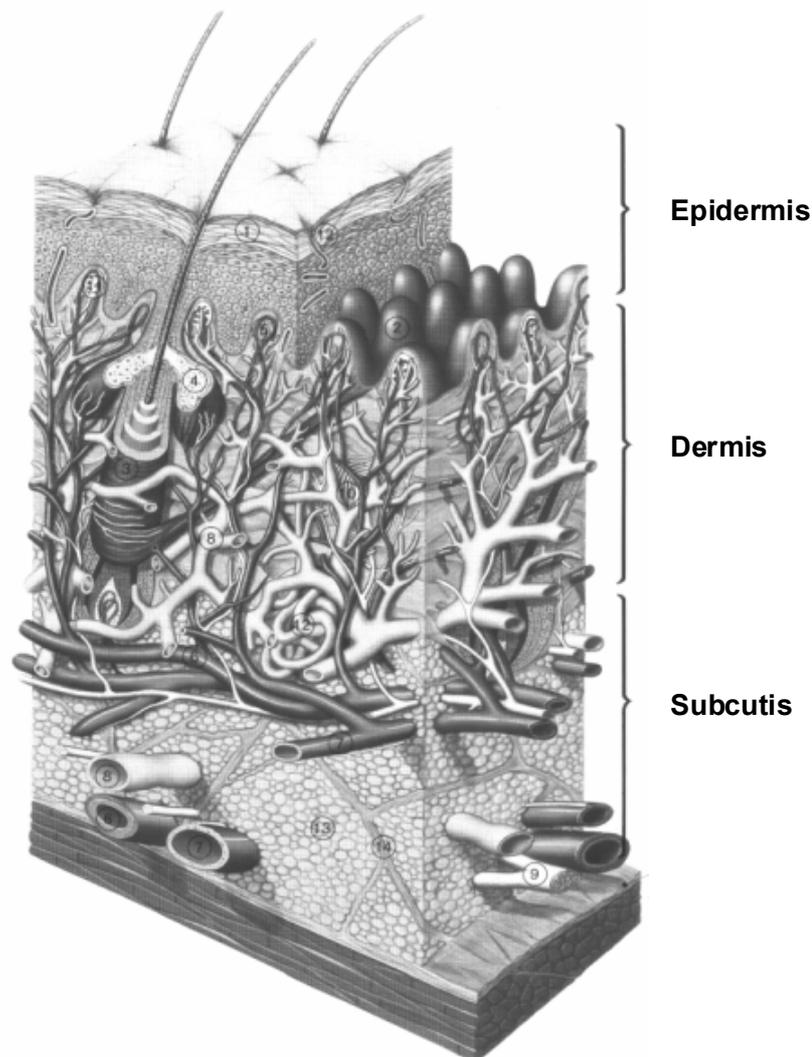


Abbildung 1.1: *Aufbau der humanen Haut* (Beiersdorf AG)

Die Dermis stellt das unter der Epidermis gelegene Bindegewebe dar, das sich in der Tiefe bis zur Subcutis erstreckt. Die Dicke der Dermis hängt stark von der Lokalisation ab. Sie wird in das oberflächliche schmale Stratum papillare (Zapfenschicht) und das darunterliegende breite Stratum reticulare (Netzschicht) unterteilt. Die Dermispapillen des Stratum papillare sind zäpfchenförmig mit der Epidermis verzahnt, was die Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen erleichtert. Aufgrund ihrer Versorgungsfunktion ist diese Schicht hauptsächlich durch Zellen, Matrix, Lymphbahnen, Nerven und Kapillaren charakterisiert. Die dominierenden Zellen der Dermis stellen die Fibroblasten dar; daneben kommen Makrophagen, Mastzellen sowie wenige Melanozyten vor. Die Fibroblasten synthetisieren die amorphe Matrix und auch die Fasern der Dermis. Diese Fasern sind im Stratum papillare allerdings von untergeordneter Bedeutung. Das Stratum reticulare hingegen ist für die Reißfestigkeit sowie die Elastizität der Haut verantwortlich und daher mit kräftigen Kollagenfaserbündeln und elastischen Fasern ausgestattet.

Die wichtigsten Fasern der Dermis sind die extrazellulären Kollagenfasern, die die Zugfestigkeit der Haut bedingen. Kollagene, hauptsächlich vom Typ I, repräsentieren mit ca. 80 % den Hauptbestandteil allen dermalen Proteins (Uitto und Bernstein 1998). Die Kollagenfasern setzen sich aus Kollagenfibrillen zusammen, die wiederum aus je drei zu einer Tripelhelix verdrillten  $\alpha$ -Kollagenketten bestehen. In einer Kollagenkette ist jeder dritte Aminosäurerest durch ein Glycin und jeder fünfte durch ein Prolin oder Hydroxyprolin repräsentiert (Bella et al. 1994). Daneben bilden die elastischen Fasern in der Extrazellulären Matrix (ECM) des Stratum reticulare ein starkes Netzwerk aus, das für die Elastizität der Haut verantwortlich ist (Christiano und Uitto 1994). Die elastischen Fasern bestehen neben Elastin zu 10 % aus Mikrofibrillen. Diese Mikrofibrillen sind an das Elastin angelagert und enthalten verschiedene Glykoproteine wie das Fibrillin (Uitto et al. 1995). Die elastischen Fasern stellen nur einen relativ kleinen Anteil von 2–4 % des gesamten Proteins der Dermis dar (Uitto und Bernstein 1998).

Die Füllsubstanz, die amorphe Matrix der Dermis, ist hauptsächlich durch H<sub>2</sub>O-bindende Proteoglykane charakterisiert, die aus zahlreichen Glykosaminoglykanketten und einem linearen Kernprotein aufgebaut sind.

Daneben existieren in der Dermis für die Wahrnehmung von Reizen die Meissner-Körperchen (Mechanorezeptoren), die Vater-Pacini-Körperchen (Druck- und Vibrationsrezeptoren) und die Ruffini-Körperchen (Dehnungsrezeptoren). Im tiefen Stratum reticulare entspringen die Haarfollikel sowie die Schweiß- und Talgdrüsen, die sich alle von der Epidermis ableiten.

Die Subcutis besteht aus lockerem Bindegewebe und ist von Kollagenfasern durchzogen. Sie dient im Wesentlichen als Fettspeicher, wodurch ein Schutz vor Wärmeverlust und mechanischen Belastungen gewährleistet ist.

### 1.1.2 UV-Strahlung

Die Sonne emittiert ein kontinuierliches Spektrum von 100-3000 nm (Gates 1965). Dazu gehören das kurzwellige, energiereiche UV-Licht (100-400 nm), der sichtbare Bereich (400-780 nm) und die Infrarotstrahlen (780-3000 nm), auf die die Wärmewirkung der Sonne zurückgeht. Das UV-Licht wird nach der Internationalen Beleuchtungskommission CIE (1987) in drei Wellenlängenbereiche unterteilt: UVC (100-280 nm), UVB (280-315 nm) und UVA (315-400 nm). Der deutsche Fachnormausschuss Lichttechnik definiert UVA als den Bereich zwischen 315 und 380 nm (1976).

*Tabelle 1.1: Anteile der auf die Erdoberfläche treffenden Strahlung unter Idealbedingungen (Meereshöhe, 90° Sonnenstand, wolkenlos, klare Luft) (nach Kindl und Raab 1993)*

| <b>Strahlungsart</b>                 | <b>Anteil der Gesamtintensität [%]</b> |
|--------------------------------------|--|
| <b>UVB (300-315 nm)</b>              | 0,4                                    |
| <b>UVA (315-380 nm)</b>              | 3,9                                    |
| <b>Sichtbares Licht (380-780 nm)</b> | 51,8                                   |
| <b>Infrarot A (780-1400 nm)</b>      | 31,2                                   |
| <b>Infrarot B (1400-3000 nm)</b>     | 12,7                                   |

Die Strahlung der Sonne trifft nicht unverändert auf der Erdoberfläche auf, sondern wird durch Absorption und Streuung stark geschwächt. Die UV-Strahlung unterhalb 175 nm wird bereits in großen Höhen vom Sauerstoff abgeblockt. Die UV-Strahlung im Bereich von 175 nm bis ca. 300 nm wird, abhängig von der Dicke der Ozonschicht, vom Ozon absorbiert (Kindl und Raab 1993). Das UVC ist somit auf der Erdoberfläche

ohne physiologische Bedeutung. Die übrigen Anteile der Strahlung erreichen mit unterschiedlicher Stärke die Erde (siehe Tabelle 1.1).

Das auf die humane Haut treffende Licht wird zu unterschiedlichen Anteilen absorbiert bzw. reflektiert und gestreut. Wie tief die auf die Haut treffenden Lichtstrahlen eindringen, hängt von der Wellenlänge des einfallenden Lichtes ab (siehe Tabelle 1.2).

*Tabelle 1.2: Eindringtiefe von Strahlung unterschiedlicher Wellenlänge in die Haut (Urbach 1952)*

| $\lambda$ [nm]                  | UV-Strahlung |      |      | Sichtbares Licht |      | Infrarot |      |
|---------------------------------|--------------|------|------|------------------|------|----------|------|
|                                 | 250          | 300  | 400  | 550              | 750  | 1000     | 1400 |
| <b>Epidermis (0,05-0,15 mm)</b> | 19 %         | 34 % | 80 % | 87 %             | 78 % | 71 %     | 44 % |
| <b>Dermis (1-4 mm)</b>          | 11 %         | 16 % | 57 % | 77 %             | 65 % | 65 %     | 28 % |
| <b>Subcutis</b>                 | -            | -    | 1 %  | 5 %              | 21 % | 17 %     | 8 %  |

Die energieärmere UVA-Strahlung dringt in tiefere Hautschichten als das UVB vor und schädigt die DNA auf indirektem Weg über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. (Tyrell 1995). Dabei wird die Energie der UVA-Strahlung von endogenen Chromophoren (Photosensibilatoren) wie Porphyrinen, Flavinen, aromatischen Aminosäuren und bestimmten Quinonen absorbiert und auf Sauerstoff übertragen. Infolgedessen werden der angeregte Singulett-Zustand ( $^1\text{O}_2$ ), Superoxidanionen ( $\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und die hochreaktiven Hydroxylradikale ( $\text{OH}^*$ ) gebildet (Klotz et al. 2001). Durch die reaktiven Sauerstoffspezies werden DNA-Basen oxidativ geschädigt, wobei 8-Hydroxyguanin einen der häufigsten UVA-induzierten Schaden darstellt (Zhang et al. 1997). Daneben resultieren DNA-Strangbrüche (Koch et al. 2001), DNA-Protein-Crosslinks (Peak und Peak 1989), aber auch Schädigungen von Proteinen und Zellmembranen durch Lipidperoxidation.

Die UVB-Strahlung wird größtenteils von der Epidermis absorbiert und dringt somit weniger weit als das UVA in die Hautschichten vor. Sie besitzt als energiereichere Strahlung ein höheres DNA-schädigendes Potential als das UVA (Young 1990) und interagiert direkt mit der DNA, u. a. durch die Bildung von Pyrimidin-Dimeren (Freeman et al. 1987) und Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidon Photoprodukten (Rosenstein und Mitchell 1987). Des Weiteren reagiert das UVB mit Proteinen und führt zu Decarboxy-

lierungen sowie Desaminierungen, Veränderungen von Primär-, Sekundär- und Tertiärstrukturen, aber auch zu einer Inaktivierung bzw. Aktivierung von Enzymen.

Um UV-induzierte Schäden zu verhindern bzw. entstandene Schäden zu reparieren, verfügt die humane Haut über eine Reihe von effektiven Mechanismen. Die „Lichtschwiele“, eine Verdickung der Epidermis, führt dazu, dass die Eindringtiefe der UV-Strahlung in die Haut abnimmt. Melaninpigmente können UV-induzierte freie Radikale abfangen und dienen gleichzeitig als effektive UV-Filter (Gilchrest und Eller 1999). Die endogen in der Haut vorliegenden Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Ascorbat (Vitamin C), Glutathion,  $\beta$ -Carotin und Ubichinol können ebenfalls mit reaktiven Sauerstoffspezies reagieren und diese unschädlich machen (Sies und Stahl 1995). Darüber hinaus besitzen die Zellen wirkungsvolle Antioxidans-Enzymsysteme wie die Superoxid-Dismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase (Anderson 1996). Die wichtigsten Reparaturmechanismen für die Beseitigung UV-induzierter DNA-Schäden stellen die Nukleotid-Excisions-Reparatur (Sancar und Tang 1993) und die Basen-Excisions-Reparatur (Demple und Harrison 1994) dar.

### 1.1.3 Photoageing

Hautalterung ist ein komplexer Vorgang, an dem neben den angeborenen Alterungsprozessen („biologische Uhr“) auch äußere Einflüsse, insbesondere die UV-Strahlung, nachhaltig beteiligt sind (Photoageing) (Gilchrest und Yaar 1992).

Die angeborene intrinsische Alterung ist ein allgemeiner Prozess, der in jedem organischen System wie der Haut genetisch determiniert ist. Klinisch zeichnet sich die „normal“ gealterte Haut durch Trockenheit, gleichmäßige Pigmentierung, feine Falten, eine gewisse Schlaffheit und gutartige Gewebewucherungen (Neoplasmen) aus (Hadshiew et al. 2000). Obwohl die durchschnittliche Dicke des Stratum corneum im Zuge der Alterung relativ gleich bleibt, finden Änderungen in der Lipidzusammensetzung und auch eine verspätete Wiederherstellung der Barrierefunktion nach Schädigung statt (Gilchrest 1989). Die Umsatzraten der Epidermis sinken um 30-50 % zwischen dem dreißigsten und achtzigsten Lebensjahr. Histologisch ist die intrinsisch gealterte Haut durch eine erhöhte Variabilität in der Dicke der Epidermis und der Größe der indi-

viduellen Keratinozyten gekennzeichnet. Sowohl die Zahl der aktiven Melanozyten als auch die der epidermalen Langerhans-Zellen ist reduziert. Dieses könnte für die verminderte UV-Protektion und die erniedrigte Immunantwort mit zunehmendem Alter verantwortlich sein. Die Dicke der Dermis ist ebenso wie die der Epidermis reduziert (Bhawan et al. 1995). Das Gleichgewicht zwischen Kollagen- bzw. Elastinsynthese und -abbau ist in Richtung der Degradation der Faserproteine verschoben und von einer vermehrten Desorganisation der Kollagenfasern begleitet. Des Weiteren ist die dermale Durchblutung und auch die Anzahl sowie Aktivität der Drüsen und Haare der Haut reduziert (Braverman 1986). Die Abflachung der Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis im Laufe der Jahre könnte einen reduzierten Nährstoffaustausch und eine erleichterte Separation der beiden Hautschichten bedingen, was zu einer erhöhten Fragilität der Haut nach Verletzungen führt (Hadshiew et al. 2000).

Viele Merkmale der intrinsisch gealterten Haut treten auch bei der chronisch UV-geschädigten Haut - zumeist in verstärkter Form - auf. Daneben gibt es einige Phänomene, die für das Photoageing charakteristisch sind. Klinisch ist die UV-geschädigte Haut durch starke Falten, eine auffällige Trockenheit und Schuppigkeit, eine ungleichmäßige Pigmentierung, Lentigines und gutartige, prämaligne sowie maligne Hautveränderungen gekennzeichnet (Kligman und Kligman 1986). Histologisch ist dieser Photoaging-Prozess vor allem durch eine auffällige Akkumulation elastotischen Materials in der Dermis gekennzeichnet („solar elastosis“) (Bernstein et al. 1994). Chen et al. (1986) demonstrierten, dass sich dieses Material hauptsächlich von den elastischen Fasern, also zum Großteil vom Elastin, ableiten lässt. Obwohl sich das elastotische Material aus den normalen Bestandteilen der elastischen Fasern zusammensetzt, sind deren supramolekulare Struktur und Funktionen schwerwiegend gestört (Uitto und Bernstein 1998). Daneben findet in UV-geschädigter Haut eine Reduktion des dermalen Kollagens um ca. 1 % pro Jahr statt (Shuster und Black 1975). Außerdem sind auch die Kollagenfasern zunehmend desorganisiert (Bernstein et al. 1996). Biochemische Analysen haben gezeigt, dass in UV-geschädigter Haut reduzierte Typ I und III Prokollagene (Talwar et al. 1995) und Cross-Links innerhalb der Kollagenmoleküle (Yamauchi et al. 1991) auftreten. Zusätzlich wurde eine erhöhte Elastin Genexpression detektiert (Bernstein et al. 1994).

Für die Ursachen der UV-bedingten Hautalterung gibt es in der Literatur verschiedene Hypothesen. So postulieren Hadshiew et al. (2000), Yaar und Gilchrest (1998) sowie Koch et al. (2001), dass die UV-abhängige Schädigung der genomischen und mitochondrialen DNA mit einer nachfolgenden Störung der zellulären Funktionen neben der Krebsentstehung auch entscheidend an den Hautalterungsprozessen beteiligt ist. Des Weiteren wird in der Literatur der Verlust der Chromosomenstabilität durch Telomerverkürzung als einer der Hauptmechanismen der zellulären Seneszenz diskutiert (Harley et al. 1990).

Fisher und Voorhees (1998) hingegen vertreten die Hypothese, dass für die frühzeitige Hautalterung hauptsächlich die Schädigung des dermalen Kollagens durch UV verantwortlich ist. 1996 wurde von Fisher et al. postuliert, dass in diesen Prozess die Matrixmetalloproteinasen involviert sind, da diese durch UV-Licht induziert dermales Kollagen degradieren können (Fisher et al. 1997).

## **1.2 Matrixmetalloproteinasen**

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind eine Gruppe eng verwandter zinkabhängiger Enzyme, die aufgrund ihrer gemeinsamen strukturellen und funktionellen Eigenschaften eine eigenständige Unterfamilie der Metalloproteinasen bilden (Stöcker et al. 1995). Die etwa zwanzig bekannten Vertreter der MMPs sind in der Lage, die wesentlichen Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) wie z. B. die Kollagene, Laminin, Elastin oder Fibronectin abzubauen (Birkedal-Hansen 1995). Dadurch sind sie in eine Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. Der kontrollierte Ab- und Umbau der ECM durch die MMPs spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, der Wundheilung, der Organbildung und der Angiogenese (Kähäri und Saarialho-Kere 1997). Im Gegensatz dazu kann eine dysregulierte MMP-Aktivität neben dem dermalen Photoageing auch an zahlreichen Erkrankungen wie der rheumatischen Arthritis, der Leberfibrose, der Paradontose, der Arteriosklerose und dem Wachstum sowie der Metastasierung von Tumoren beteiligt sein.

### 1.2.1 Einteilung und Struktur der MMPs

Die MMPs werden aufgrund ihrer Substratspezifität bzw. ihres Aufbaus aus verschiedenen Domänen in die vier Untergruppen Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine und membranständige MMPs unterteilt (siehe Tabelle 1.3, Kähäri und Saarialho-Kere 1997).

*Tabelle 1.3: Nomenklatur und Substratspezifität der bisher am besten untersuchten humanen MMPs (in Anlehnung an Kähäri und Saarialho-Kere 1997)*

| Bezeichnung                      | Substrate  |
|----------------------------------|--|
| <b>Kollagenasen:</b>             |  |
| Fibroblasten Kollagenase (MMP-1) | Kollagen III > I, II, VII, VIII, X, Aggrekan, $\alpha_2$ -Makroglobulin                              |
| Neutrophile Kollagenase (MMP-8)  | Kollagen I > III, II, Aggrekan, $\alpha_2$ -Makroglobulin  |
| Kollagenase-3 (MMP-13)           | Kollagen II > I, III, IV, IX, X, XI, Gelatin, Fibronectin, Laminin, Tenascin, Aggrekan               |
| Kollagenase-4 (MMP-18)           | Gelatin  |
| <b>Stromelysine:</b>             |  |
| Stromelysin-1 (MMP-3)            | Kollagen IV, V, IX, X, Fibronectin, Aggrekan, Nidogen, Elastin, Gelatin                              |
| Stromelysin-2 (MMP-10)           | Kollagen IV, V, IX, X, Fibronectin, Aggrekan, Nidogen, Elastin, Gelatin                              |
| Stromelysin-3 (MMP-11)           | $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor  |
| Metalloelastase (MMP-12)         | Kollagen IV, Fibronectin, Aggrekan, Nidogen, Elastin   |
| Matrilysin (MMP-7)               | Kollagen IV, Fibronectin, Aggrekan, Nidogen, Elastin   |
| <b>Gelatinasen:</b>              |  |
| Gelatinase-A (MMP-2)             | Gelatin, Kollagen IV, I, Fibronectin, Tenascin   |
| Gelatinase-B (MMP-9)             | Gelatin, Kollagen IV, I, II, V, XIV, $\alpha_2$ -Makroglobulin                                       |
| <b>Membranständige MMPs:</b>     |  |
| MT1-MMP (MMP-14)                 | pro-MMP-2 und andere MMPs, Kollagen I, II, III, Gelatin, Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Aggrekan |
| MT2-MMP (MMP-15)                 | nicht bekannt  |
| MT3-MMP (MMP-16)                 | pro-MMP-2  |
| MT4-MMP (MMP-17)                 | nicht bekannt  |

Bei der UV-bedingten frühzeitigen Hautalterung spielen die Helikasen, zu denen die Fibroblasten Kollagenase (MMP-1) gehört, eine besondere Rolle, da allein diese

Enzyme das tripelhelikale Typ I und III Kollagen der extrem stabilen Kollagenfibrillen der Dermis in thermolabile Fragmente abbauen können (Kirsner 2001). Die resultierenden charakteristischen N-terminalen  $\frac{3}{4}$  und C-terminalen  $\frac{1}{4}$  Fragmente denaturieren bei Körpertemperatur zu Produkten, die erst dann durch eine Vielzahl von weniger spezifischen Proteasen degradiert werden können.

Im Allgemeinen ist die Struktur der MMPs durch ein Signalpeptid, ein Propeptid, eine katalytische Domäne, eine Verbindungssequenz, die sogenannte „hinge“-Region, und eine Hämapexin ähnliche Domäne charakterisiert (siehe Abbildung 1.2).

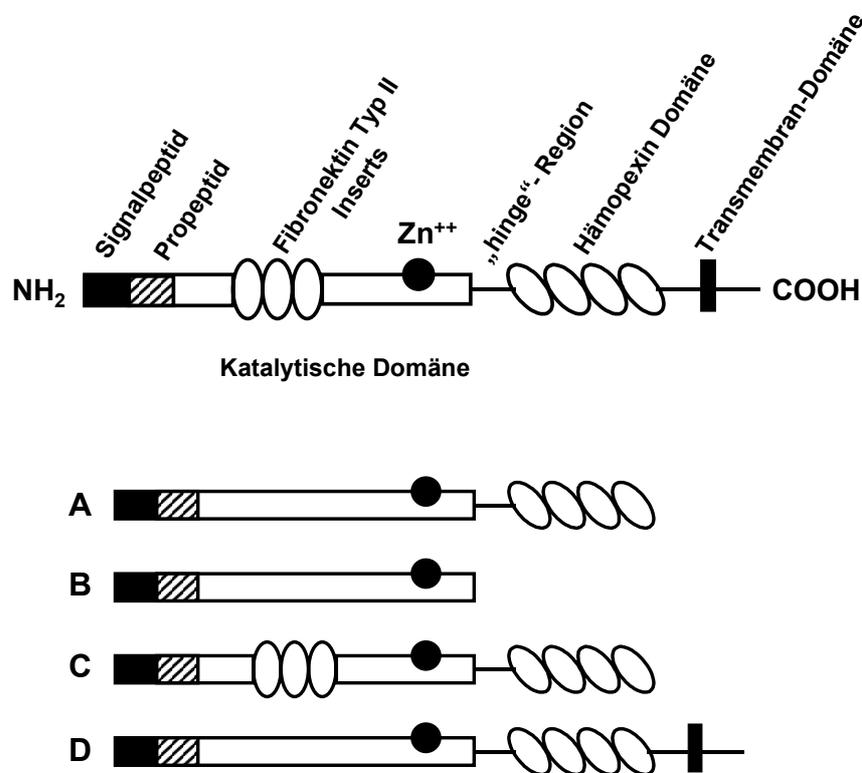


Abbildung 1.2: *Struktur der humanen MMPs*

**A:** *Kollagenasen und Stromelysine (außer MMP-7)*

**B:** *Matrilysin (MMP-7)*

**C:** *Gelatinasen*

**D:** *Membranständige MMPs*

Während das N-terminale hydrophobe Signalpeptid der Ausschleusung des Enzyms aus der Zelle dient und vor der Sekretion abgespalten wird, erhält das Propeptid die Latenz des Enzyms aufrecht und wird bei der Aktivierung proteolytisch entfernt. Die Propep-

tid-Domäne (ca. 80 Aminosäuren) besitzt eine konservierte PRCG(V/N)PD Sequenz, wobei das Cystein innerhalb dieser Sequenz („Cystein-Switch“) das katalytische Zink komplexiert, um die Latenz der Pro-MMPs aufrechtzuerhalten (Van Wart und Birkedal-Hansen 1990). Für das Stromylessin-3 (MMP-11) und die MT-MMPs, die eine Furin-Schnittstelle zwischen dem Propeptid und der katalytischen Domäne aufweisen, konnte hingegen eine intrazelluläre Aktivierung durch Furin nachgewiesen werden (Pei und Weiss 1995).

Die katalytische Domäne der MMPs (ca. 170 Aminosäuren) enthält das konservierte Aminosäuremotiv HEXXHXXGXXH zur Komplexierung eines Zinkions im aktiven Zentrum (Bode et al. 1993), wobei die drei Histidinreste die Liganden für das Zinkion darstellen (Barrett et al. 1998). Außer dem katalytischen Zinkion besitzt die katalytische Domäne zusätzlich ein strukturelles Zinkion und zwei bis drei Calciumionen, die für die Stabilität und die Expression der enzymatischen Aktivität notwendig sind (Nagase und Woessner 1999). Daneben verfügt die katalytische Domäne über ein konserviertes Methionin, welches eine einzigartige „Met-turn“ Struktur bildet. Typisch für die Kollagenasen ist ihre Helikase-Aktivität, für die die Sequenz <sup>183</sup>RWTNRFREY<sup>191</sup> in der katalytischen Domäne eins der Schlüsselemente darzustellen scheint (Chung et al. 2000).

Alle MMPs bis auf das Matrilysin (MMP-7) besitzen zusätzlich zu diesen drei Domänen eine C-terminale Hämapexin ähnliche Domäne (ca. 210 Aminosäuren), die an der Substrat- und Inhibitorbindung beteiligt ist (Tschesche und Farr 1998). Das Fehlen dieser Domäne beim MMP-7 ist aller Voraussicht nach verantwortlich für dessen breite Substratspezifität (Kähäri und Saarialho-Kere 1997). Für die Kollagenasen ist diese Hämapexin ähnliche Domäne eine unbedingte Voraussetzung für das Schneiden von tripelhelikalem interstitiellen Kollagen, obwohl die katalytische Domäne allein die proteolytische Aktivität hinsichtlich anderer Substrate behält (Nagase und Woessner 1999).

Die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 haben außerdem - spezifisch für ihre Gruppe - innerhalb der katalytischen Domäne drei Wiederholungen von Fibronektin Typ II ähnlichen Inserts (175 Aminosäuren), die mit Kollagenen und Gelatinen interagieren und daher ebenfalls für die Substratspezifität verantwortlich sind (Steffensen et

al. 1995). Typisch für die membranständigen MMPs ist eine C-terminale Transmembrandomäne (75-100 Aminosäuren), die eine Verankerung der Enzyme an der Oberfläche von Zellen ermöglicht.

### **1.2.2 Chromosomale Lokalisation der MMPs**

Bei der chromosomalen Lokalisierung der MMPs konnte auf dem langen Arm des Chromosoms 11 (11q22.2-3) ein Cluster identifiziert werden, der die Gene für diverse MMPs in folgender Reihenfolge enthält: MMP-8, MMP-10, MMP-1, MMP-3, MMP-12, MMP-7 und MMP-13 (Pendas et al. 1995). Diese Anordnung der Gene in Clusterform könnte ein Hinweis darauf sein, dass die aufgeführten Kollagenasen und Stromelysine durch sequentielle Duplikationen aus dem Gen eines gemeinsamen MMP-Vorfahrens hervorgegangen sind. Ebenso spricht die ähnliche Exon/Intron Organisation der MMP-Gene dieses Clusters für die Hypothese eines gemeinsamen Ursprungs (Pendas et al. 1997). Die anderen MMP-Gene konnten auf verschiedene Chromosomen verteilt lokalisiert werden. Sowohl die Genorte der beiden Gelatinasen wurden auf unterschiedlichen Chromosomen identifiziert (MMP-2 auf dem Chromosom 16 (16q13) und MMP-9 auf dem Chromosom 20 (20q12-13)), als auch die der membranständigen MMPs (MT1-MMP auf dem Chromosom 14 (14q12.2), MT2-MMP auf dem Chromosom 16 (16q12.2) und MT3-MMP auf dem Chromosom 8 (8q21)) (Mattei et al. 1997). Dieses lässt neben einer frühen Abspaltung der Gene voneinander auf unterschiedliche Funktionen sowie Regulationen dieser strukturell verwandten MMPs schließen.

### **1.2.3 Regulation der MMPs der Haut**

In der Haut können mehrere Zelltypen wie Keratinozyten, Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Mastzellen, Eosinophile und Neutrophile MMPs produzieren (Kähäri und Saarialho-Kere 1997). Mit der Ausnahme der Speicherung von MMP-8 (Hasty et al. 1990) und MMP-9 (Stähle-Bäckdahl und Parks 1993) in Neutrophilen sowie von MMP-7 in exokrinen Schweißdrüsen (Saarialho-Kere et al. 1995) werden die MMPs in der Haut nicht konstitutiv exprimiert, sondern durch exogene Signale wie UV-Strahlung induziert. Eine Regulation der MMP-Aktivität findet neben der Transkriptions- auch auf

der Translationsebene durch Zymogenaktivierung und eine Inhibition der proteolytischen Aktivität statt.

#### 1.2.3.1 Regulation der MMP-Genexpression

Die Transkription der MMPs wird durch eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), den epidermalen Wachstumsfaktor EGF, den Fibroblasten Wachstumsfaktor FGF und TGF- $\beta$  beeinflusst (Mauviel 1993). Aber auch chemische Substanzen wie Phorbolster, Polypeptid- und Steroidhormone sowie Onkogene (c-Fos, c-Jun, Ras) kontrollieren die Expression der MMPs auf Transkriptionsebene. Der Einfluss der verschiedenen Faktoren variiert bei den einzelnen MMPs und ist dabei abhängig vom jeweiligen Zelltyp und der Dosis der Substanz. Dementsprechend können einzelne Faktoren unterschiedliche Effekte auf die MMP-Regulation haben. So ist beispielsweise bekannt, dass TGF- $\beta$  im Falle von MMP-1 und MMP-3 eine inhibitorische, bei MMP-2 und MMP-9 jedoch eine induzierende Wirkung besitzt (Kerr et al. 1990, Salo et al. 1991). Daneben spielen bei der MMP-Genexpression Zell-Matrix Interaktionen und veränderte Zell-Zell Kontakte eine Rolle (Nagase und Woessner 1999). Fibroblasten und Endothelzellen, die in Typ I Kollagengelen kultiviert werden, exprimieren z. B. MT1-MMP, was durch  $\alpha_2\beta_1$  Integrin vermittelt zu sein scheint.

Alle induzierbaren MMP-Gene enthalten im 5'-flankierenden Promotorbereich ein AP-1 *cis*-regulatorisches Element, ungefähr in Position -70 vor der Initiationsstelle der Transkription (Gaire et al. 1994). Durch die oben aufgeführten Stimuli wird der AP-1 Transkriptionsfaktor-Komplex aktiviert, der an das AP-1 *cis*-Element im Promotor bindet und somit die Transkription der korrespondierenden MMP-Gene initiiert. AP-1 Dimere bestehen aus Mitgliedern der Jun- und Fos-Genfamilie, die über die Aktivierung von drei verschiedenen Klassen von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) induziert werden (Karin et al. 1997). Zu den MAPKs zählen die durch extrazelluläre Stimuli regulierte Kinase (ERK), die Stress-aktivierte Proteinkinase/Jun N-terminale Kinasen (SAPK/JNKs) und p38. Im Allgemeinen resultiert die Aktivierung der ERK-Signaltransduktionskaskade in einer Phosphorylierung von Elk-1 und einer nachfolgenden Aktivierung der c-Fos Transkription. Die Aktivierung von den JNKs bewirkt eine

Phosphorylierung von c-Jun. ATF-2 wird durch die JNKs und p38 phosphoryliert. Durch beides wird die Transkription von c-Jun initiiert. In Abbildung 1.3 sind die drei MAP Kinase-Reaktionswege exemplarisch für den UV-Einfluss auf humane Haut *in vivo* dargestellt.

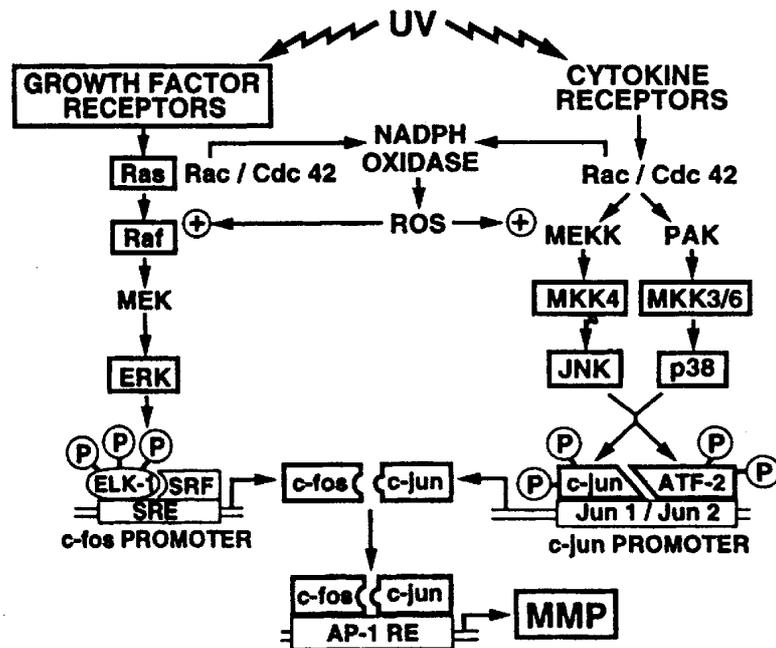


Abbildung 1.3: *Induktion der MAP Kinase Signaltransduktionswege durch UV-Einfluss auf humane Haut in vivo (Fisher und Vorhees 1998)*

Die UV-Aktivierung der Wachstumsfaktor- oder Zytokin-Rezeptoren führt über Rac zu einer Aktivierung der NADPH Oxidase. Dadurch werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, die für die MAP Kinase Aktivierung notwendig sind. Die Aktivierung von ERK und JNK/p38 resultiert in einer Phosphorylierung (P) der Transkriptionsfaktoren ELK-1 bzw. c-Jun/ATF-2. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor AP-1 (c-fos/c-jun) induziert, was wiederum zu einer Hochregulation der MMPs führt. Die Moleküle, für die gezeigt werden konnte, dass sie in humaner Haut *in vivo* durch UV aktiviert werden, sind mit einem Kästchen umrahmt.

Zusätzlich zur AP-1 Bindungsstelle konnte ein weiteres *cis*-Element, PEA3, im Promotorbereich einiger MMPs (MMP-1, -3, -7, -9, -10, -11, -12, -13) identifiziert

werden (Pendas et al. 1997). Allerdings variiert dessen genaue Lokalisation weit stärker als beim AP-1. Das PEA3 Element bindet Mitglieder der ETS-Familie und reguliert die MMP-Expression in Kooperation mit AP-1 (Kähäri und Saarialho-Kere 1997, Bidder et al. 2000).

#### 1.2.3.2 Regulation der MMPs durch Zymogenaktivierung

Alle MMPs werden als Proenzyme synthetisiert und zumeist als inaktive Pro-MMPs sezerniert, mit Ausnahme der MMPs, die durch Furin aktiviert werden (siehe oben, Nagase und Woessner 1999). So wird MMP-11 bereits in aktivierter Form aus den Zellen geschleust (Barrett et al. 1998).

Ein wichtiger Kontrollmechanismus für die enzymatische Aktivität der MMPs ist die Entfernung des Propeptids durch Proteolyse, wobei dieser Prozess der Zymogenaktivierung als „Cystein-Switch“ bezeichnet wird (Van Wart und Birkedal-Hansen 1990). Die Latenz der Pro-MMPs beruht darauf, dass die Propeptid-Domäne das aktive Zentrum komplexiert und damit den Zugang der Substrate zum katalytischen Zentrum blockiert. Dabei komplexiert die Thiolgruppe des Cysteinrestes aus der konservierten Propeptidsequenz PRCG(V/N)PD das katalytische Zinkion, so dass das für die Katalyse erforderliche Wassermolekül nicht gebunden werden kann. Bei der Aktivierung wird zunächst die kovalente Zink-Cystein Bindung destabilisiert. Diese Destabilisierung kann entweder durch eine schrittweise Spaltung des Propeptids durch Proteasen wie Trypsin, Plasmin, bakterielle Proteasen (bei Entzündungen), aber auch durch andere MMPs erfolgen. Oder sie kann durch denaturierende Agenzien, Erhitzen, Oxidationsmittel, Disulfide oder Quecksilberverbindungen zu Stande kommen. Im Anschluss an die Destabilisierung findet eine vollständige Aufhebung der Wechselwirkung zwischen dem Cystein und dem Zink statt, wobei dieser letzte Schritt zumeist autokatalytisch abläuft.

Eine MMP-Aktivierung kann auch durch membrangebundene MT-MMPs erfolgen, womit zusätzlich Aktivierungsmechanismen an den Zelloberflächen bestehen. So können sich Komplexe aus Pro-MMP-2 und TIMP-2 an aktivierte MT-MMPs binden, die die latente MMP-2 Form zur aktiven prozessieren (Sato et al. 1994, Strongin et al.

1995). Diese Form der Zymogenaktivierung spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorzell-Invasion und Angiogenese (Nagase und Woessner 1999).

Wird Pro-MMP-1 durch die Stromelysine MMP-3 oder MMP-10 aktiviert, wird eine Kollagenase mit fünf- bis zwölfmal höherer spezifischer Aktivität im Vergleich zur autokatalytisch aktivierten Form erzeugt (Suzuki et al. 1990). Für dieses Phänomen wurde der Begriff „Superaktivierung“ geprägt. Sequenzanalysen ergaben, dass bei der „Superaktivierung“ durch Stromelysin die Spaltungsstelle des Propeptids um zwei Aminosäuren Richtung C-Terminus verschoben ist, so dass das mature aktive MMP mit einem N-terminalen stark konservierten Phenylalaninrest beginnt. Da dieser minimale Unterschied mit einer gravierenden Erhöhung der spezifischen Aktivität von MMP-1 einhergeht, wird angenommen, dass MMP-3 und MMP-10 eine wichtige Rolle bei der *in vivo* Aktivierung von Prokollagenasen spielen.

### 1.2.3.3 Inhibition der MMP-Aktivität durch TIMPs

Die proteolytische Aktivität der MMPs wird neben der Hemmung durch unspezifische Inhibitoren wie  $\alpha_2$ -Makroglobulin und  $\alpha_1$ -Antiprotease insbesondere durch die spezifischen „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) reguliert (Kähäri und Saarialho-Kere 1997). Die TIMP-Familie, die von den gleichen Zellen exprimiert wird, die auch die MMPs produzieren (Tschesche und Farr 1998), besteht aus vier Mitgliedern (TIMP-1, -2, -3, -4) mit einer Molekularmasse von 22-30 kDa und stellt eine homologe Gruppe mit einer Sequenzidentität von 40-50 % dar (Greene et al. 1996). Alle TIMPs inhibieren aktivierte MMPs mit einer relativ geringen Selektivität, indem sie feste, nicht-kovalente 1:1 Komplexe bilden (Willenbrock und Murphy 1994). Ausnahmen sind die relativ schwachen Interaktionen zwischen TIMP-1 und MT1-MMP bzw. MMP-2. Charakteristisch für die TIMPs ist ihre Struktur aus sechs disulfidverbrückten Schleifen, die eine inhibitorische N-terminale und eine bindungsverstärkende C-terminale Domäne bilden (Gomis-Rüth et al. 1997). Diese beiden Domänen stehen über eine Disulfidbrücke zwischen dem Cystein<sup>1</sup> und Cystein<sup>70</sup> in Verbindung. Die N-terminale Aminosäuresequenz C<sup>1</sup>TCVP der TIMPs bindet an das aktive Zentrum der MMPs ähnlich wie die MMP-Substrate, wobei das Zinkion unmittelbar von der Carbonyl- und Aminogruppe des N-terminalen Cysteins<sup>1</sup> komplexiert wird. Dadurch

verhindern sie ähnlich wie beim Propeptid der MMPs die Bindung des katalytisch wichtigen Wassermoleküls und der Substrate.

Zunehmend gelten die TIMPs als multifunktionelle Enzyme, da sie nicht nur die MMPs inhibieren, sondern auch auf die Bildung der Erythrozyten einwirken. Zudem stimulieren sie das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zellen, beeinflussen deren Morphologie und Adhäsion, können die Angiogenese hemmen und sind möglicherweise an der Zellzyklusregulation und Apoptose beteiligt (Gomez et al. 1997).

### **1.3 Neutrophile Elastase**

Neben einem Abbau der Kollagenfibrillen durch die MMPs ist die frühzeitige UV-bedingte Hautalterung durch eine Akkumulation elastotischen Materials in der Dermis gekennzeichnet. In diesen Prozess ist die neutrophile Elastase, eine Serinprotease, involviert, die aktiviert die elastischen Fasern der Haut degradieren kann (Uitto et al. 1995). Die Hauptquelle für die neutrophile Elastase sind dabei wahrscheinlich die Neutrophilen Zellen und die Mastzellen (Starcher und Conrad 1995). Diese inflammatorischen Zellen sind in der Dermis sonnenexponierter Haut ungewöhnlich häufig in der Nähe elastotischen Materials zu finden (Pasquali-Ronchetti und Baccarani-Contri 1997, Frances und Robert 1984). Laut Takahashi et al. (1988) wird die neutrophile Elastase ausschließlich in den Myeloid-Vorläuferzellen des Knochenmarks exprimiert und in Granula reifer neutrophiler Zellen vor dem Verlassen des Knochenmarks gespeichert. Von den neutrophilen Zellen wird die Elastase z. B. in die Dermis transportiert. Nach der Stimulierung oder Lyse der Transportzellen wird die Elastase am Ort ihrer proteolytischen Aktivierung wie in der Nähe von elastischen Fasern ausgeschleust.

### **1.4 Fragestellung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode (Gibson et al. 1996) Assays für den quantitativen Nachweis der Genexpression von MMP-1, der als Helikase eine besondere Bedeutung beim Photoageing zukommt, und ihres spezifischen Inhibitoren TIMP-1 zu entwickeln. Nach der Optimierung dieser Systeme sollte

als Schwerpunkt der Dissertation erstmals der solare UV-Einfluss auf die Genexpression der Hautalterungsmarker MMP-1 und TIMP-1 *in vivo* quantitativ für individuelle Probanden bestimmt werden. Neben des Effektes von „Solar Simulated Radiation“ (SSR), die einen direkten Bezug zu der auf die Erdoberfläche treffenden solaren UV-Strahlung hat, sollten auch die relativen Wirkungen der UVA- und UVB-Exposition untersucht werden. Zudem war es die Aufgabe, den Einfluss der UV-Strahlung auf die MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression genauer zu lokalisieren und daher außer „intakter“ Haut auch separat die Epidermis und Dermis zu analysieren. Eine weitere Studie sollte aufklären, welche Effekte mehrmalige suberythemale SSR-Expositionen, denen der Mensch in der Natur ausgesetzt ist, auf den MMP-1 und TIMP-1 mRNA Level haben.

Es ist bekannt, dass neben der UV-Strahlung der Sonne auch das Rauchen stark zu einer frühzeitigen Hautalterung beiträgt (Ernster et al. 1995). Da die molekularen Grundlagen der Faltenentstehung durch das Rauchen noch überwiegend ungeklärt sind, sollte ferner die Wirkung des exogenen Faktors Rauchen auf die MMP-1 und TIMP-1 Genexpression geprüft werden.

Parallel dazu sollten vergleichende Untersuchungen auf mRNA und Proteinebene *in vitro* Aufschluss über weitere Regulationsmechanismen von MMP-1 und TIMP-1 wie z. B. den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) geben. Diese *in vitro* Systeme könnten in Zukunft für die Entwicklung geeigneter protektiver Wirkstoffe zum Schutz vor UV-induzierter Hautalterung Anwendung finden.

Mittels der sensitiven TaqMan<sup>®</sup>-Technik ist es möglich, trotz limitierter Mengen an Untersuchungsmaterial mehrere Zielgene („Multifaktorscreening“) gleichzeitig zu analysieren. Daher sollten außer den MMP-1 und TIMP-1 Targets zwei weitere TaqMan<sup>®</sup>-Systeme für potentielle Hautalterungsmarker, für Elastin und sein degradierendes Enzym Elastase, etabliert werden, um sie hinsichtlich ihrer Einsatzmöglichkeiten bei *in vivo* Produktstudien zu prüfen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System: PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Absaugpumpe (Absauggerät Miniport): Servox Medizintechnik GmbH, Köln

Autoklav (GVA 570): Fritz Gössner, Hamburg

Brutschrank (Typ BB16 Cu): Heraeus Instruments, Hanau

Elektrophoresekammer (Horizon<sup>™</sup> Horizontal Gel Electrophoresis System): Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

Folienschweißgerät (Polystar<sup>®</sup> 401 HM): Rische und Herfurth GmbH, Hamburg

Geldokumentation:

Kamera (CS-1): Cybertech, Berlin

Monitor (CCTV): Hantarex, Florenz, Italien

Printer (P68E): Cybertech, Berlin

UV-Transilluminator (TFX 20M): Vilber Lourmat, Marne la Vallee, Frankreich

Video Copy-Processor: Mitsubishi, Japan

Heizblock (Thermomixer 5436): Eppendorf, Hamburg

Heizrührer (Type MR 2002): Heidolph Instruments, Schwabach

Homogenisiergerät (Ultra Turrax<sup>®</sup>): IKA Labortechnik GmbH, Staufen

Horizontalschwenker (Typ 3014): Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

Hybridisierungsöfen: Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen

Hybridisierungsröhren: Amersham, Braunschweig

Kühlgeräte:

-80 °C: National Lab, Mölln

-20 °C: Liebherr, Ochsenhausen

+4 °C: Bosch, München

Lichtmikroskop (Typ Wilovert S): Hund GmbH, Wetzlar

Lumi-Imager<sup>™</sup>: Boehringer Mannheim, Mannheim

## Netzgeräte:

Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150: Pharmacia, Freiburg

Power Supply (Typ 1000/500): Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA

Nukleinsäurequantifizierungsgerät (GeneQuant<sup>®</sup> RNA/DNA Calculator): Pharmacia LKB, England

pH-Meter (Typ 440): Corning, New York, USA

## Photographieren von Zellen:

Mikroskop (Axiovert 135 TV): Zeiss, Jena

Kamera (CF20 DXC Air): KAPPA Messtechnik, Gleichen

## Photometer:

Spectra Max 250: Molecular Devices, Sunnyvale, USA

SLT Spectra Image: SLT Labinstrumente Deutschland, Crailsheim

Pinzetten (gebogen): Bochem Laborbedarf, Weilburg/Lahn

Pipetten (Reference<sup>®</sup> variabel: 0,5–10 µl, 10–100 µl, 100–1000 µl): Eppendorf, Hamburg

Pipettierhilfe (pipetus<sup>®</sup>-akku): Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

Quarzglasküvetten (5 mm, blue spot): Hellma, Müllheim

Radiometer (IL-1700): International Light, Newburyport, MA, USA

Scheren (gebogen): Hammacher, Solingen

Sterile Werkbank (Lamin Air, Typ HBB 2448 S): Heraeus Instruments, Hanau

UVA-Lichtquelle (UVASPOT 400): Dr. Hönle, Planegg-Martinsried

UV-Crosslinker (UV-Stratalinker): Stratagene, La Jolla, CA, USA

## Vakuumentrifuge:

Vacuum Concentrator: Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen

Kühlfalle: Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen

Vortexer (Vibrofix VF 1 Electronic): IKA Labortechnik GmbH, Staufen

## Waagen:

AE 200 Delta Range, Mettler, Gießen

AT 261 Delta Range, Mettler, Gießen

Typ U 4600 P, Sartorius, Göttingen

Wasserbad (Typ 1002): Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

Zellzählkammer (nach Fuchs-Rosenthal): Brand, Wertheim

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge (Rotanta RP): Hettich, Tuttlingen

Kühlzentrifuge (5417R): Eppendorf, Hamburg

Tischzentrifuge (5415C): Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser: Dargartz, Hamburg

Filterpapier für Northern-Blotting (GB 002): Schleicher und Schüll, Dassel

Gewebekulturflaschen (T25, T75, T175): Greiner, Frickenhausen

Gewebekulturschalen (Ø 60 mm): Greiner, Frickenhausen

Kryoröhrchen mit Innengewinde: Greiner, Frickenhausen

MicroAmp<sup>®</sup> Optical Caps (8 caps/strip): PE Applied Biosystems, Weiterstadt

MicroAmp<sup>®</sup> Optical Tubes (0,2 ml): PE Applied Biosystems, Weiterstadt

Mikrotiterplatten (96-well): Greiner, Frickenhausen

Nylonmembran (positiv geladen): Boehringer Mannheim, Mannheim

Parafilm<sup>®</sup>: American National Can, Chicago, IL, USA

Pasteurpipetten: Brand, Wertheim

Pipettenspitzen gestopft (10 µl, 100 µl, 1000 µl): Biozym, Hessisch Oldendorf

oder Aerosol Resistant Tips<sup>®</sup>: Molecular Bio-Products, San Diego, CA, USA

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml): Eppendorf, Hamburg

Sterile Pipetten gestopft (5 ml, 10 ml, 25 ml): Greiner, Frickenhausen

Sterilfilter (0,2 µm): Sartorius, Göttingen

Transpore-Membran<sup>™</sup>: 3M Health Care, Borken

Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml): Greiner, Frickenhausen

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

Agarose (Ultrapure): Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

Anti-Digoxigenin-AP (Fab-Fragmente): Boehringer Mannheim, Mannheim

α-Tocopherol (Vitamin E): Sigma, Deisenhofen

Blocking-Reagenz: Boehringer Mannheim, Mannheim

Borsäure: Sigma, Deisenhofen

Bromphenolblau: Merck, Darmstadt  
Chloroform: Merck, Darmstadt  
Collagen R: Serva, Heidelberg  
DEPC-behandeltes Wasser: Fluka, Neu-Ulm  
DIG CDP-*Star*<sup>TM</sup>: Boehringer Mannheim, Mannheim  
DIG Easy Hyb Hybridisierungslösung: Boehringer Mannheim, Mannheim  
Dimethylsulfoxid: Merck, Darmstadt  
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM): Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein  
DMEM mit 20 mM HEPES: Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein  
Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS): PAA Laboratories GmbH, Cölbe  
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA): Sigma, Deisenhofen  
Ethanol: Merck, Darmstadt  
Ethidiumbromid (0,7 mg/ml): Eurobio, Raunheim  
Fötale Kälberserum (FCS): PAA Laboratories GmbH, Cölbe  
Formaldehyd: Fluka, Neu-Ulm  
Formamid: Fluka, Neu-Ulm  
Gentamicin: Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein  
Glycerin: Sigma, Deisenhofen  
Isopropanol: Merck, Darmstadt  
L-Glutamin: Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein  
Magnesiumchlorid: Merck, Darmstadt  
Maleinsäure: Merck, Darmstadt  
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS): Sigma, Deisenhofen  
MP-Agarose: Boehringer Mannheim, Mannheim  
Natriumacetat: Merck, Darmstadt  
Natriumchlorid: Merck, Darmstadt  
Natriumcitrat: Merck, Darmstadt  
Natriumhydroxid: Merck, Darmstadt  
Neutralrot: Sigma, Deisenhofen  
RNAzol<sup>TM</sup>: Biozol, Eching oder WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden/Ts.  
Nutrient Mixture F-12 HAM: Sigma, Deisenhofen  
Salzsäure: Merck, Darmstadt

Sodiumdodecylsulfat (SDS): Merck, Darmstadt

Sterilium: Bode Chemie, Hamburg

Tris: Merck, Darmstadt

Trypsin-EDTA (10 x): Gibco BRL, Life Technologies, Eggenstein

Tween<sup>®</sup> 20: Sigma, Deisenhofen

Wasserstoffperoxid (30 %): Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Xylencyanolblau: Merck, Darmstadt

## **2.4 Kits**

MMP-1 ELISA: Oncogene, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Ts.

MMP-1/TIMP-1 Komplex ELISA: Oncogene, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Ts.

TIMP-1 ELISA: Oncogene, Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/Ts.

RNeasy<sup>®</sup> Total RNA Kit: Qiagen, Hilden

TaqMan<sup>®</sup> EZ RT-PCR Kit: PE Applied Biosystems, Weiterstadt

## 2.5 Puffer und Medien

|   |  |
|---|--|
| <u>10 x DNA-Probenpuffer</u>            | 50 % Glycerin, 0,2 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanolblau, 49,7 % 1 x TBE                              |
| <u>10 x MOPS</u>                        | 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0   |
| <u>10 x TBE</u>                         | 900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 25 mM EDTA   |
| <u>20 x SSC</u>                         | 3 M NaCl, 300 mM Natriumcitrat, pH 7,0   |
| <u>Auftragspuffer</u>                   | 50 % (v/v) Formamid (deionisiert), 6 % (v/v) Formaldehyd, 1 x MOPS, 0,08 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) Glycerin |
| <u>Biopsie-Transportmedium</u>          | DMEM mit 20 mM HEPES, 20 % (v/v) FCS und 0,1 mg/ml Gentamicin  |
| <u>DIG Puffer 1 (Maleinsäurepuffer)</u> | 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5  |
| <u>DIG Puffer 3 (Detektionspuffer)</u>  | 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 9,5   |
| <u>HDF-Kulturmedium</u>                 | DMEM mit 22,5 % (v/v) F-12, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Gentamicin und 10 % (v/v) FCS                                  |

## 2.6 HDF-Zellkulturen (*in vitro* Hautmaterial)

Humane dermale Fibroblasten (HDFs) wurden aus Hautbiopsien isoliert, die bei chirurgischen Eingriffen im Allgemeinen Krankenhaus St. Georg, Hamburg, im Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg, oder in der Schönheitsklinik Dr. med. H.-J. G. Bargmann, Hamburg, anfielen. Die verwendeten Biopsien sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Biopsien für die Isolierung von HDF-Zellen

| Spender | Alter | Geschlecht | Phototyp | Entnahmestelle |
|---------|-------|------------|----------|----------------|
| 1       | > 50  | M          | III      | Schulter       |
| 2       | 53    | F          | ?        | Gesicht        |
| 3       | 34    | F          | ?        | Bauch          |
| 4       | 49    | F          | ?        | ?              |
| 5       | 48    | F          | ?        | ?              |
| 6       | 41    | F          | II       | Leiste         |
| 7       | 36    | F          | ?        | ?              |
| 8       | 50-60 | F          | III      | Brust          |

## 2.7 Stanzbiopsien (*in vivo* Hautmaterial)

Die in Tabelle 2.2 aufgelisteten gesunden Spender der Stanzbiopsien wurden im Labor von Prof. Dr. Antony R. Young (Department of Environmental Dermatology, St. John's Institute of Dermatology, King's College London, St. Thomas' Hospital, London, UK) rekrutiert. Jeder Proband wurde über die Durchführung der Studien genau informiert und gab sein schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an den Studien, die von der Ethikkommission des St. Thomas' Hospital zuvor genehmigt worden waren.

Tabelle 2.2: Stanzbiopsien

| <b>Spender</b> | <b>Alter</b> | <b>Geschlecht</b> | <b>Phototyp</b> | <b>Raucherstatus</b> |
|----------------|--------------|-------------------|-----------------|----------------------|
| 1              | 24           | F                 | II              | 10/Tag               |
| 2              | 33           | M                 | I               | Nichtraucher         |
| 3              | 45           | M                 | II              | Raucher              |
| 4              | 27           | M                 | II              | Nichtraucher         |
| 5              | 28           | F                 | II              | 20/Tag, 6 Jahre      |
| 6              | 31           | M                 | II              | 10/Tag               |
| 7              | 25           | F                 | II              | Nichtraucher         |
| 8              | 33           | M                 | II              | 20/Tag, 16 Jahre     |
| 9              | 29           | F                 | I               | Raucher              |
| 10             | 23           | M                 | II              | Nichtraucher         |
| 11             | 20           | F                 | II              | Nichtraucher         |
| 12             | 20           | F                 | II              | Nichtraucher         |
| 13             | 35           | M                 | I               | 3/Tag, 18 Jahre      |
| 14             | 19           | F                 | II              | Nichtraucher         |
| 15             | 24           | M                 | II              | 15/Tag, 10 Jahre     |
| 16             | 27           | M                 | II              | 20/Tag, 12 Jahre     |
| 17             | 19           | M                 | II              | Nichtraucher         |
| 18             | 19           | F                 | II              | 20/Tag, 3 Jahre      |
| 19             | 36           | M                 | II              | Nichtraucher         |
| 20             | 34           | F                 | II              | Nichtraucher         |
| 21             | 35           | M                 | I               | Nichtraucher         |
| 22             | 19           | F                 | II              | Nichtraucher         |
| 23             | 35           | M                 | II              | 12/Tag, 18 Jahre     |
| 24             | 26           | M                 | II              | 20/Tag, 10 Jahre     |
| 25             | 22           | M                 | II              | 13/Tag, 6 Jahre      |
| 26             | 22           | F                 | II              | 20/Tag, 3 Jahre      |
| 27             | 22           | M                 | II              | Nichtraucher         |
| 28             | 27           | M                 | II              | Ex-Raucher           |
| 29             | 24           | M                 | II              | Ex-Raucher           |
| 30             | 31           | M                 | II              | Nichtraucher         |
| 31             | 29           | F                 | II              | Nichtraucher         |
| 32             | 21           | F                 | I               | Nichtraucher         |
| 33             | 20           | M                 | II              | Nichtraucher         |

| Spender | Alter | Geschlecht | Phototyp | Raucherstatus |
|---------|-------|------------|----------|---------------|
| 34      | 23    | F          | II       | Ex-Raucher    |
| 35      | 21    | F          | II       | Nichtraucher  |
| 36      | 27    | F          | II       | Nichtraucher  |
| 37      | 24    | F          | II       | Nichtraucher  |
| 38      | 24    | F          | II       | Nichtraucher  |
| 39      | 27    | M          | II       | Nichtraucher  |

## 2.8 Oligonukleotide

### 2.8.1 Northern-Sonden

Die Sonden für die Northern-Analyse wurden von Herrn H. Mielke (Kst. 4212, Beiersdorf AG, Hamburg) bereitgestellt.

Isolierte Gesamt-RNA aus HDF-Zellen wurde mit Hilfe des First-Strand cDNA Synthesis Kits von Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, in cDNA umgeschrieben. Spezifische HPLC-gereinigte Primer für die Synthese der jeweiligen Sonde wurden von MWG Biotech, Ebersberg, bezogen. Nach der PCR mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Oligonukleotiden wurden die Amplifikate mit dem DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7), Boehringer Mannheim, *in vitro* transkribiert und DIG-markiert.

Tabelle 2.3: Primer für die Northern-Sonden

| Target | Primer     | Sequenz (5'-3')                                      | Amplifikat             |
|--------|------------|--|------------------------|
| GAPDH  | pGAP-3     | GTCTTCACCACCATGGAGAAGGC                              | 395 bp + T7<br>(26 bp) |
|        | pGAP-T7-3  | TTCTAATACGACTCACTATAGGGAGGG<br>GCCATGCCAGTGAGCTTCCC  |                        |
| MMP-1  | COLA-NO-2  | AGCAAATGCAGGAATTCITTTGGGC                            | 538 bp + T7<br>(26 bp) |
|        | COLA-NO-T7 | TCCTAATACGACTCACTATAGGGAGGA<br>CCACTGAAGGTGTAGCTAGGG |                        |

## 2.8.2 TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Primer und Sonden

Die HPLC-gereinigten Primer und Sonden für die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktionen wurden bei PE Applied Biosystems, Weiterstadt, erworben. Die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde für das Housekeeping-Gen GAPDH wurde vom Hersteller mit dem Reporter-Farbstoff VIC markiert. Die übrigen Sonden wurden von PE Applied Biosystems am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM versehen.

Die Oligonukleotidsequenzen und die entsprechenden Amplifikatlängen für die einzelnen TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Systeme sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Systeme

| Target          | Oligonukleotide | Sequenz (5'-3')                  | Amplifikat |
|-----------------|-----------------|----------------------------------|------------|
| <b>GAPDH</b>    | Forward Primer  | TGGGTGTGAACCATGAGAAG             | 76 bp      |
|                 | Sonde           | CCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCC        |            |
|                 | Reverse Primer  | GCTAAGCAGTTGGTGGTGC              |            |
| <b>MMP-1</b>    | Forward Primer  | AGCTAGCTCAGGATGACATTGATG         | 73 bp      |
|                 | Sonde           | CATCCAAGCCATATATGGACGTTCC<br>CAA |            |
|                 | Reverse Primer  | CCGATGGGCTGGACAGG                |            |
| <b>TIMP-1</b>   | Forward Primer  | TGGTGTCCCCACGAACTTG              | 63 bp      |
|                 | Sonde           | CCCTGATGACGAGGTCGGAATTGC         |            |
|                 | Reverse Primer  | CACCCACAGACGGCCTTC               |            |
| <b>Elastin</b>  | Forward Primer  | AGTTTCCCTGTGGTGTAGGGC            | 90 bp      |
|                 | Sonde           | TCCATAGCCACCAGGCAGCTTGG          |            |
|                 | Reverse Primer  | GGGACCGCAACCTGGAGT               |            |
| <b>Elastase</b> | Forward Primer  | TGCACGTTGGCGTTGATG               | 90 bp      |
|                 | Sonde           | CCGACCCGTTGAGCTGGAGAATCAC        |            |
|                 | Reverse Primer  | CTTCGAAAACGGCTACGACC             |            |

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkulturtechnik**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Der Zustand und Konfluenzgrad der HDF-Zellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch überprüft.

#### **3.1.1 Isolierung von HDF-Zellen**

Humane dermale Fibroblasten wurden aus der Dermis von humanen Hautbiopsien isoliert (Tabelle 2.1).

Vorbereitend wurden Zellkulturschalen mit Collagen R (2 mg/ml in 0,1 % Essigsäure) unter der Sterilbank beschichtet. Nach dem Erhalt einer Hautbiopsie wurde diese direkt dem RT-warmen Transportmedium entnommen. Das Unterhautfettgewebe wurde präparativ entfernt, und die Biopsie wurde in ca. 5 mm x 5 mm große Stücke geschnitten. Mit der Epidermis nach oben und der Dermis nach unten orientiert wurden jeweils ein bis drei Hautstücke auf den mit Collagen R beschichteten Boden einer Zellkulturschale überführt. Nach dem Antrocknen wurden die Biopsien vorsichtig mit 5 ml HDF-Medium pro Kulturschale überschichtet, ohne dass sich die Hautstückchen vom Boden lösten, und im Brutschrank bei 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub>-Partialdruck und Wasserdampfsättigung inkubiert. Nach einigen Tagen konnten auswachsende Keratinozyten beobachtet werden, die zunehmend von Fibroblasten in dem für sie optimalen HDF-Medium verdrängt wurden. Beim Erreichen einer Konfluenz von ca. 80-90 % der primären HDF-Zellen wurden die Biopsiestücke verworfen und die Zellen in T75-Zellkulturflaschen umgesetzt.

#### **3.1.2 Kultivierung von Zellkulturen**

Die HDF-Zellen wurden in HDF-Medium im Brutschrank bei 37 °C, 7 % CO<sub>2</sub>-Partialdruck und Wasserdampfsättigung der Luft kultiviert. Alle zwei bis drei Tage

wurde das Medium der Gewebekulturflaschen oder -schalen erneuert. Bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % wurden die adhärenen, als Monolayer wachsenden Fibroblasten passagiert. Dafür wurde unter der Sterilbank das HDF-Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen gewaschen. Durch Zugabe von 10 x Trypsin-EDTA für 30 sec, Absaugen der konzentrierten Enzymlösung und einer anschließenden sechsminütigen Inkubation im 37 °C-Brutschrank erfolgte das Ablösen des Zellrasens. Dieser Verdau wurde durch das Aufnehmen der Fibroblasten in HDF-Medium abgestoppt, da das FCS des Mediums das Trypsin inaktiviert. Im Verhältnis 1:3 wurden die Zellen in neue Zellkulturflaschen (ca.  $10^6$  Zellen/T175) oder für Versuche in Zellkulturschalen ( $1,5 \times 10^5$  Zellen/60 mm, Passage: 3-24) ausgesät.

### 3.1.3 Zellzahlbestimmung nach Fuchs-Rosenthal

Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach der Methode von Fuchs-Rosenthal. Die mit einem Deckglas versehene Zählkammer wurde mit ca. 20  $\mu\text{l}$  einer HDF-Zellsuspension (abtrypsinierte Fibroblasten in HDF-Medium) bestückt. Zur Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden fünf große Quadrate ( $1 \text{ mm}^2$ ) bestehend aus 16 kleinen ( $0,06251 \text{ mm}^2$ , Tiefe: 0,2 mm) unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, wobei die Zellen auf den oberen und rechten Grenzen einbezogen wurden. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus folgender Gleichung:

$$N_{gesamt} = \sum N_{5GQ} \times 10^3 \times V [ml] \quad (3.1)$$

$N_{gesamt}$  = Gesamtzellzahl

$N_{5GQ}$  = Zellzahl der 5 großen Quadrate

$V$  = Gesamtvolumen

### 3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von HDF-Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren: Die Zellzahl abtrypsiniertes Fibroblasten wurde bestimmt und die Zellsuspension für 5 min bei 900 rpm (4 °C) aufkonzentriert. Das Pellet wurde in HDF-Medium mit 10 % DMSO aufgenommen, so dass eine Endkonzentration von  $10^6$  Zellen/ml

vorlag. Pro Kryoröhrchen wurden 1 ml Zellsuspension zunächst auf Eis gehalten, dann bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt, bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  über Nacht eingefroren und schließlich in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

Zum Auftauen der Fibroblasten musste das entsprechende Kryoröhrchen kurz zum Druckausgleich für den entweichenden Stickstoff geöffnet werden. Die aufgetauten HDF-Zellen wurden in 12 ml HDF-Medium aufgenommen, in eine T75-Gewebekulturflasche überführt und über Nacht im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Brutschrank inkubiert. Um die Reste des toxischen DMSOs zu entfernen, wurde direkt am nächsten Tag ein Medienwechsel durchgeführt.

## **3.2 Inkubation von HDF-Zellen mit verschiedenen Substanzen**

### **3.2.1 Inkubation mit $\alpha$ -Tocopherol**

Als Stammlösung wurden 200 mg des Antioxidans  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) pro ml Ethanol mit Hilfe des Vortex-Gerätes gelöst, mit Argon überschichtet, aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Entsprechende Mengen der Stammlösung wurden in HDF-Medium aufgenommen und mit einer Endkonzentration von 3 mM, der im Labor gängigen, durch Zytotoxizitätstests ermittelten Konzentration, nach kräftigem Vortexen für die Experimente eingesetzt. Dabei wurde das Ethanol stärker als 1:100 verdünnt, so dass eine zytotoxische Wirkung dieses Lösungsmittels ausgeschlossen werden konnte (Labordaten). Generell wurde das lichtempfindliche Vitamin E soweit möglich vor UV-Einfluss geschützt.

$1,5 \times 10^5$  Fibroblasten wurden pro 60 mm-Gewebekulturschale in HDF-Medium ausgesät und 1-2 Tage im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 24 h mit 3 mM Vitamin E im  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden parallel Ansätze mit HDF-Medium ohne Antioxidans eingesetzt. Im Anschluss an die Inkubation mit  $\alpha$ -Tocopherol wurden die HDF-Zellen mit UVA bestrahlt, oder die Gesamt-RNA wurde direkt für die Analyse der MMP-1 und GAPDH mRNA mittels Northern-Analyse isoliert.

### 3.2.2 Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

HDF-Zellen wurden durch exogene Exposition mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidativem Stress ausgesetzt. 1,5 x 10<sup>5</sup> Fibroblasten wurden pro 60 mm-Zellkulturschale in HDF-Medium ausgesät und 1-2 Tage im 37 °C-Brutschrank kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in Anlehnung an Brenneisen et al. (1997) mit frisch angesetztem 0,1 bzw. 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HDF-Medium oder PBS (mit Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen) für 1 h im 37 °C-Brutschrank nebst entsprechenden Kontrollen inkubiert. Anschließend wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung entfernt und durch frisches HDF-Medium ersetzt. Nach 24 h Inkubation im 37 °C-Brutschrank wurde die RNA isoliert und die MMP-1, TIMP-1 und GAPDH mRNA-Expression der HDF-Zellen mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR bestimmt.

### 3.3 Zytotoxizitätstest mit Neutralrot

Nach Borenfreund und Puerner (1985) kann die Neutralrot-Aufnahmekapazität von Zellen als ein Maß für die Zytotoxizität eines Agens genommen werden. Neutralrot (2-Amino-3-methyl-7-dimethylamino-phenazoniumchlorid) wird als Supravitalfarbstoff von intakten Zellen in den Lysosomen akkumuliert, wobei sich die schwach positiv geladenen Gruppen des Farbstoffs an die negativ geladenen Gruppen der lysosomalen Matrix anlagern. Werden Zellen durch toxische Substanzen oder Strahlung geschädigt, wird dieser Prozess beeinträchtigt. Tote Zellen nehmen überhaupt kein Neutralrot mehr auf.

Der Neutralrot-Test wurde als Viabilitätstest für die mit verschiedenen Wirksubstanzen inkubierten bzw. UVA-bestrahlten Fibroblasten verwendet: Die HDF-Zellen wurden im Anschluß an die jeweilige Behandlung mit PBS (mit Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen) gewaschen und für 2,5 h mit je 2 ml Neutralrot-Gebrauchslösung pro Gewebekulturschale im 37 °C-Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen des Neutralrots und Waschen der Zellen mit PBS (mit Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen) wurde das in den Lysosomen akkumulierte Neutralrot während eines 10-minütigen Schüttelns der Fibroblasten bei 70 UpM in essigsauerm Alkohol (2 ml/Schale) durch Fixierung und Aufschluss der Zellen wieder freigesetzt. Eine 96-well Mikrotiterplatte wurde mit je 150 µl/well Ansatz bestückt, und

die Neutralrot-Aufnahme wurde in sechsfach Ansätzen im Spektralphotometer bei 540 nm gemessen.

### 3.4 UV-Bestrahlung

#### 3.4.1 UVA-Bestrahlung von HDF-Zellkulturen

Die UVA-Bestrahlung der HDF-Zellen erfolgte mittels einer UVASPOT 400 Lichtquelle mit UVB- und UVC-Sperrfilter. Das Emissionsspektrum dieser UV-Quelle ist in der Abbildung 8.6 im Anhang zu finden. Vor jedem Experiment wurde die Leistung der betriebswarmen UVA-Röhren mit einem IL-1700 Radiometer, dessen UVA-Messkopf mit einer Transpore-Membran<sup>TM</sup> versehen wurde, bestimmt. Die spektrale Empfindlichkeit der UVA-Sonde lag bei 326-402 nm mit einem Sensitivitätsmaximum bei 368 nm. In der Regel wurde ein Strahlungsfluss von  $4,5 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$  in der Probenebene gemessen, wobei der Abstand zwischen der UV-Quelle und den zu bestrahlenden Zellen 50 cm betrug. Die Wärmeentwicklung der Lichtquelle wurde durch einen Ventilator in der Bestrahlungseinheit ausgeglichen.

Die jeweilige Bestrahlungszeit wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Bestrahlungszeit [sec]} = \text{Dosis} \left[ \frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right] \div \text{Leistung} \left[ \frac{\text{W}}{\text{cm}^2} \right] \quad (3.2)$$

$1,5 \times 10^5$  HDF-Zellen wurden pro 60 mm-Gewebekulturschale ausgesät und 2,5 Tage im 37 °C-Brutschrank kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Fibroblasten in PBS (mit oder ohne  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen) mit verschiedenen starken UVA-Dosen bestrahlt. Dabei waren die Zellkulturschalen nur mit einer Transpore-Membran<sup>TM</sup> zum Schutz vor Kontaminationen bedeckt, wodurch eine UVA-Absorption durch das Medium oder den Kulturschalendeckel ausgeschlossen wurde. Nach der Bestrahlung oder dem Belassen der entsprechenden Kontrollen in der dunklen Sterilbank wurde das PBS abgesaugt, und die Zellen wurden mit neuem HDF-Medium (mit oder ohne FCS) für 24 h oder die angegebenen Zeiträume im 37 °C-Brutschrank inku-

biert. Im Anschluss konnte die MMP-1, TIMP-1 und GAPDH mRNA- bzw. Proteinexpression der HDF-Zellen analysiert werden.

### 3.4.2 SSR-Bestrahlung *in vivo*

23 Probanden (siehe Tabelle 2.2, Spendernummer 1-17 und 34-39) wurden im Labor von Prof. Dr. Antony R. Young (Department of Environmental Dermatology, St. John's Institute of Dermatology, King's College London, St. Thomas' Hospital, London, UK) unter Verwendung eines Sonnensimulators (Oriol Solar Simulator, Modell 81292, Oriol Instruments, Stratford, USA) mit „solar simulated radiation“ (SSR, 290-400 nm) bestrahlt. Der 1 kW leistungsstarke Sonnensimulator enthielt einen WG320 Filter und entsprach damit der COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Industry) Norm. Die Dosis der Strahlung wurde mit einem Doppelmonochromator-Spektrometern (Bentham Instruments, Reading, United Kingdom) ermittelt und routinemäßig mit einem Breitband-Thermopile-Radiometer (Medical Physics, Dryburn Hospital, Durham, United Kingdom) kontrolliert. In Abbildung 8.7 ist das Emissionsspektrum des Oriol Solar Simulators dargestellt. Die Bestrahlungsstärke des SSR auf der Haut betrug ca.  $13 \text{ mW/cm}^2$ , wobei der Abstand zwischen der UV-Quelle und der zu bestrahlenden Haut bei 11 cm lag. Die Anteile der einzelnen UV-Bereiche an der SSR-Strahlung sind in Tabelle 3.1 detailliert aufgeführt. Für jeden Probanden wurde visuell und mit Hilfe eines Erythemeters (Dia-Stron, Andover, UK) die spezifische Minimale Erythemale Dosis (MED) auf  $1 \text{ cm}^2$  großen Arealen des oberen Abdominalbereiches 24 h nach der Bestrahlung bestimmt.

Tabelle 3.1: UV-Anteile des Oriol Solar Simulators

| UV-Bereich<br>[nm] | Bestrahlungsstärke<br>[mW/cm <sup>2</sup> ] | Bestrahlungsstärke<br>[%] | Erythemwirksamkeit<br>[%] |
|--------------------|---|---------------------------|---------------------------|
| UVA (321-400)      | 1,17E+01                                    | 91,5                      | 12,3                      |
| UVB (281-320)      | 1,08E+00                                    | 8,5                       | 87,6                      |
| UVC (200-280)      | 1,17E-04                                    | 0,0                       | 0,2                       |
| <b>Gesamt-UV</b>   | <b>1,28E+01</b>                             | <b>100,0</b>              | <b>100,0</b>              |

#### 3.4.2.1 Time Course Studie

In einer Studie zur Zeitabhängigkeit wurden sechs Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 1-6) mit 2 MED SSR im nicht UV-exponierten oberen Gesäßbereich auf definierten 1 cm<sup>2</sup> großen Arealen bestrahlt. Die Biopsien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 48 h nach der UV-Exposition genommen.

#### 3.4.2.2 Dose Response Studie

Um eine Dosisabhängigkeit zu ermitteln, wurde die Haut von sechs weiteren Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 7-12) mit SSR-Dosen zwischen 0,5 und 4 MED auf 1 cm<sup>2</sup> großen Bereichen des Gesäßes bestrahlt und 24 h später analysiert.

#### 3.4.2.3 Reproduzierbarkeits- bzw. Epidermis-Dermis Trennstudie

In einer dritten Studie, in der die Epidermis und Dermis getrennt voneinander untersucht und die Reproduzierbarkeit des Versuchssystems getestet werden sollte, wurden fünf Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 13-17) mit 2 MED auf 1 cm<sup>2</sup> großen Arealen des oberen Abdominalbereiches bestrahlt und die Biopsien nach 24 h entnommen. Dabei wurden die Ansätze jeweils in Replikaten durchgeführt. Neben zwei UV-exponierten und zwei bestrahlten Arealen, die im Anschluss in Dermis und Epidermis separiert wurden, wurden zwei definierte Bereiche als Kontrollen unbestrahlt belassen.

#### 3.4.2.4 Repetitive UV-Expositionsstudie

In einer letzten SSR-Versuchsreihe wurden pro Proband (Tabelle 2.2, Spendernummer 34-39) zwei 6 x 5 cm<sup>2</sup> große Areale des oberen Gesäßbereiches für zwei aufeinanderfolgende Wochen täglich von Montag bis Freitag mit 0,65 MED SSR bestrahlt. Die Dosis von 0,65 MED wurde nach Voruntersuchungen gewählt, die gezeigt hatten, dass diese tägliche SSR-Dosis vom Hauttyp I/II ohne Bildung eines übermäßigen kumulativen Erythems toleriert wurde. 24 h nach der fünften suberythemalen Bestrahlung, also nach der ersten Woche, wurde jeweils die erste Biopsie genommen. Die zweite folgte

nach der zweiten Woche, 24 h nach der zehnten UV-Exposition, und die dritte eine Woche nach der zehnten Bestrahlung. Eine vierte Hautstanze wurde 24 h später einem Areal entnommen, das direkt nach der zehnten Bestrahlung mit 0,65 MED einer Dosis von 2 MED SSR exponiert wurde. Als Kontrollen wurden Biopsien aus einem nicht UV-exponierten Bereich verwendet. Außerdem dienten als Kontrollen ein Areal, das mit einer einzelnen Dosis von 0,65 MED bestrahlt wurde, und ein 1 cm<sup>2</sup> großer Bereich des Gesäßes, der mit 2 MED SSR exponiert wurde.

### 3.4.3 UVA-Bestrahlung *in vivo*

Die UVA-Expositionen (340-400 nm) *in vivo* wurden im Labor von Prof. Dr. Antony R. Young (Department of Environmental Dermatology, St. John's Institute of Dermatology, King's College London, St. Thomas' Hospital, London, UK) mittels einer UVASUN 2000 Strahlungsquelle (Mutzhas, München) durchgeführt. Vor jedem Versuch wurde die UVA-Dosis mit Hilfe eines IL-442 Radiometers (International Light, Newburyport, MA, USA) bestimmt. Das Emissionsspektrum der UVASUN 2000 ist in Abbildung 8.8 zu finden. Mit einem Abstand von 21 cm zwischen der UVA-Strahlungsquelle und der Haut betrug die Bestrahlungsstärke des UVA auf der Haut ca. 80 mW/cm<sup>2</sup>, genauer in Tabelle 3.2 dargestellt. Die Minimale Erythemale Dosis (MED) wurde für jeden einzelnen Probanden vor der Durchführung der eigentlichen Studie visuell und mit Hilfe eines Erythemeters (Dia-Stron, Andover, UK) auf 1 cm<sup>2</sup> großen Arealen des oberen Abdominalbereiches 24 h nach der Bestrahlung bestimmt.

Um eine UVA-Dosisabhängigkeit zu ermitteln, wurde die Haut von sechs Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 18-23) mit UVA-Dosen zwischen 0,2 und 2 MED auf 1 cm<sup>2</sup> großen Bereichen des oberen Gesäßes bestrahlt und 24 h später analysiert. Als Positivkontrolle wurde ein Areal mit 2 MED SSR exponiert, als Negativkontrolle wurde ein definierter Bereich vor der Biopsieentnahme unbestrahlt belassen.

Tabelle 3.2: UV-Anteile der UVASUN 2000 Strahlungsquelle

| UV-Bereich<br>[nm] | Bestrahlungsstärke<br>[mW/cm <sup>2</sup> ] | Bestrahlungsstärke<br>[%] | Erythemwirksamkeit<br>[%] |
|--------------------|---|---------------------------|---------------------------|
| UVA (321-400)      | 8,04E+01                                    | 100,0                     | 94,9                      |
| UVB (281-320)      | 1,25E-02                                    | 0,0                       | 0,7                       |
| UVC (200-280)      | 1,35E-03                                    | 0,0                       | 4,4                       |
| <b>Gesamt-UV</b>   | <b>8,05E+01</b>                             | <b>100,0</b>              | <b>100,0</b>              |

#### 3.4.4 UVB-Bestrahlung *in vivo*

Die UVB-Bestrahlungen der Probanden fanden bei einer Wellenlänge von 300 nm (Oriel Monochromator, Modell 66021 & 77200, Oriel Instruments, Stratford, USA) im Labor von Prof. Dr. Antony R. Young (Department of Environmental Dermatology, St. John's Institute of Dermatology, King's College London, St. Thomas' Hospital, London, UK) statt. Die Dosis der UVB-Strahlung wurde mittels eines Breitband-Thermopile-Radiometers (Medical Physics, Dryburn Hospital, Durham, United Kingdom) festgelegt. In Abbildung 8.9 ist das Emissionsspektrum des Oriel Monochromators dargestellt. Die UVB-Bestrahlungsstärke wurde direkt auf der Haut des Probanden gemessen, sprich der Abstand zwischen UV-Quelle und Haut war gleich 0 cm, und betrug 0,011 mW/cm<sup>2</sup> (siehe Tabelle 3.3). Für jeden Probanden wurde visuell und mit Hilfe eines Erythemeters (Dia-Stron, Andover, UK) die spezifische Minimale Erythemale Dosis (MED) auf Bereichen des oberen Abdominalbereiches mit einem Durchmesser von 5 mm 24 h nach der Bestrahlung bestimmt.

Zehn Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 24-33) wurden mit verschiedenen UVB-Dosen zwischen 0,2 und 2 MED bestrahlt und die Biopsien nach 24 h entnommen. Die UVB-exponierten Areale des oberen Abdominalbereiches hatten wie bei der Bestimmung der individuellen MED einen Durchmesser von 5 mm, die der 2 MED SSR Positivkontrolle waren 1 cm<sup>2</sup> groß.

Tabelle 3.3: UV-Anteile des Oriol Monochromators

| UV-Bereich<br>[nm] | Bestrahlungsstärke<br>[mW/cm <sup>2</sup> ] | Bestrahlungsstärke<br>[%] | Erythemwirksamkeit<br>[%] |
|--------------------|---|---------------------------|---------------------------|
| UVA (321-400)      | 4,63E-05                                    | 0,4                       | 0,0                       |
| UVB (281-320)      | 1,07E-02                                    | 99,4                      | 99,7                      |
| UVC (200-280)      | 2,16E-05                                    | 0,2                       | 0,3                       |
| <b>Gesamt-UV</b>   | 1,08E-02                                    | 100,0                     | 100,0                     |

### 3.5 Probenentnahme von *in vivo* Hautmaterial

Die UV-exponierten Biopsien und unbestrahlten Kontrollen wurden im Labor von Prof. Dr. Antony R. Young (Department of Environmental Dermatology, St. John's Institute of Dermatology, King's College London, St. Thomas' Hospital, London, UK) unter Verwendung eines lokalen Anästhetikums aus der Haut des oberen Abdominalbereiches gestanzt. Nach der Entnahme wurden die 4 mm großen humanen Hautproben halbiert und entweder sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder zuvor mittels Überführen in 62 °C warmer Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung nach Dulbecco in Epidermis und Dermis aufgetrennt. Zur weiteren Bearbeitung wurde das *in vivo* Hautmaterial auf Trockeneis zu BDF geschickt.

### 3.6 RNA-Isolierung

#### 3.6.1 RNA-Isolierung aus HDF-Zellkulturen

Nach der Inkubation mit verschiedenen Wirksubstanzen bzw. der UVA-Bestrahlung von HDF-Zellkulturen und der anschließenden Nachinkubation mit Medium im 37 °C-Brutschrank wurde die Gesamt-RNA der Zellen mit RNAzol™ isoliert.

Zunächst wurden die Fibroblasten nach Absaugen des HDF-Mediums und Waschen mit PBS mit 1 ml RNAzol™ pro 60 mm-Gewebekulturschale lysiert und in Reaktionsgefäße auf Eis überführt. Eine Trennung der Gesamt-RNA von der DNA und den Proteinen erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen Chloroform, kurzem Vortexen,

Inkubation auf Eis für 15 min und einem 15-minütigen Zentrifugieren bei 14.000 rpm (4 °C). Die sich in der oberen wässrigen Phase befindliche RNA wurde durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol, 30 min bei -20 °C und einer anschließenden 30-minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O für 10 min bei 65 °C resuspendiert. Eine Lagerung der Gesamt-RNA erfolgte bei -20 °C.

### **3.6.2 RNA-Isolierung aus Stanzbiopsien**

Gesamt-RNA aus humanen Hautbiopsien wurde mittels RNeasy<sup>®</sup> Total RNA Kit bei Raumtemperatur isoliert.

Eine bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagerte Stanzbiopsie wurde zuerst in Lysis-Puffer RLT plus 1/100 Volumen β-Mercaptoethanol mittels Ultra Turrax<sup>®</sup>, Stufe 4, homogenisiert und die Zellen lysiert. Die Suspension wurde für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen 70 %igen Ethanol versetzt. Nach kurzem Vortexen wurde die Lösung auf eine RNeasy<sup>®</sup>-Säule gegeben und 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule einmal mit RW1-Puffer und zweimal mit RPE-Puffer gewaschen (je 1 min bei 10.000 rpm). Im Anschluss wurde das restliche Ethanol des RPE-Puffers von der Säulenmembran durch zweiminütiges Zentrifugieren mit 14.000 rpm bei Raumtemperatur entfernt. Durch Zugabe von zweimal 30 µl DEPC-H<sub>2</sub>O, je einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließendem Zentrifugieren (1 min, 10.000 rpm) wurde die Gesamt-RNA eluiert und bei -20 °C weggefroren.

### **3.7 RNA-Quantifizierung mittels GeneQuant<sup>®</sup>**

Die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurde im RNA/DNA Calculator (GeneQuant<sup>®</sup>) bestimmt, wobei dafür die RNA der HDF-Zellen 1:5 und die der Stanzbiopsien 1:3 in DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt wurde. Jeweils 8 µl der RNA-Lösung wurden in einer 5 mm Quarzglasküvette im UV-Spektralphotometer gemessen, welches das

Absorptionsmaximum der Nukleinsäurebasen bei einer Wellenlänge von 260 nm erfasst. Die Umrechnung der vom Gerät ermittelten Absorptionseinheiten in eine Konzentration erfolgte unter Verwendung der folgenden Formel:

$$c(RNA)[ng/\mu l] = AU_{260} \times 40 \times 2 \times F \quad (3.3)$$

$AU_{260}$  = Absorption bei 260 nm

40 = Faktor für RNA

2 = Faktor für Küvettenschichtdicke

$F$  = Verdünnungsfaktor der zu untersuchenden Probe

### 3.8 Gelelektrophorese

Für die Überprüfung der RNA-Konzentration bzw. -Integrität wurden 1,2 oder 1,5 %ige Agarosegele in 1 x TBE verwendet. Pro well wurden 100-500 ng RNA mit 1/5-Volumen 10 x DNA-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mit 1 x TBE als Laufpuffer für 1 h bei 90 V. Nach einem anschließenden 20-minütigen Schütteln des Gels in 1 x TBE mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid konnten die 28S und 18S rRNA-Banden aufgrund der Fluoreszenz der Ethidiumbromid-RNA-Komplexe im UV-Licht des Transilluminators identifiziert werden. Die Ergebnisse wurden mittels eines Photos festgehalten.

RNA, die geblottet und mit Hilfe DIG-markierter Sonden detektiert werden sollte, wurde in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel (1,2 %ige MP-Agarose in 1 x MOPS und 2 % Formaldehyd) mit 1 x MOPS als Laufpuffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Pro well wurden 1-2 µg RNA mit 7 µl Auftragspuffer für 10 min bei 65 °C inkubiert. Direkt im Anschluss wurden die Proben auf Eis gestellt und vor dem Auftrag auf das Gel mit 3 µl Ethidiumbromid (0,7 mg/ml) versetzt. Der Lauf wurde für 3,5 h bei 90 V durchgeführt. Ein Protokollieren der Ergebnisse erfolgte durch das Photographieren des Gels auf dem UV-Transilluminator.

### 3.9 Northern-Analyse

Um *in vitro* mit einer bereits im Labor etablierten Methode die MMP-1 mRNA Expression von mit verschiedenen Wirksubstanzen inkubierten bzw. UVA-bestrahlten HDF-Zellen zu untersuchen, wurde eine Northern-Blot Analyse (Bergemann et al. 1998) durchgeführt.

Isolierte Fibroblasten Gesamt-RNA wurde mittels eines denaturierenden Agarosegels aufgetrennt und durch Northern-Blotting auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Nach der Zugabe der DIG-markierten MMP-1- bzw. GAPDH-RNA-Sonden konnten diese mit der komplementären RNA der verschiedenen Ansätze hybridisieren. Die DIG-Markierung wurde durch hinzugefügte Anti-DIG-Antikörper erkannt, die mit Alkalischer Phosphatase konjugiert sind. Das CPD-*Star*<sup>TM</sup> wurde als Chemilumineszenz-Substrat für die Alkalische Phosphatase eingesetzt. Durch die Lichtemission des dephosphorylierten CPD-*Stars*<sup>TM</sup>, die mit dem Lumi-Imager<sup>TM</sup> nachgewiesen wurde, konnte auf die MMP-1 Induktion unter Einbeziehung der Expression des House-keeping-Gens GAPDH geschlossen werden.

#### 3.9.1 Northern-Blotting

Nach der Dokumentation der gelelektrophoretischen Auftrennung der Total-RNA wurde das denaturierende Agarosegel zunächst zweimal für 30 min in 10 x SSC für das anschließende Northern-Blotting äquilibriert. Der Transfer der RNA aus dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran fand mit 10 x SSC als Transfermedium über Nacht statt (Kapillar-Blot). Das Gel wurde luftblasenfrei auf ein Filterpapier gebracht, das mit zwei gegenüberliegenden Seiten in 10 x SSC eingetaucht wurde. Ebenfalls luftblasenfrei wurde auf das Gel eine exakt gleich große Nylonmembran und auf diese wiederum vier entsprechend große Filterpapiere gelegt. Zum Abschluss wurde ein mehrere Zentimeter hoher Stapel saugfähiges Papier auf dem Blot positioniert und mit einem 500 g Gewicht beschwert. Nach Beendigung des RNA-Transfers über Nacht und dem Abbau des Blots wurde die RNA mittels UV-Stratalinker mit 120 mJ an die Nylonmembran gecrosslinkt. Um die Effizienz des RNA-Transfers zu überprüfen und festzuhalten, wurde die Membran mit den fluoreszierenden RNA-Ethidiumbromid-Komplexen auf

dem Transilluminator photographiert. Die MMP-1- bzw. GAPDH-RNA konnte nun durch eine Hybridisierung mit den entsprechenden DIG-markierten RNA-Sonden auf der positiv geladenen Nylonmembran detektiert werden.

### 3.9.2 Hybridisierung

Zunächst wurde die Membran mit der gecrosslinkten RNA für wenigstens 2 h bei 68 °C mit 20 ml DIG Easy Hyb pro 100 cm<sup>2</sup> Nylonmembran prähybridisiert. Dann erfolgte die Hybridisierung der zu untersuchenden RNA mit den entsprechenden RNA-Sonden bei 68 °C über Nacht. Vor dem Einsetzen der Sonden mussten diese 10 min bei 95 °C denaturiert und danach sofort auf Eis gebracht werden. Pro Hybridisierungsansatz wurden 1 µg DIG-markierte MMP-1-Sonde und 50-250 ng DIG-markierte GAPDH-Sonde in 10 ml DIG Easy Hyb verwendet.

### 3.9.3 Chemilumineszenz-Detektion

Nach Abschluss der Hybridisierung über Nacht wurde die Membran zweimal für 15 min mit 2 x SSC und 1 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurde unter stringenteren Bedingungen die restliche überschüssige Sonde durch zweimaliges 15-minütiges Waschen entfernt (0,5 x SSC + 0,1 % SDS, 68 °C). Für die Detektion der Hybride aus DIG-markierter RNA-Sonde und komplementärer RNA wurde ein Anti-DIG-Antikörper, an dessen Fab-Fragmente Alkalische Phosphatase konjugiert ist, eingesetzt: Die Nylonmembran wurde 5 min in DIG-Waschpuffer (DIG Puffer 1 + 0,3 % Tween<sup>®</sup> 20) bei Raumtemperatur - wie alle weiteren Schritte auch - äquilibriert. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran 45 min lang in Blocking-Reagenz geschüttelt, das 10 %ig (w/v) in DIG Puffer 1 durch Erhitzen gelöst worden war. Im Anschluss erfolgte die halbstündige Inkubation mit dem Anti-DIG-Antikörper, der zuvor 1:10.000 (75 mU/ml) in Blocking-Reagenz verdünnt werden musste. Nun wurde zweimal für je 15 min überschüssiger Antikörper mit DIG-Waschpuffer entfernt. Nach zweimaliger Inkubation in DIG Puffer 3 für je 5 min wurde CPD-Star<sup>™</sup>, ein sehr sensitives Chemilumineszenz-Substrat für die Alkaline Phosphatase, 1:100 in DIG Puffer 3 verdünnt und auf die Nylonmembran getropft. CPD-Star<sup>™</sup> wird

durch die Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Dies führt zur Bildung eines metastabilen Dioxetan Phenolat-Anions, welches zerfällt und dabei Licht bei 466 nm emittiert. Schon innerhalb weniger Minuten wird das Maximum des Chemilumineszenz-Signals erreicht. Nach Zugabe des CPD-*Stars*<sup>TM</sup> fand eine fünfminütige Inkubation im Dunklen statt. Die Membran wurde eingeschweißt, und die Detektion und Analyse der Chemilumineszenz-Signale unter Verwendung der Boehringer Light Units (BLU) erfolgte im Lumi-Imager<sup>TM</sup> mit einer Expositionszeit von 15 min.

## 3.10 TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR

### 3.10.1 Prinzip der Real-Time TaqMan<sup>®</sup>-PCR

Die TaqMan<sup>®</sup>-PCR stellt ein sehr sensitives und schnelles System zur Detektion und Analyse von Nukleinsäuren dar. Grundlage ist die Mitte der Achtziger Jahre entwickelte Polymerase Kettenreaktion (PCR), eine durch spezifische Primer definierte enzymatische *in vitro* Replikation mit der nahezu exponentiellen Amplifikation einer DNA-Zielsequenz (Saiki et al. 1985). Bei der herkömmlichen PCR erfolgt eine semi-quantitative Auswertung der entstandenen Amplifikationsprodukte in der Regel nach der Beendigung der Reaktionszyklen, z. B. durch zeitintensive Verfahren wie das Southern Blotting oder Restriktionsanalysen. Mit einer hohen PCR-Zyklenzahl kann sich dabei jedoch bereits, u. a. durch einen Verbrauch von Cofaktoren und eine verringerte Aktivität der DNA-Polymerase, eine Sättigung der Reaktion eingestellt haben. Bei der TaqMan<sup>®</sup>-PCR hingegen sind Amplifikation und Nachweis der PCR-Produkte simultan in einem Reaktionsgefäß möglich. Somit kann nicht nur eine Endpunktquantifizierung wie bei der ursprünglichen PCR erfolgen, sondern auch eine „real time“-Quantifizierung während der exponentiellen Amplifikationsphase der eingesetzten Nukleinsäure (Heid et al. 1996).

Zur Detektion der sequenzspezifischen Amplifikation wird in der TaqMan<sup>®</sup>-PCR neben einem Forward und einem Reverse Primer eine fluorogene Sonde eingesetzt, die im Zuge der PCR-Extensionsphase zwischen den beiden Primern an die komplementäre Targetsequenz bindet (Lee et al. 1993). Die Sonde ist am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (FAM oder VIC) markiert, während das 3'-Ende den

Quencher-Farbstoff TAMRA trägt (Tabelle 3.4). Das Reporter-Signal wird umso besser unterdrückt, je dichter der Quencher am Reporter lokalisiert ist. Da in der Regel jedoch das stärkste Fluoreszenzsignal bei maximalem Abstand von Reporter und Quencher detektiert wird, wird die Sonde an ihren beiden Enden markiert (Livak et al. 1995). Zusätzlich ist das 3'-Ende der Sonde mit einem Phosphatrest blockiert, der während der PCR die Extension der Sonde verhindert. Somit kann diese nicht als DNA-Polymerisationsstart dienen. Wird die intakte Sonde bei einer Wellenlänge von 488 nm mittels des Argonlasers im ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System (7700 SDS) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer nach Förster unterdrückt (Förster 1948, Lakowicz 1983). In diesem Falle wird nur das Fluoreszenzspektrum des Quenchers emittiert (Oehlmann 1997).

Tabelle 3.4: Fluoreszenzfarbstoffe der TaqMan<sup>®</sup>-PCR Reaktionen

| Farbstoff | Typ              | Anregung [nm] | Emission [nm] |
|-----------|------------------|---------------|---------------|
| FAM       | Reporter         | 488           | 518           |
| VIC       | Reporter         | 488           | 554           |
| TAMRA     | Quencher         | 488           | 582           |
| ROX       | Passive Referenz | 488           | 602           |

Zur Analyse von RNA kann eine spezielle TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR durchgeführt werden (Abbildung 3.1), in der die *rTth* DNA-Polymerase eingesetzt wird. Dieses Enzym dient sowohl als Reverse Transkriptase als auch als thermostabile DNA-Polymerase. In einem ersten Schritt findet zunächst eine reverse Transkription der zu untersuchenden RNA statt (Abbildung 3.1, ① und ②). Nachfolgend hybridisieren TaqMan<sup>®</sup>-Sonde und -Primer mit der Target-Sequenz der synthetisierten cDNA (Abbildung 3.1, ③). In der anschließenden Extensionsphase trifft die DNA-Polymerase auf die fluorogene Sonde und beginnt sie zu verdrängen (Abbildung 3.1, ④). Es entsteht eine Y-förmige Sekundärstruktur, wodurch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase aktiviert wird (Holland et al. 1991). Diese Aktivierung bewirkt die Hydrolyse der Sonde (Abbildung 3.1, ⑤). Freie, nicht-hybridisierte Sonde wird hingegen nicht geschnitten, da die *rTth* DNA-Polymerase Doppelstrang-spezifisch ist (Heid et al. 1996).

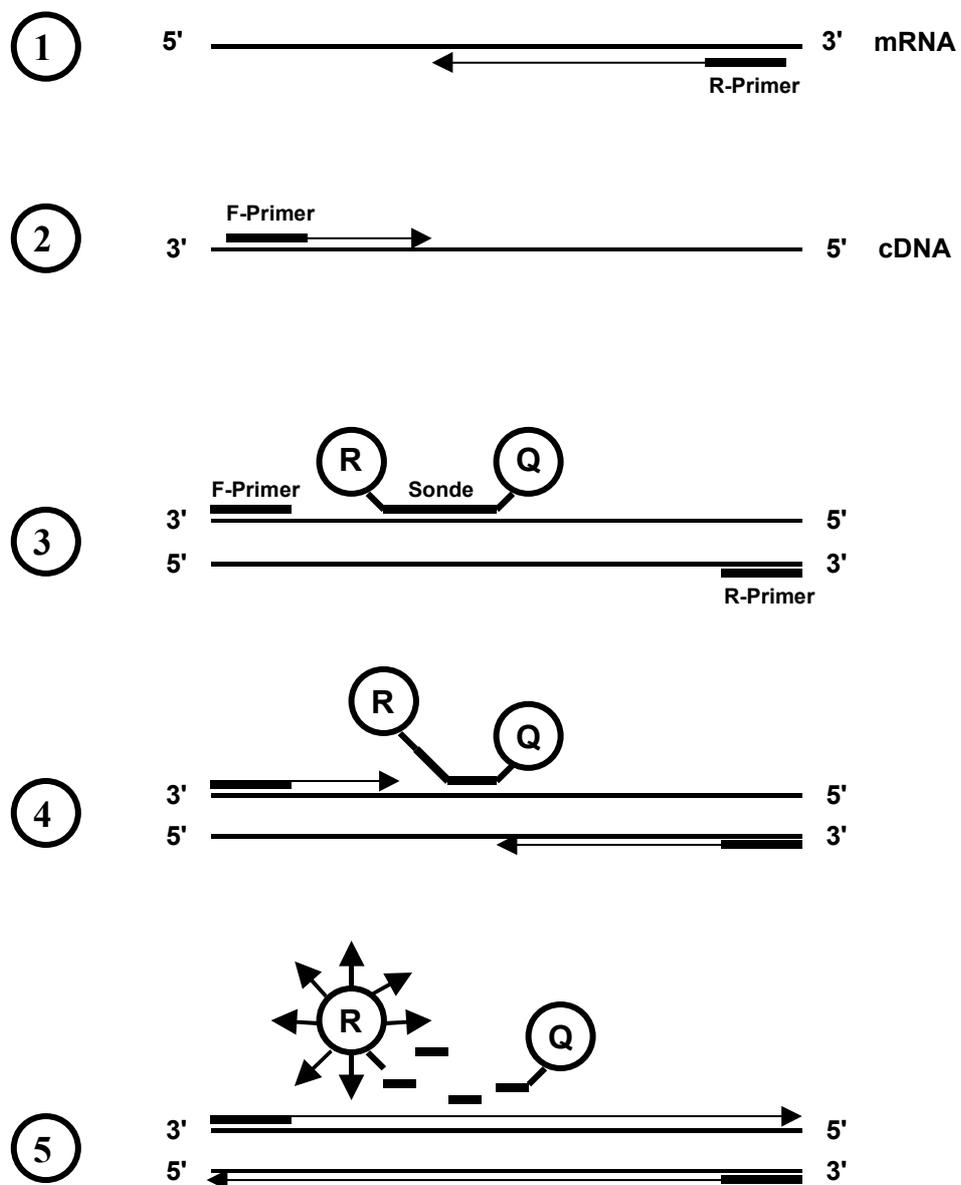


Abbildung 3.1: **Schematische Darstellung einer TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktion**

① und ②: Reverse Transkription mit cDNA-Synthese

③: Hybridisieren von TaqMan<sup>®</sup>-Sonde und -Primern

④: Aktivierung der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der rTth-Polymerase

⑤: Durch Hydrolyse der Sonde Emission eines Fluoreszenzsignals

Durch die hydrolytische Spaltung der Sonde werden nun Reporter- und Quencher-Farbstoff räumlich voneinander getrennt, und das entstehende Fluoreszenzsignal des Reporters wird mit Hilfe des 7700 SDS erfasst. Währenddessen wird die Polymerisation bis zum Ende des Templatestranges fortgeführt. Proportional zur Akkumulation des PCR-Produktes steigt das sequenzspezifische Fluoreszenzsignal des Reporter-Farbstoffs mit jedem PCR-Zyklus an (Bustin 2000). Unspezifische Amplifikation wird nicht detektiert.

### 3.10.2 Design der Primer- und Sondensysteme

Das Designen der TaqMan<sup>®</sup> Primer- und Sondensysteme erfolgte mit Hilfe der Primer Express<sup>®</sup> Version 1.0 Software von PE Applied Biosystems (Weiterstadt), nachdem die Sequenzen der verschiedenen Zielgene aus dem Internet (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) gezogen worden waren. Da die TaqMan<sup>®</sup>-PCR für die Untersuchung von mRNA genutzt werden sollte, mussten verschiedene Kriterien für die Entwicklung möglichst spezifischer Amplifikationssysteme berücksichtigt werden (Oehlmann 1997, Schild 1999):

Um die Detektion genomischer DNA als mögliche Kontaminationsquelle in der eingesetzten Gesamt-RNA auszuschließen, wurde sich die Exon/Intron-Struktur von Genen zu Nutze gemacht. Die TaqMan<sup>®</sup>-Sonden wurden so ausgewählt, dass sie mindestens eine Exon/Intron-Grenze überspannten, Forward und Reverse Primer also in verschiedenen Exons lagen. Das 5'-Ende der Sonde wurde möglichst nahe am 3'-Ende des Primers plaziert, der mit demselben Template-Strang wie die Sonde hybridisierte. Dabei durften sich die Sequenzen nicht überlappen, und ein Abstand von höchstens 50-60 bp, entsprechend der Prozessivität der DNA-Polymerase, wurde nicht überschritten. Zusätzlich wurde bei der Wahl der Sonde darauf geachtet, dass der Strang gewählt wurde, der mehr Cs als Gs innerhalb der Sondensequenz enthielt. Am 5'-Ende der Sonde musste ein G vermieden werden, da dieses selbst nach der Sondenhydrolyse noch in der Lage sein kann, den daran gebundenen Reporter-Farbstoff in gewissem Umfang zu quenchen. Um eine ausreichende Spezifität der Hybridisierung zu erzielen, betrug die Länge der Sonden 20-30 Nukleotide und der GC-Gehalt lag zwischen 30-80 %.

Mehr als drei Nukleotide eines Typs wurden vermieden, insbesondere Poly-Gs. Die höhere Stabilität der Primer-Template Bindung durch die Elongation im Zuge der PCR wurde durch die Wahl einer Sonde kompensiert, deren Schmelztemperatur ( $T_m$ -Wert) um 5-10 °C über dem der Primer lag, in der Regel 68-70 °C. Dieser  $T_m$ -Wert wurde dabei vom Primer Express<sup>®</sup> Programm nach der Nearest-Neighbour-Methode berechnet (Rychlik et al. 1990). Die Manganacetat-Konzentration wurde bei der TaqMan<sup>®</sup>-PCR relativ hoch gewählt (2,5-5 mM), um die Sondenflexibilität zu erhöhen, das 5'- dem 3'-Ende der Sonde anzunähern und damit ein effizientes Quenching zu gewährleisten.

Für die Auswahl der TaqMan<sup>®</sup>-Primer galten die allgemein gültigen Regeln: Es wurden Oligonukleotide mit einer Länge von 18-30 bp und einem GC-Gehalt von 30-80 % eingesetzt, die möglichst keine Poly-T-Bereiche und keine palindromischen Sequenzabschnitte aufwiesen. Um Primerdimer-Bildungen auszuschließen, wurden Sequenzen mit einer 3'-Komplementarität vermieden. Ebenso wurden Komplementaritäten zu der entsprechenden Sonde gemieden, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Bei der Lokalisation der Primer wurde darauf geachtet, dass Amplikons mit Längen unter 100 bp erzeugt wurden. Damit lagen PCR-Systeme vor, deren Effizienz sich dem Wert 1 annähert. Eine Effizienz von 1 bedeutet, dass sich die Zahl der vorhandenen Template-Kopien bei jedem PCR-Zyklus genau verdoppelt. Es wurden ausschließlich Oligonukleotide in die PCR eingesetzt, deren  $T_m$ -Wert zwischen 58-60 °C lag. Außerdem wurde bei dem Designen der TaqMan<sup>®</sup>-Primer die 3'-Regel bzw. inverse GC-Clamp Regel beachtet. Diese besagt, dass die Summe aus Gs und Cs in den letzten fünf am 3'-Ende gelegenen Nukleotiden den Wert 2 nicht übersteigen darf, um durch die Wahl von relativ instabilen 3'-Enden der Primer die Spezifität der TaqMan<sup>®</sup>-Reaktion zu erhöhen.

Nach Abschluss der Entwicklung der TaqMan<sup>®</sup>-Systeme wurde mit Hilfe der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Suchmaschine im Internet überprüft, ob es möglicherweise Pseudogene oder sehr ähnliche Sequenzen gibt, die eine quantitative Aussage der Experimente hätten in Frage stellen können.

### 3.10.3 TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Assay

Die Analyse der mRNA-Expression von MMP-1, TIMP-1, Elastin, Elastase und GAPDH (*in vitro* und *in vivo* bzw. nur *in vivo*) erfolgte mit Hilfe des TaqMan<sup>®</sup> EZ RT-PCR Kits im ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System. In jedem Experiment wurden Negativkontrollen (NTC) ohne RNA-Zusatz mitgeführt, um Verunreinigungen auszuschließen.

Nach dem Designen eines TaqMan<sup>®</sup> Primer-Sondensystems wurde zunächst eine Manganacetat- und im Anschluss eine Primer-Optimierung durchgeführt. In einem darauffolgenden Validierungsexperiment wurde überprüft, ob die Amplifikationseffizienzen der Targetsequenzen und des Housekeeping-Gens GAPDH gleich waren bzw. im zulässigen Toleranzbereich lagen.

Alle TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktionen wurden als 25 µl oder 50 µl-Triplikate im 96-Mikrotiterformat angesetzt. Eine Amplifikationsreaktion enthielt:

|           |                               |
|-----------|-------------------------------|
| 1 x       | TaqMan <sup>®</sup> EZ Puffer |
| 300 µM    | dATP, dCTP und dGTP           |
| 600 µM    | dUTP                          |
| 2-5 mM    | Manganacetat                  |
| 0,1 U/µl  | <i>rTth</i> DNA-Polymerase    |
| 0,01 U/µl | AmpErase <sup>®</sup> UNG     |
| 10-50 ng  | Gesamt-RNA                    |
| 50-900 nM | Forward Primer                |
| 50-900 nM | Reverse Primer                |
| 100 nM    | TaqMan <sup>®</sup> -Sonde    |

Das TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Programm setzte sich wie in Abbildung 3.2 dargestellt zusammen: Vor der reversen Transkription und der eigentlichen PCR wurde die AmpErase<sup>®</sup> Uracil N-Glykosylase (UNG) 2 min bei 50°C aktiviert (Abbildung 3.2, ①). Die UNG eliminiert Carry-Over Kontaminationen durch die Hydrolyse der Uracil-glykosidischen Bindungen von doppelsträngigen PCR-Produkten aus vorangegangenen Amplifikationen, in die anstelle von dTTPs dUTPs eingebaut worden sind (Longo et al. 1990). Bei

RNA und dTTP-enhaltener DNA kann die UNG nicht aktiv werden. Im Anschluss fand in einem zweiten Schritt die reverse Transkription bei 60°C für 30 min statt (Abbildung 3.2, ②). Nach der cDNA-Synthese wurde die AmpErase<sup>®</sup> UNG 5 min bei 95 °C deaktiviert (Abbildung 3.2, ③). Dabei mussten während der anschließenden TaqMan<sup>®</sup>-PCR die Reaktionstemperaturen höher als 55 °C sein, um eine Degradation der neu synthetisierten Amplifikate durch die AmpErase<sup>®</sup> UNG zu verhindern. Die abschließende 40 Zyklen Zweischritt-PCR, bestehend aus Denaturierung mit 20 sec bei 94°C und Annealing sowie Extension bei 59°C für 1 min, diente zur Amplifikation der erzeugten cDNA (Abbildung 3.2, ④).

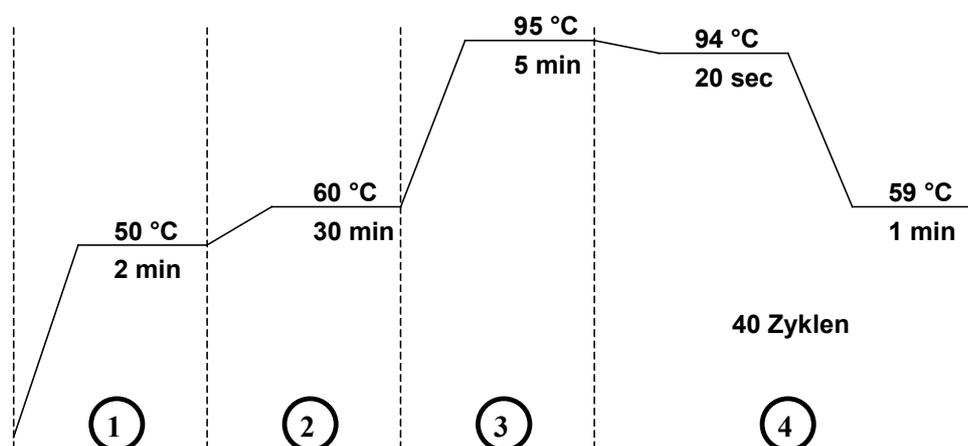


Abbildung 3.2: *Temperaturprofil einer TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktion*

- ①: Aktivierung der AmpErase<sup>®</sup> UNG
- ②: Reverse Transkription
- ③: Inaktivierung der AmpErase<sup>®</sup> UNG
- ④: Amplifikation des Targets

### 3.10.4 TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Analyse

Die Analyse der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktionen erfolgte mit Hilfe des mit der SDS Software Version 1.6 ausgestatteten ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection Systems. Während jedes PCR-Zyklus wird in jedem PCR-Reaktionsgefäß kontinuierlich die Veränderung der Fluoreszenzemission der Reporter-Farbstoffe FAM oder VIC „real time“ gemessen. Störende Fluktuationen der Fluoreszenz, z. B. durch Pipettierfehler bedingte

Voluminaschwankungen, werden mit Hilfe eines im TaqMan<sup>®</sup> EZ Puffer enthaltenen Farbstoffes, der Passiven Referenz ROX (siehe Tabelle 3.4), ausgeglichen. Die Normierung auf die Passive Referenz ROX, die nicht in den 5'-3'-Exonuklease-Assay involviert ist, geht wie folgt in die Berechnungen ein:

$$R_n = \frac{\text{Emissionsintensität des Reporters (FAM / VIC)}}{\text{Emissionsintensität der passiven Referenz (ROX)}} \quad (3.4)$$

$R_n$  = normalisierter Reporter-Farbstoff

In Abbildung 3.3 ist der typische Verlauf einer positiven TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktion dargestellt.

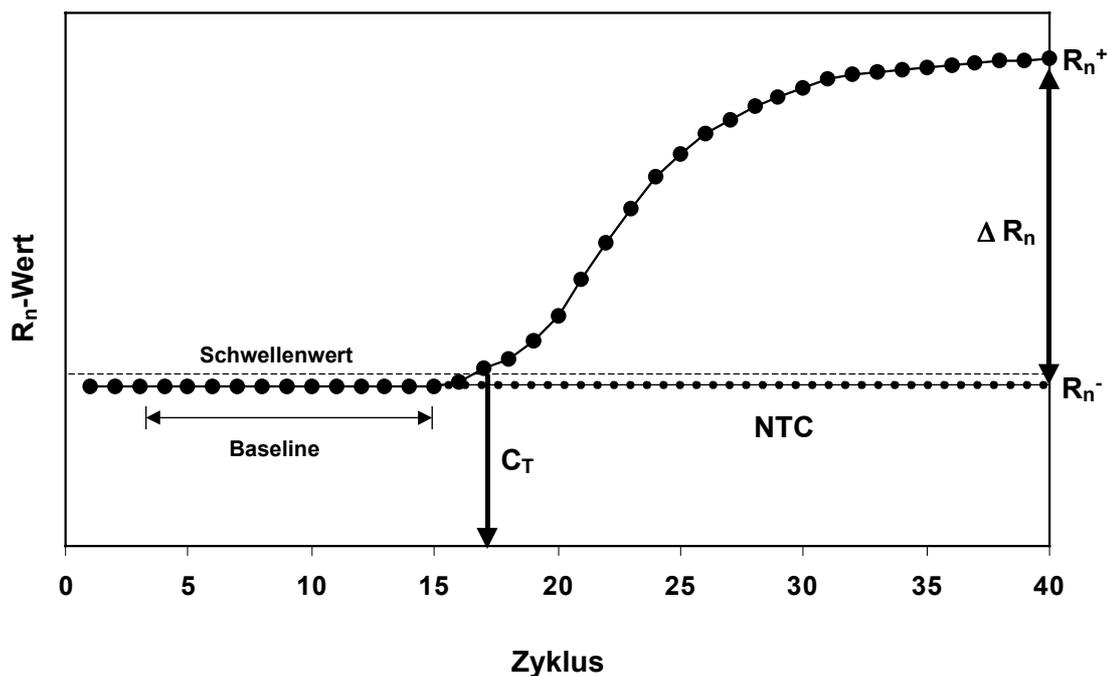


Abbildung 3.3: *Amplifikationsplot einer TaqMan<sup>®</sup>-Reaktion*

$R_n$ : normierte Fluoreszenzintensität

$R_n^+$ : normierte Fluoreszenzintensität eines Ansatzes mit RNA

$R_n^-$ : normierte Fluoreszenzintensität eines Ansatzes ohne RNA

$C_T$ : „threshold cycle“

NTC: „no template control“

Der Bereich, bevor die SDS Software eine Amplifikation von PCR-Produkt detektiert, wird Baseline genannt. Standardmäßig handelt es sich dabei um PCR-Zyklus 3-15. Eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals wird erst als signifikant eingestuft und damit als Schwellenwert bezeichnet, wenn die Emissionsstärke die Standardabweichung der Baseline, des Hintergrund  $\Delta R_n$ -Wertes, um ein 10-faches übersteigt (TaqMan<sup>®</sup> Cytokine Gene Expression Plate I Protocol 1997). Dabei ergibt sich der  $\Delta R_n$ -Wert aus folgender Gleichung:

$$\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-) \quad (3.5)$$

$R_n^+$  = normierte Fluoreszenzintensität eines Ansatzes mit RNA

$R_n^-$  = normierte Fluoreszenzintensität eines Ansatzes ohne RNA  
oder erste Zyklen einer TaqMan<sup>®</sup>-PCR

Der PCR-Zyklus, bei dem zuerst ein signifikanter Anstieg des  $\Delta R_n$ -Wertes assoziiert mit einem exponentiellen Wachstum von PCR-Produkt zu verzeichnen ist, wird als „threshold cycle“ ( $C_T$ ) bezeichnet. Dieser  $C_T$ -Wert stellt die Basis zur Quantifizierung der eingesetzten Ziel-RNA dar.

Eine relative mRNA-Quantifikation von MMP-1, TIMP-1, Elastin und Elastase wurde mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode durchgeführt (3.8). Voraussetzung dafür war, dass zuvor mittels eines Validierungsexperimentes demonstriert werden konnte, dass die PCR-Effizienzen der Targets und der endogenen Kontrolle GAPDH gleich waren. Um die Induktion der Ziel-RNA nach Bestrahlung zu bestimmen, wurde unter Verwendung des  $C_T$ -Wertes zuerst auf das Housekeeping-Gen GAPDH normiert und damit auf die eingesetzte Gesamt-RNA-Menge geschlossen (3.6). Dann wurde auf eine Referenz, eine unbestrahlte Kontrolle (Kalibrator), abgeglichen (3.7). Dieses lässt sich wie folgt mathematisch darstellen (ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2 1997):

$$\Delta C_T = \overline{C_T}(\text{Zielsequenz}) - \overline{C_T}(\text{GAPDH}) \quad (3.6)$$

$\overline{C_T}$  =  $C_T$ -Mittelwert

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{Probe})} - \Delta C_{T(\text{Kalibrator})} \quad (3.7)$$

$$\text{Relative Quantifizierung} = 2^{-\Delta\Delta C_T} \quad (3.8)$$

Die Formel (3.8) für die relative Quantifizierung ist von der Gleichung, die den exponentiellen Amplifikationsprozess der ursprünglichen PCR beschreibt (3.9), abgeleitet (siehe ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2 1997 für die genaue Herleitung der Formel):

$$X_n = X_0 \times (1 + E_x)^n \quad (3.9)$$

$X_n$  = Anzahl der Target-Moleküle beim Zyklus  $n$

$X_0$  = initiale Anzahl der Target-Moleküle

$E_x$  = Effizienz der Target-Amplifikation

$n$  = Anzahl der Reaktionszyklen

Bei einer PCR-Effizienz von 1 (100 %), spricht einer exponentiellen Vermehrung der Target-cDNA in einer TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktion, nimmt der  $C_T$ -Wert bei einer 1:1-Verdünnung der Probe um den Wert 1 zu, bei einer 1:10-Verdünnung um den Wert 3,32. Wird nach 40 PCR-Zyklen ein  $C_T$ -Wert von 40 gemessen, bedeutet dies, dass kein Reporter-Fluoreszenzsignal und somit keine Target-RNA detektiert werden kann. Laut Schild (1999) können bei der Anwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode aus Gründen der Reproduzierbarkeit nur  $C_T$ -Werte  $\leq 36$  berücksichtigt werden. Nach der Auswertung der eigenen erhobenen TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten wurden jedoch auch  $C_T$ -Werte zwischen 36 und 40 mit in die Analysen einbezogen, da diese durchweg niedrige Standardabweichungen aufwiesen.

### 3.11 Proteindetektion mittels ELISA

Zum Nachweis und zur Quantifizierung der extrazellulären Proteine MMP-1, TIMP-1 und dem Komplex von MMP-1 mit seinem spezifischen Inhibitor TIMP-1 in Zellkulturüberständen von UVA-bestrahlten HDF-Zellen wurden die entsprechenden ELISA-Systeme der Firma Oncogene verwendet. Vor dem Einsetzen der *in vitro* Proben wurden diese jeweils 5 min bei 3000 rpm (4 °C) zentrifugiert, um störende Zellpartikel zu eliminieren, und so verdünnt, dass sie im Bereich der Standardkurven lagen (i. d. R. 10-200-fach). Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Zellen einer jeden 60 mm-Gewebekulturschale nach der Abnahme des Zellkulturüberstandes gezählt und die mittels der ELISA ermittelten Proteine des Überstandes darauf abgeglichen.

#### 3.11.1 MMP-1 ELISA

Der MMP-1 ELISA detektiert sowohl MMP-1 Proenzym, als auch aktives MMP-1 Protein und MMP-1/TIMP-1 Komplexe (MMP-1 ELISA Protokoll 1999). Andere MMPs werden nicht durch die im ELISA verwendeten monoklonalen Antikörper erkannt. Die Empfindlichkeit des Assays liegt bei 0,023 ng/ml Protein. In Abbildung 3.4 ist das „Sandwich“-Prinzip des ELISA-Systems dargestellt.

Im MMP-1 ELISA Kit sind die 96-well Mikrotiterplatten mit einem ersten monoklonalen Antikörper gegen humanes MMP-1 Protein beschichtet. In Duplikaten wurden jeweils 100 µl der zu untersuchenden Zellüberstände neben einer Standardreihe (3,6-0,11 ng/ml) in die wells pipettiert. Vorhandenes MMP-1 wurde an den spezifischen Antikörper gebunden, ungebundenes Material wurde durch fünffaches Waschen mit Waschpuffer entfernt. Nach der Inkubation mit einem zweiten monoklonalen anti-MMP-1 Antikörper (100 µl/well), der mit Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert ist, wurde erneut fünfmal gewaschen und daraufhin je 100 µl/well Peroxidase-Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben. Die HRP katalysiert die Umsetzung der farblosen in eine blaue TMB-Lösung. Die Substratkonversion wurde durch die Zugabe einer 2,5 N Schwefelsäure (100 µl/well) abgestoppt, und die Farbe schlug von Blau nach Gelb um. Dabei war die Farbintensität proportional zum MMP-1 Proteingehalt in der eingesetzten Probe. Das farbige Reaktionsprodukt wurde direkt im Spektral-

photometer Spectra Max 250 bei 450 nm durchgemessen und quantifiziert. Die gleichzeitige Messung bei 595 nm wurde vom 450 nm-Wert subtrahiert, um optische Fehler der Mikrotiterplatte auszugleichen. Unter Einbeziehung der mitgeführten MMP-1 Standards bekannter Konzentrationen von humanem MMP-1 Protein wurde eine Standardkurve erstellt. Mit Hilfe derer konnte die unbekannte MMP-1 Proteinmenge der Proben durch Vergleich der Absorption berechnet werden.

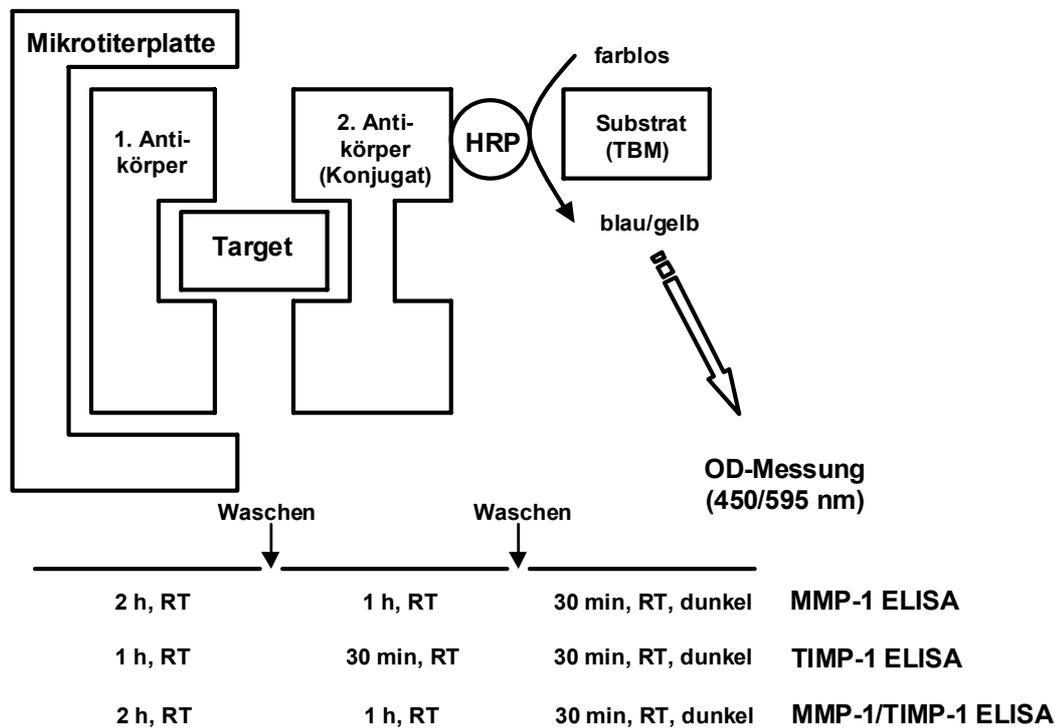


Abbildung 3.4: Prinzip eines MMP-1, TIMP-1 oder MMP-1/TIMP-1 ELISA-Systems

### 3.11.2 TIMP-1 ELISA

Der TIMP-1 ELISA ermittelt ausschließlich TIMP-1 Protein. TIMP-2 wird von den monoklonalen Antikörpern des Systems nicht erkannt (TIMP-1 ELISA Protokoll 1999). Die Empfindlichkeit des Assays liegt bei 0,0096 ng/ml Protein. Dem MMP-1 ELISA entsprechend bedient sich das System zweier monoklonaler TIMP-1 Antikörper, wovon der erste auf den Mikrotiterplatten immobilisiert vorliegt, während der zweite, mit HRP-

konjugierte Antikörper zur Detektion der Antikörper-TIMP-Komplexe eingesetzt wird. Der Ablauf des TIMP-1 ELISA lief gemäß den Angaben des MMP-1 ELISA-Systems ab. Abweichend davon waren nur die Inkubationszeiten (siehe Abbildung 3.4) und vierfache Waschschrte anstelle von fünffachen. Für die Standardreihe wurden Ansätze von 1,6-0,05 ng/ml humanem TIMP-1 Proteins verwendet.

### 3.11.3 MMP-1/TIMP-1 Komplex ELISA

Mit Hilfe des MMP-1/TIMP-1 Komplex ELISA wird MMP-1 im Komplex mit seinem spezifischen Inhibitor TIMP-1 bis zu 0,020 ng/ml Protein gemessen. Allein werden weder MMP-1 noch TIMP-1, aber auch keine weiteren MMPs oder TIMPs detektiert (MMP-1/TIMP-1 Complex ELISA Protokoll 2000). Wie der MMP-1 und auch der TIMP-1 ELISA ist dieses System nach dem „Sandwich“-Prinzip aufgebaut (siehe Abbildung 3.4). In einem ersten Schritt bindet sowohl alles freie MMP-1, als auch das MMP-1 im MMP-1/TIMP-1 Komplex an den monoklonalen, für humanes MMP-1 Protein spezifischen Antikörper, mit dem die 96-well Mikrotiterplatten des Kits beschichtet sind. Da jedoch der zweite monoklonale, mit HRP-konjugierte Antikörper anti-TIMP-1 spezifisch ist, sind an der abschließenden Farbreaktion des Systems ausschließlich MMP-1/TIMP-1 Komplexe beteiligt. Das genaue Protokoll lief nach den Angaben zum MMP-1 ELISA ab. Unterschiede bestanden nur hinsichtlich der Anzahl der Waschschrte, die vierfach anstelle von fünffach durchgeführt wurden. Wie beim MMP-1 ELISA wurde für die Konstruktion einer Standardreihe MMP-1/TIMP-1 Komplex in der Konzentration von 3,6-0,11 ng/ml Protein eingesetzt.

## 3.12 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels *Student t*-Tests (Gosset 1908) oder mit Hilfe des auf dem sogenannten Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben basierenden Rangtests von Mann und Whitney (1947). Die Standardabweichungen wurden als SD- bzw. SEM-Werte angegeben.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR-Systeme

Für die Analyse der mRNA Expression von MMP-1, TIMP-1, Elastin, Elastase und dem Housekeeping-Gen GAPDH mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR wurden die entsprechenden Primer- und Sondensysteme mittels Primer Express<sup>®</sup> ausgewählt (siehe Tabelle 2.4 und Kapitel 8.1 für die genaue Lokalisation der Oligonukleotide). Im Anschluss mussten die entsprechenden TaqMan<sup>®</sup> Systeme zunächst optimiert werden.

#### 4.1.1 Manganacetat-Optimierung

Für jedes System wurde als Erstes eine Manganacetat-Optimierung mit einer konstanten Primerkonzentration von 200 nM durchgeführt, wobei das Manganacetat in 0,5 mM Schritten zwischen 2-5 mM eingesetzt wurde.

Die Optimierungsreaktionen der GAPDH, MMP-1, TIMP-1 und Elastin TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Systeme wurden pro Reaktion mit 10 ng Gesamt-RNA aus unbestrahlten HDF-Zellen (Spender 1, Passage 17, siehe Tabelle 2.1) angesetzt. Bei 4 mM Manganacetat zeigten alle vier Systeme entsprechend einer hohen Reaktionseffizienz einen niedrigen C<sub>T</sub>-Wert mit einer geringen Standardabweichung (siehe Abbildung 4.1): GAPDH mit einem C<sub>T</sub>-Wert von  $19,7 \pm 0,04$  (SD), MMP-1 mit einem C<sub>T</sub>-Wert von  $23,3 \pm 0,03$  (SD), TIMP-1 mit einem C<sub>T</sub>-Wert von  $19,4 \pm 0,02$  (SD) und Elastin mit einem C<sub>T</sub>-Wert von  $22,0 \pm 0,06$  (SD).

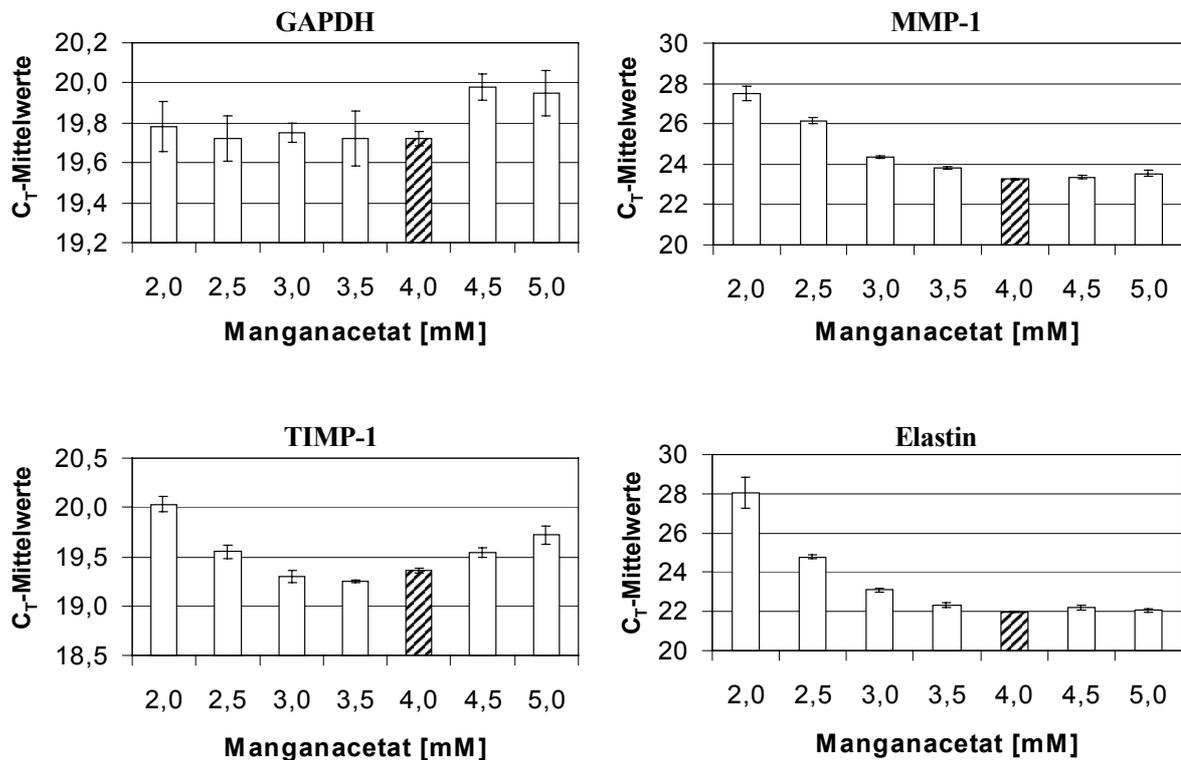


Abbildung 4.1: **Manganacetat-Optimierung für das GAPDH, MMP-1, TIMP-1 und Elastin TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR System**

Bei einer Manganacetat-Konzentration von 4 mM (▨) konnte durchgehend eine große Reaktionseffizienz detektiert werden. Die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktionen wurden als 50  $\mu$ l (GAPDH, MMP-1) oder 25  $\mu$ l (TIMP-1, Elastin) Reaktionen in Triplikaten pipetiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt.

Das Elastase TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR System detektierte in einer 25  $\mu$ l Reaktion mit 10 ng HDF-RNA nur wenig Elastase mit C<sub>T</sub>-Werten zwischen 32,9-35,3 (siehe Abbildung 4.2 A.). Daher wurde zusätzlich der Einsatz von 50 ng *in vivo* RNA (Proband 4 (Tabelle 2.2), 2 MED, 24 h), 50 ng NHEK- (33 mJ, 24 h) und 50 ng PBMC-RNA (unstimuliert) getestet (siehe Abbildung 4.2 B.). Die NHEK- und PBMC-RNA wurde freundlicherweise von Dr. Nikolas Brink (ehemals Kst. 4212, Beiersdorf AG, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die NHEK-Zellen exprimierten mit einem C<sub>T</sub>-Wert von  $39,9 \pm 0,2$  (SD) nahezu keine Elastase und fielen somit ebenso für weitere Optimierungsschritte aus. Doch sowohl bei der *in vivo* RNA (C<sub>T</sub> =  $29,0 \pm 0,1$  (SD)) als auch bei der Verwendung

der PBMC-RNA ( $C_T = 24,6 \pm 0,1$  (SD)) konnten kleinere  $C_T$ -Werte entsprechend einer höheren Elastase-Expression gemessen werden. Auf Grund der limitierten RNA-Menge *in vivo* und einer besseren Verfügbarkeit der PBMC-RNA wurden 50 ng der letzteren für eine Manganacetat-Optimierung zwischen 2-5 mM eingesetzt (siehe Abbildung 4.2 C.). Wie bei den anderen TaqMan® RT-PCR Systemen zeigte 4 mM Manganacetat bei den PBMCs eine gute Reaktionseffizienz ( $C_T = 24,7 \pm 0,1$  (SD)). Daher wurde bei den fünf TaqMan® RT-PCR Systemen für alle weiteren Optimierungsschritte und Reaktionen eine Manganacetat-Konzentration von 4 mM verwendet.

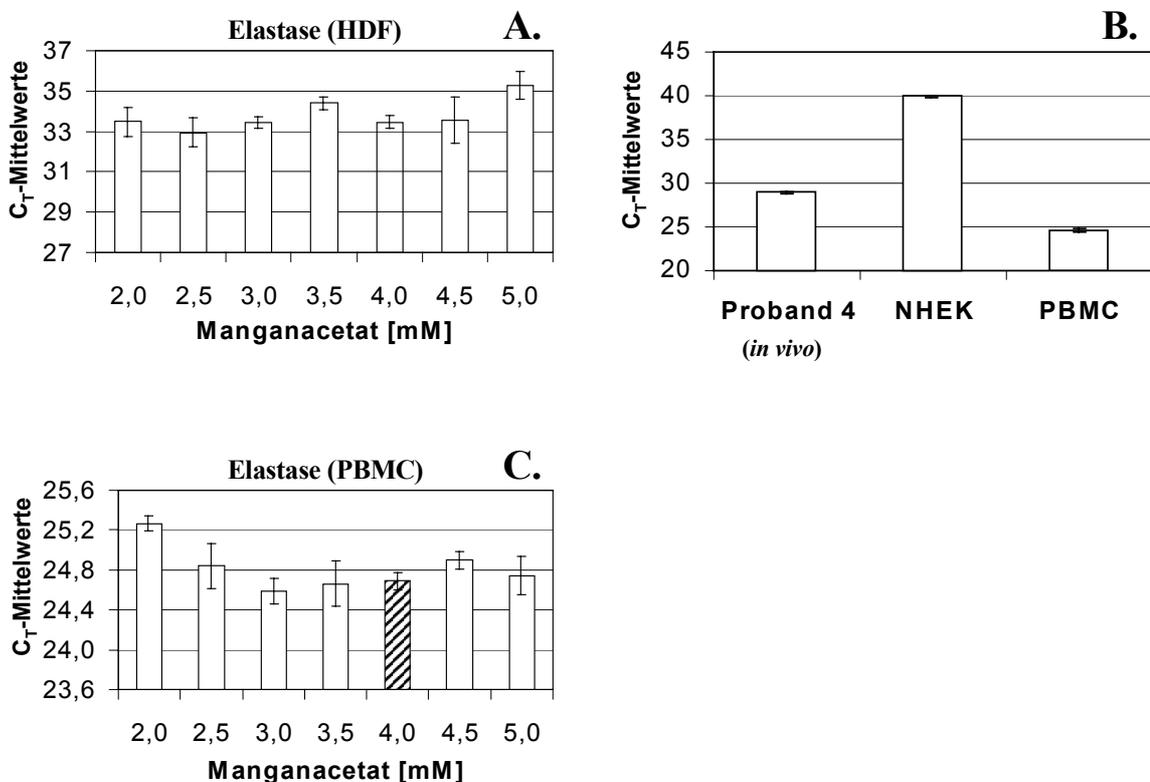


Abbildung 4.2: **Manganacetat-Optimierung für das Elastase TaqMan® RT-PCR System**

(A., B.) HDF- und NHEK-RNA eignete sich nicht für die Optimierung des Elastase TaqMan® RT-PCR Systems, da die entsprechenden Zellen wenig bzw. ± gar keine Elastase exprimierten. Bei der *in vivo* und PBMC-RNA konnten hingegen kleinere  $C_T$ -Werte gemessen werden. (C.) Mit 4 mM Manganacetat (▨) wurde bei den PBMCs wie bei den anderen TaqMan® RT-PCR Systemen eine gute Reaktionseffizienz detektiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD mit  $n = 3$  dargestellt.

#### 4.1.2 Primer-Optimierung

Als nächstes wurden die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktionen bezüglich ihrer Primerkonzentrationen optimiert. Zu diesem Zweck wurden Kombinationen der Primer mit Konzentrationen von 50  $\mu$ M, 300  $\mu$ M und 900  $\mu$ M ausgetestet.

Die Optimierung der GAPDH, MMP-1, TIMP-1 und Elastin TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktionen wurde bei einer optimalen Manganacetat-Konzentration von 4 mM mit 10 ng Gesamt-RNA aus unbestrahlten HDF-Zellen (Spender 1, Passage 17, siehe Tabelle 2.1) pro Ansatz durchgeführt, die der Elastase mit 50 ng PBMC-RNA (siehe Kapitel 4.1.1). Das Austesten der verschiedenen Primerkombinationen resultierte in deutlich voneinander abweichenden  $C_T$ -Werten (siehe Abbildung 4.3). Für jedes Target-spezifische TaqMan<sup>®</sup> Primer- und Sondensystem wurde jeweils eine Kombination mit einem niedrigen  $C_T$ -Wert und einer geringen Standardabweichung entsprechend einer hohen Reaktionseffizienz ausgewählt und in allen folgenden Reaktionen verwendet: GAPDH bei einer Kombination von 300 nM Forward Primer und 900 nM Reverse Primer mit einem  $C_T$ -Wert von  $19,7 \pm 0,04$  (SD), MMP-1 bei einer Kombination von 300 nM Forward Primer und 900 nM Reverse Primer mit einem  $C_T$ -Wert von  $24,7 \pm 0,03$  (SD), TIMP-1 bei einer Kombination von 50 nM Forward Primer und 900 nM Reverse Primer mit einem  $C_T$ -Wert von  $18,1 \pm 0,05$  (SD), Elastin bei einer Kombination von 300 nM Forward Primer und 900 nM Reverse Primer mit einem  $C_T$ -Wert von  $22,5 \pm 0,06$  (SD) und Elastase bei einer Kombination von 50 nM Forward Primer und 900 nM Reverse Primer mit einem  $C_T$ -Wert von  $23,9 \pm 0,3$  (SD).

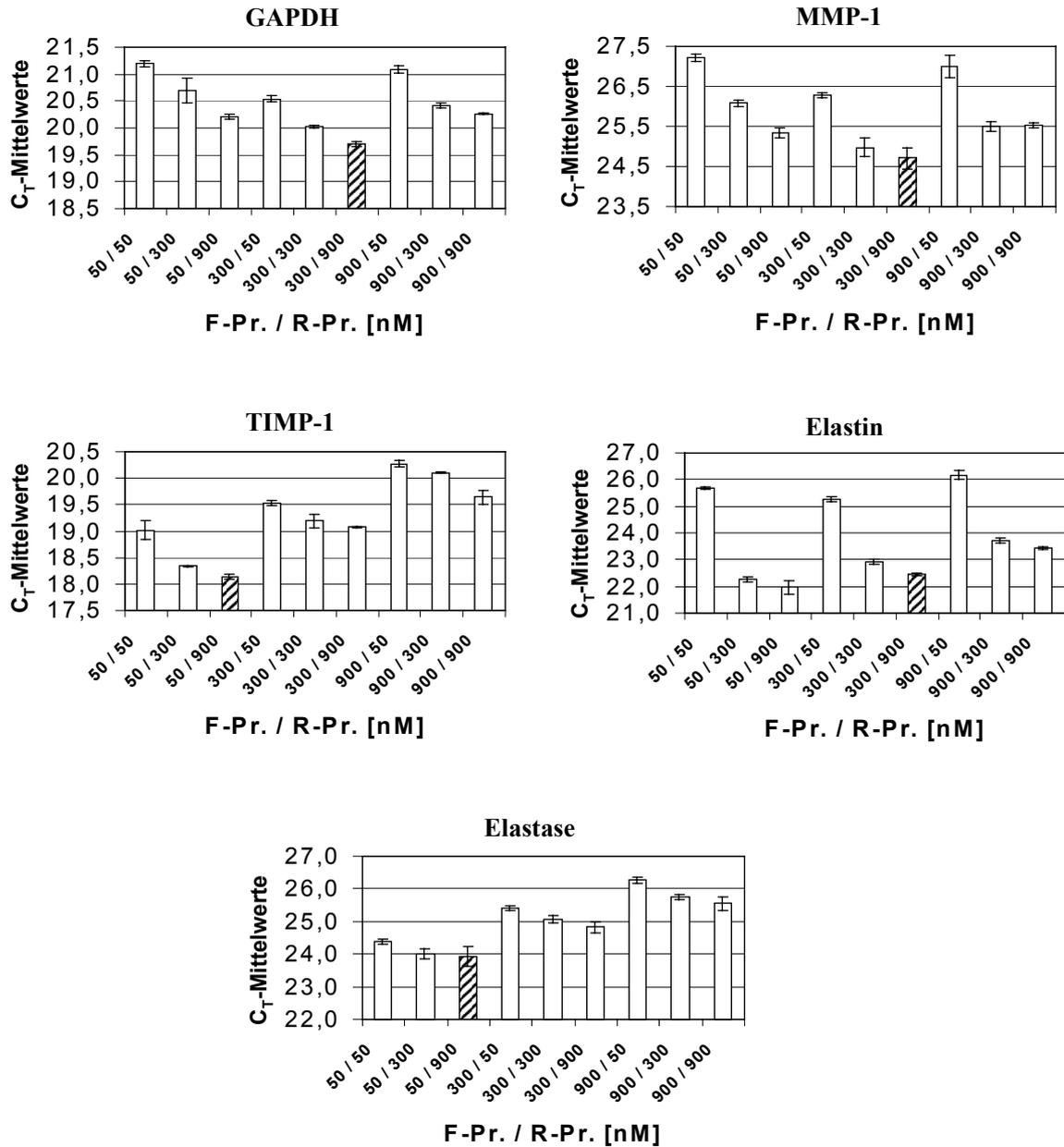


Abbildung 4.3: **Primer-Optimierung für das GAPDH, MMP-1, TIMP-1, Elastin und Elastase TaqMan® RT-PCR System**

Die Konzentration der jeweiligen System-spezifischen Primer hatte starken Einfluss auf die Reaktionseffizienz. Mit ▨ wurde für jedes Target die Primerkombination markiert, die für alle folgenden Reaktionen verwendet wurde. Die TaqMan® RT-PCR Reaktionen wurden als 50 µl (GAPDH, MMP-1) oder 25 µl (TIMP-1, Elastin, Elastase) Reaktionen in Triplikaten pipettiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± SD dargestellt.

### 4.1.3 Effizienzvergleich

Als Voraussetzung für die Anwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode für die relative Quantifizierung von mRNA Expression wurde ein abschließendes Validierungsexperiment durchgeführt. Durch dieses wurde überprüft, ob die Amplifikationseffizienzen der Targetsequenzen MMP-1, TIMP-1, Elastin und Elastase und die der internen Referenz, dem Housekeeping-Gen GAPDH, ungefähr gleich waren. Eine sensitive Methode für die Untersuchung, ob zwei Amplifikate die gleiche TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Effizienz haben, stellt die Bildung des  $\Delta C_T$ -Wertes (siehe Formel (3.6)) unter serieller Verdünnung der eingesetzten Gesamt-RNA dar (ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2 1997). Ist die Effizienz von zwei Amplifikatsreaktionen annähernd identisch, so hat die Steigung der Geraden nach dem Auftragen des Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge gegen den  $\Delta C_T$ -Wert einen Wert von nahezu Null. Um die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode anwenden zu können, sollte diese Geradensteigung einen Wert von 0,2 nicht übersteigen (persönliche Kommunikation Hr. K. Hamann, Applied Biosystems, Weiterstadt). Aus der Abbildung 4.4 wird deutlich, dass alle vier Targetsequenzen MMP-1, TIMP-1, Elastin und Elastase im Vergleich mit der internen Referenz GAPDH diese Voraussetzung erfüllen.

Der Effizienzvergleich von MMP-1, TIMP-1 und Elastin mit GAPDH erfolgte unter dem Einsatz von 1-0,05 ng Total RNA aus unbestrahlten HDF-Zellen (Spender 1, Passage 17, siehe Tabelle 2.1). Für MMP-1 wurde nach der graphischen Darstellung der  $\Delta C_T$ -Werte in Abhängigkeit der eingesetzten RNA-Menge eine Geradensteigung von -0,18 ermittelt, für TIMP-1 eine Steigung von -0,15 und für Elastin eine von -0,14. Der Vergleich der Amplifikationseffizienzen von Elastase und GAPDH wurde in einem Konzentrationsbereich von 50-2,5 ng PBMC-RNA durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.1). Das Auftragen des Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge gegen den  $\Delta C_T$ -Wert resultierte in einer Geradensteigung von -0,05. Daher konnte bei allen weiteren TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktionen die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode für die relative Quantifizierung der Targetsequenzen angewendet werden. Eine alternative Auswertung der Reaktionen anhand mitgeführter Standardkurven, für die das limitierte *in vivo* Material in nicht ausreichender Menge zur Verfügung stand, konnte damit umgangen werden.

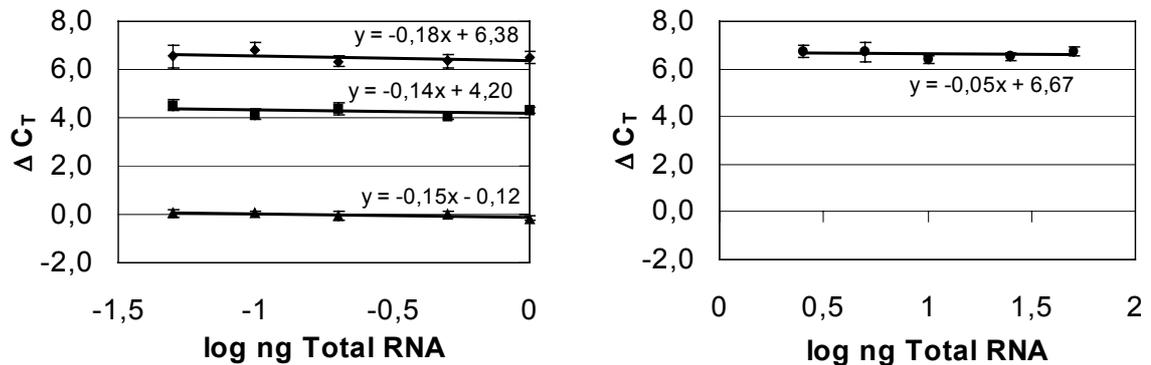


Abbildung 4.4: **Effizienzvergleich von MMP-1, TIMP-1, Elastin und Elastase mit dem GAPDH TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR System**

Das Plotten des Logarithmus der eingesetzten RNA-Menge gegen den  $\Delta C_T$ -Wert von MMP-1 (◆), Elastin (■) und TIMP-1 (▲) (linke Abbildung) sowie Elastase (●) (rechte Abbildung) resultiert in einer Geradensteigung von  $<0,2$ . Daher sind die RT-PCR Effizienzen von MMP-1, TIMP-1, Elastin und Elastase im Vergleich zu GAPDH als nahezu gleich anzusehen.

## 4.2 Relative Quantifizierung von MMP-1 und TIMP-1 mRNA *in vivo*

Zur relativen Quantifizierung der MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression nach UV-Exposition *in vivo* wurde aufgrund der limitierten Menge an Untersuchungsmaterial (Stanzbiopsien des oberen Gesäßbereiches mit einem Durchmesser von nur 4 mm) die sensitive TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode verwendet. Pro TaqMan<sup>®</sup>-Reaktion wurden je 50 ng der aus den Biopsien isolierten RNA eingesetzt und jeweils die optimierten, System-spezifischen Reaktionsbedingungen verwendet. Alle Reaktionen wurden in Triplikaten angesetzt und mit Hilfe des TaqMan<sup>®</sup> EZ RT-PCR Kits im ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System durchgeführt.

### 4.2.1 Erhöhte MMP-1 mRNA Expression bei Rauchern

Bei der Untersuchung des Einflusses von UV auf die Induktion der MMP-1 mRNA Expression in unbestrahlter humaner Haut *in vivo* mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR konnte in

einigen Probanden nur sehr wenig oder überhaupt keine MMP-1 mRNA in der nicht UV-exponierten Kontrollhaut gemessen werden ( $C_T$ -Wert  $\geq 36$ ). Im Gegensatz dazu wiesen andere Probanden in den Kontrollen bereits eine deutlich erhöhte MMP-1 mRNA Expression auf. Nach der Befragung der 39 Probanden (siehe Tabelle 2.2) bezüglich ihres Raucherstatus wurden neben der MMP-1 mRNA Expression auch die von TIMP-1 und GAPDH in den unbestrahlten Biopsien von Rauchern und Nichtrauchern einander gegenübergestellt. Dabei wurde nicht wie bei der relativen Quantifizierung mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode auf das Housekeeping-Gen GAPDH abgeglichen, sondern der „rohe“  $C_T$ -Wert des jeweiligen Targets nach der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR verwendet. Die konstanten GAPDH  $C_T$ -Werte wiesen jedoch auf einen gleichen RNA-Einsatz hin, womit die Normalisierung auf das Housekeeping-Gen vernachlässigbar erschien.

In Abbildung 4.5 sind die MMP-1  $C_T$ -Werte von den Rauchern und den Nichtrauchern nach ihrer Häufigkeitsverteilung dargestellt. Dabei wird deutlich, dass insbesondere die Nichtraucher MMP-1  $C_T$ -Werte nicht normalverteilt sind. Bei 15 von 25 Nichtrauchern (60,0 %) wurde ein  $C_T$ -Wert von 40 gemessen, d. h. dass keine MMP-1 mRNA detektiert werden konnte. Im Vergleich dazu wiesen nur drei von 14 Rauchern (21,4 %) einen  $C_T$ -Wert von 40 in den unbestrahlten Kontrollbiopsien auf. Bei der Ermittlung des Medians ergab sich für die Nichtraucher ein MMP-1  $C_T$ -Wert von 40 im Gegensatz zu einem von 33,1 für die Raucher. Mit Hilfe des auf dem sogenannten Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben basierenden Rangtests von Mann und Whitney (1947) wurden die Daten einander gegenübergestellt. Für die MMP-1 mRNA Expression in den unbestrahlten Proben ergab sich eine signifikante Assoziation mit dem Rauchen ( $p = 0,007$ ), während sich dieses wie erwartet für das Housekeeping-Gen GAPDH nicht nachweisen ließ ( $p = 0,101$ ). Der Median lag dabei für das ebenfalls nicht normalverteilte GAPDH bei einem  $C_T$ -Wert von 17,9 für die Nichtraucher und bei 17,6 für die Raucher. Die  $C_T$ -Mittelwerte des im Gegensatz dazu normalverteilten TIMP-1 wurden bei den Nichtrauchern mit  $21,2 \pm 0,58$  (SD) und bei den Rauchern mit  $21,1 \pm 0,71$  (SD) bestimmt. Der Zweistichproben *Student t*-Tests (Gosset 1908) zeigte für TIMP-1 wie der Wilcoxon-Test für GAPDH keine signifikanten Unterschiede zwischen den Nichtrauchern und den Rauchern auf ( $p = 0,675$ ).

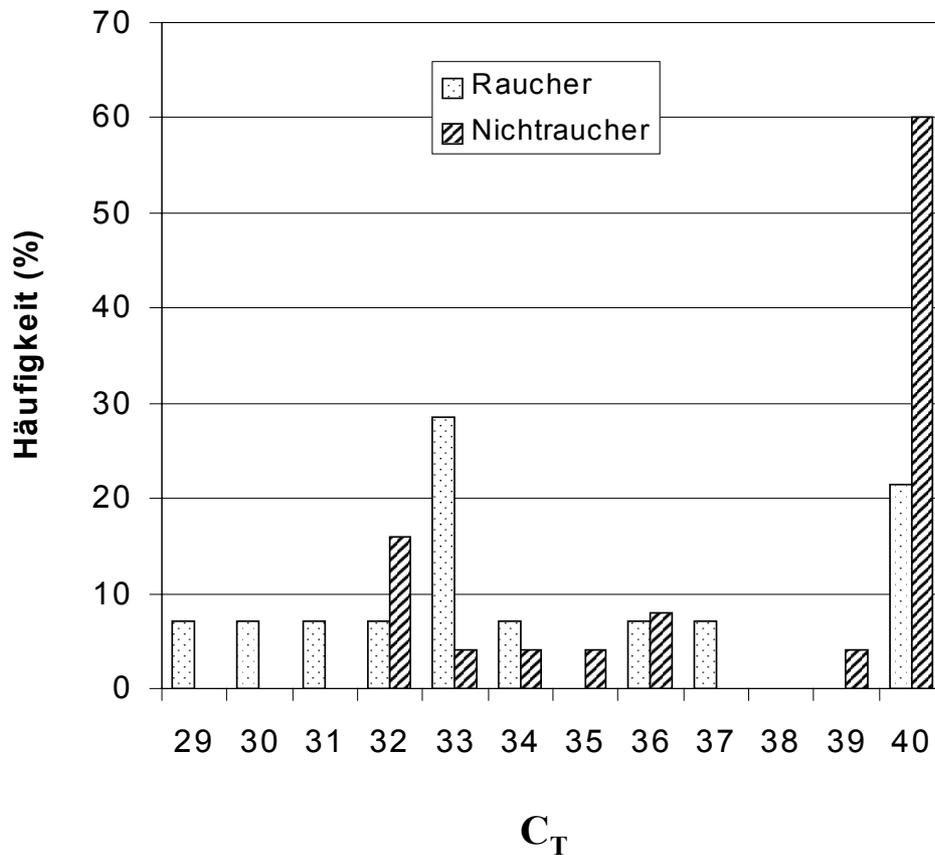


Abbildung 4.5: **MMP-1 C<sub>T</sub>-Werte in unbestrahlter Haut von Rauchern und Nichtrauchern**

Für die MMP-1 mRNA Expression in den nicht UV-exponierten Arealen des Gesäßes konnte eine signifikante Assoziation mit dem Rauchen ( $p = 0,007$ ) detektiert werden. Ein C<sub>T</sub>-Wert von 40 bedeutet, dass keine mRNA detektiert werden konnte.

#### 4.2.2 SSR Time Course Studie

Um die Effekte von UV-Strahlung auf die individuelle mRNA Expression von MMP-1 und TIMP-1 *in vivo* zu untersuchen, wurden Probanden im nicht UV-exponierten oberen Gesäßbereich mit SSR (290-400 nm) bestrahlt. Dieser emittierte Wellenlängenbereich hat einen direkten Bezug zu der auf die Erdoberfläche treffenden solaren UV-Strahlung. Als erstes wurde eine Studie zur Zeitabhängigkeit durchgeführt. Sechs Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 1-6) wurden mit 2 MED SSR bestrahlt und die

Biopsien zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 48 h nach der UV-Exposition entnommen.

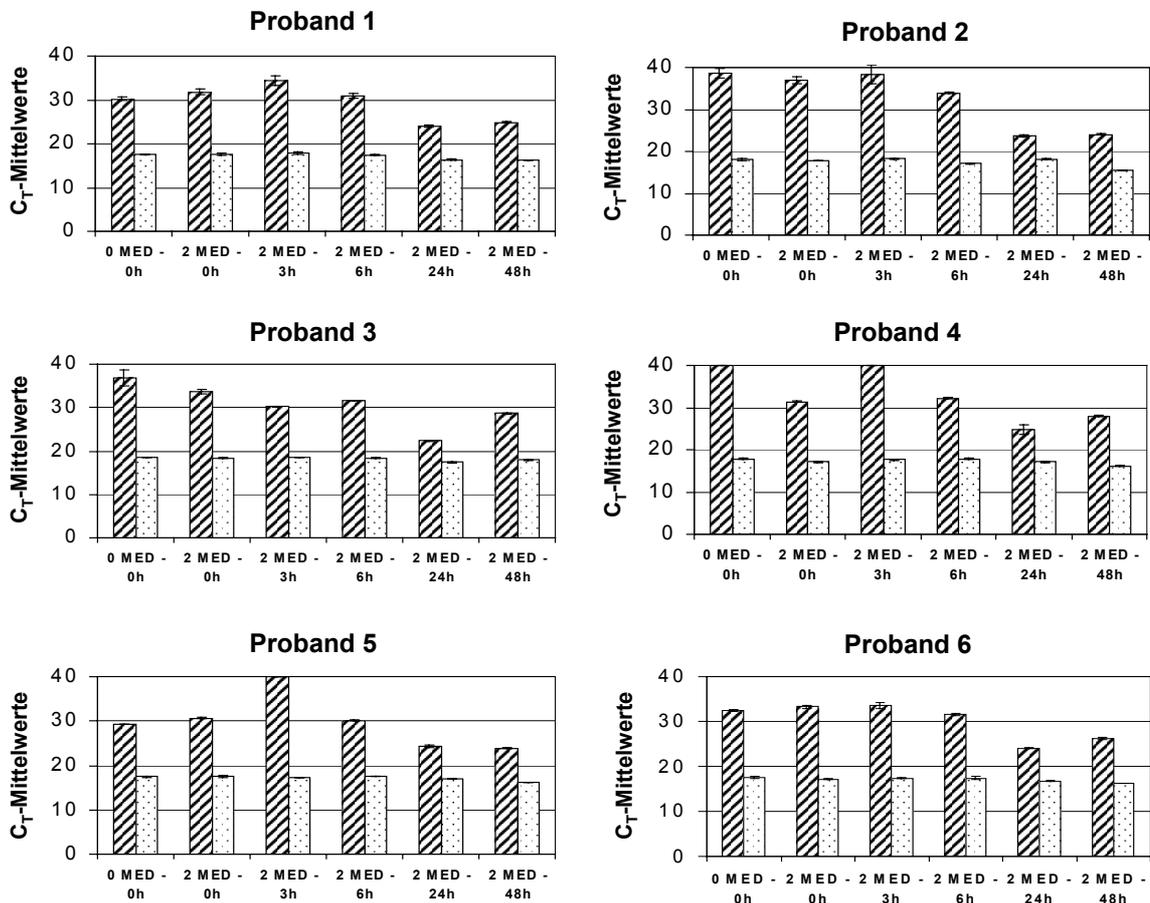


Abbildung 4.6: **MMP-1 und GAPDH TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten der SSR Time Course Studie**

Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD abgebildet. Ein  $C_T$ -Wert von 40 bedeutet, dass keine mRNA detektiert werden konnte. (▨ = MMP-1, ▩ = GAPDH)

In Abbildung 4.6 sind die MMP-1 TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten dieser Studie dargestellt. Dabei bedeutet ein  $C_T$ -Wert von  $\geq 36$ , dass sehr wenig oder gar keine MMP-1 mRNA ermittelt werden konnte. Dieses war in der Hälfte der unbestrahlten Hautproben von Proband 2, 3 und 4 dieser Untersuchungsreihe der Fall, ebenso in der sofort nach der Bestrahlung entnommenen Biopsie von Testperson 2 und in der 3 h Probe von den

Probanden 2, 4 und 5. Die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten von GAPDH verdeutlichen stabile Level des Housekeeping-Gens mit einem  $C_T$ -Mittelwert von  $17,86 \pm 0,42$  (SD) für 0 MED und  $17,13 \pm 0,61$  (SD) bei 2 MED SSR nach 24 h. Dies stellt ein Indiz dafür dar, dass SSR wie erwartet keinen Effekt auf die Expression des Housekeeping-Gens hat. Abbildung 4.7 zeigt die relative Induktion der MMP-1 mRNA mittels der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode, wobei auf GAPDH normalisiert und der 0 MED  $C_T$ -Wert als Kalibrator verwendet wurde. Alle Probanden außer Nummer 3 wiesen nach 3 h im Vergleich zum 2 MED-0 h Wert eine reprimierte MMP-1 Expression auf. Nach 6 h änderte sich dieser Trend, und alle Testpersonen erreichten nach 24 h ein MMP-1 mRNA Expressionsmaximum von 21,8-fach (Proband 5) bis zu über 34000-fach (Proband 2) nach der Bestrahlung mit 2 MED SSR. Nach 48 h war die Induktion für alle Testpersonen wieder rückläufig, jedoch deutlich vorhanden. Durchgängig konnte für alle Zeitpunkte eine sehr große Donorvariabilität beobachtet werden, die sich hauptsächlich auf die stark unterschiedlichen basalen MMP-1  $C_T$ -Werte der unbestrahlten Kontrollen zurückführen lassen.

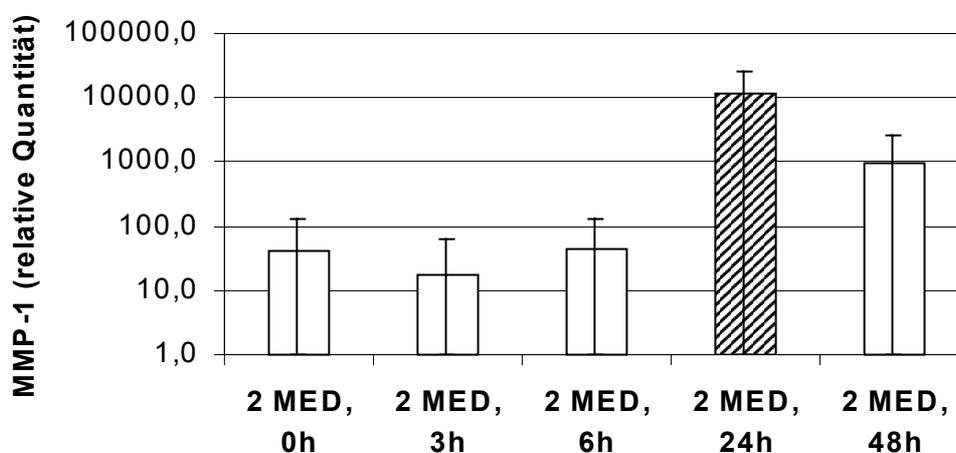


Abbildung 4.7: **Maximale MMP-1 Induktion in humaner Haut 24 h nach Bestrahlung mit 2 MED SSR**

Relative Quantifizierung der MMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. ▨ repräsentiert die Bedingungen, die in der höchsten MMP-1 Expression resultierten. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 6$ ). Die hohen Standardabweichungen verdeutlichen große individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden.

Für TIMP-1 konnten in den unbestrahlten und UV-exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 22,4 und 17,5 gemessen werden. Für die relative Quantifizierung des spezifischen Inhibitors von MMP-1 wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt, wobei nach der Normierung auf GAPDH die unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator benutzt wurde (siehe Abbildung 4.8). Auch hier konnte nach 3 h im Vergleich zum 2 MED-0 h Wert eine reprimierte TIMP-1 Expression außer bei Proband 6 bestimmt werden. Vier von sechs Testpersonen zeigten die höchste TIMP-1 Induktion 24 h nach Bestrahlung mit 2 MED SSR. Die anderen beiden wiesen ein Maximum nach 6 h (Proband 1 und 3) auf. Die Induktionen erreichten dabei Werte von 2,2- bis 6,0-fach. Die sehr großen Unterschiede in der MMP-1 mRNA Induktion zwischen den einzelnen Probanden ließen sich in dem Ausmaße für TIMP-1 nicht feststellen.

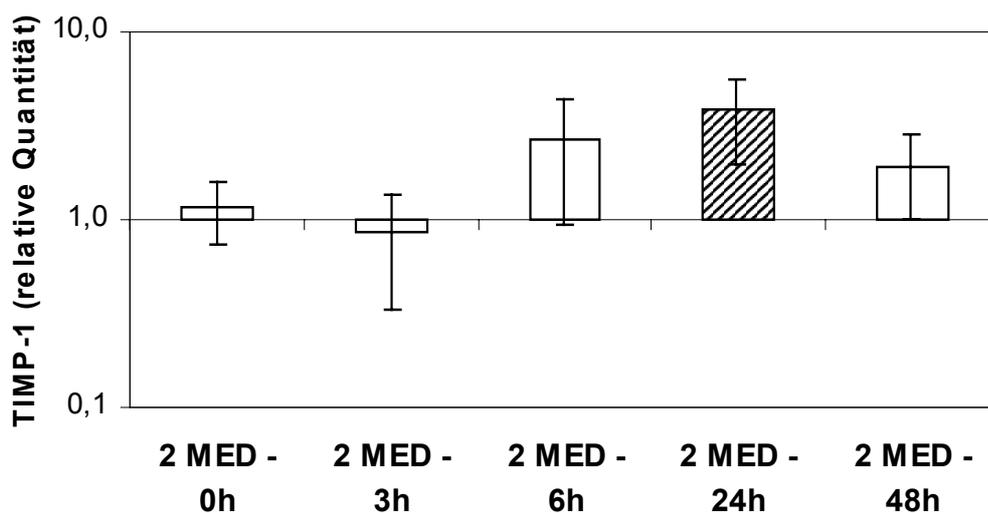


Abbildung 4.8: **Maximale TIMP-1 Induktion in humaner Haut 24 h nach Bestrahlung mit 2 MED SSR**

Relative Quantifikation der TIMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. ▨ stellt die Bedingungen dar, unter denen die höchste TIMP-1 Expression erzielt wurde. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 6$ ).

### 4.2.3 SSR Dose Response Studie

Nach der Durchführung der Zeitabhängigkeitsstudie wurde der 24 h Zeitpunkt zur Probenentnahme in einer Dosisabhängigkeitsstudie ausgewählt. Die Haut von sechs weiteren Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 7-12) wurde mit SSR-Dosen zwischen 0,5 und 4 MED bestrahlt.

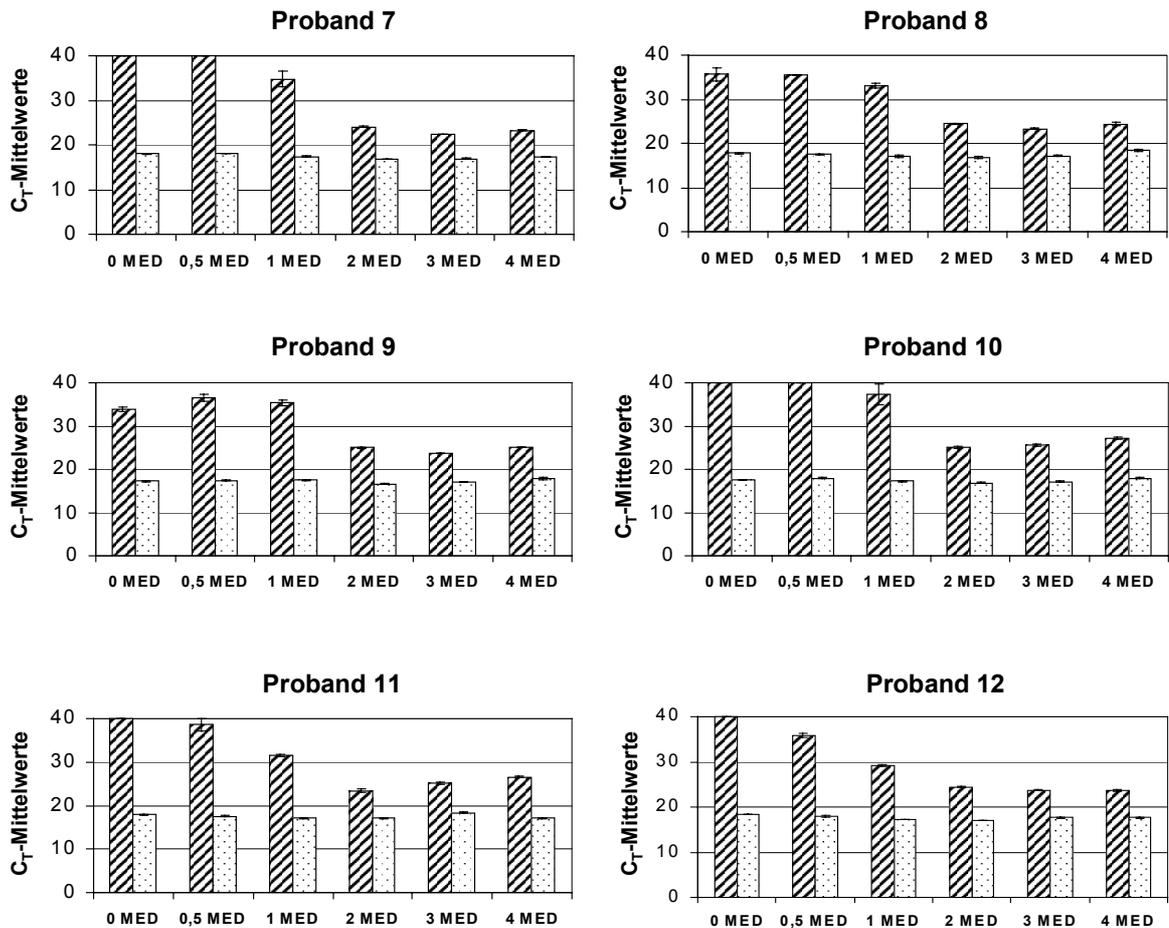


Abbildung 4.9: *MMP-1 und GAPDH TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten der SSR Dose Response Studie*  
 Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm SD$  abgebildet. Ein  $C_T$ -Wert von 40 bedeutet, dass keine mRNA detektiert werden konnte. (▨ = MMP-1, ▩ = GAPDH)

Die MMP-1 TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten in Abbildung 4.9 demonstrieren, dass sehr wenig oder gar keine MMP-1 mRNA in den unbestrahlten oder mit 0,5 MED SSR-exponierten Hautproben von fünf der sechs Probanden (außer Nummer 9) detektiert werden konnte ( $C_T \geq 36$ ). Bei den GAPDH TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten wird erneut deutlich, dass die mRNA Expression des Housekeeping-Gens vom SSR unbeeinflusst bleibt. Unter dem Normalisieren auf das Housekeeping-Gen GAPDH und der Verwendung des 0 MED  $C_T$ -Wertes als Kalibrator wurde für jede Testperson die relative Induktion von MMP-1 mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt und der Mittelwert berechnet (siehe Abbildung 4.10). In der Regel waren 1 MED SSR notwendig, um den MMP-1 Level zu erhöhen (Ausnahme: Proband Nummer 9). Die Bestrahlung mit 2 MED SSR resultierte aber bei allen Testpersonen in einer sehr deutlichen MMP-1 mRNA Induktion, die zwischen 296- (Proband 9) und 54602-fach (Proband 11) lag. Eine Bestrahlung der Hautareale mit höheren Dosen wie 3 und 4 MED ergab im allgemeinen  $C_T$ -Werte, die kaum von denen mit 2 MED erzielten abwichen.

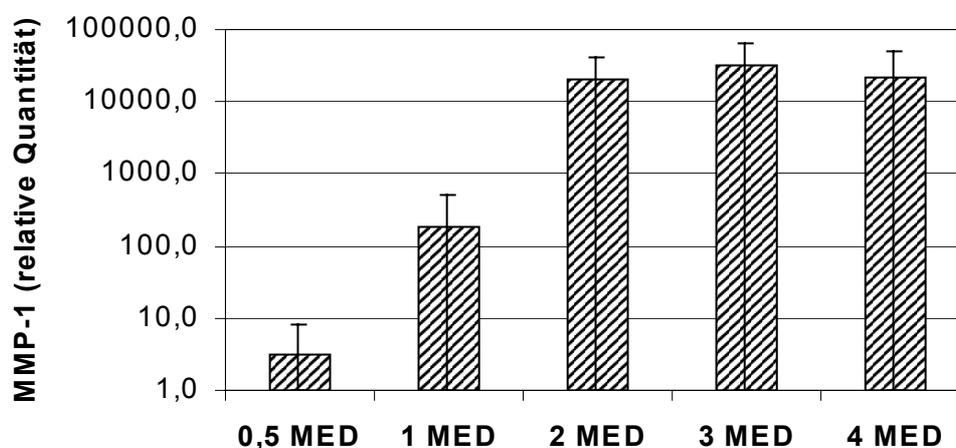


Abbildung 4.10: **SSR-Dosisabhängigkeit der MMP-1 Induktion in humaner Haut 24 h nach der Bestrahlung**

Relative Quantifizierung der MMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD abgebildet ( $n = 6$ ). Die hohen Standardabweichungen verdeutlichen große individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden.

Für TIMP-1 konnten in den unbestrahlten und UV-exponierten Proben ähnlich wie in der Zeitabhängigkeitsstudie  $C_T$ -Werte zwischen 21,9 und 17,0 gemessen werden. Für die relative Quantifizierung mittels der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde auf GAPDH normiert und die unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator benutzt. In Abbildung 4.11 sind die gemittelten relativen Quantitäten dargestellt. Eine leichte Erhöhung des TIMP-1 Levels wurde bereits nach 1 MED SSR beobachtet. Entsprechend der MMP-1 mRNA Expression konnte aber eine deutliche Erhöhung der TIMP-1 Genexpression erst ab einer Bestrahlung mit  $\geq 2$  MED SSR durchgehend bei allen Probanden detektiert werden. Die höchste TIMP-1 Induktion von 15,5-fach wurde bei der Testperson 7 nach einer Bestrahlung mit 4 MED gemessen. Wie in der Time Course Studie konnten bei der MMP-1 Induktion im Vergleich zum TIMP-1 sehr große individuelle Unterschiede detektiert werden. Eine direkte Korrelation zwischen der MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression nach SSR-Bestrahlung konnte somit nicht festgestellt werden.

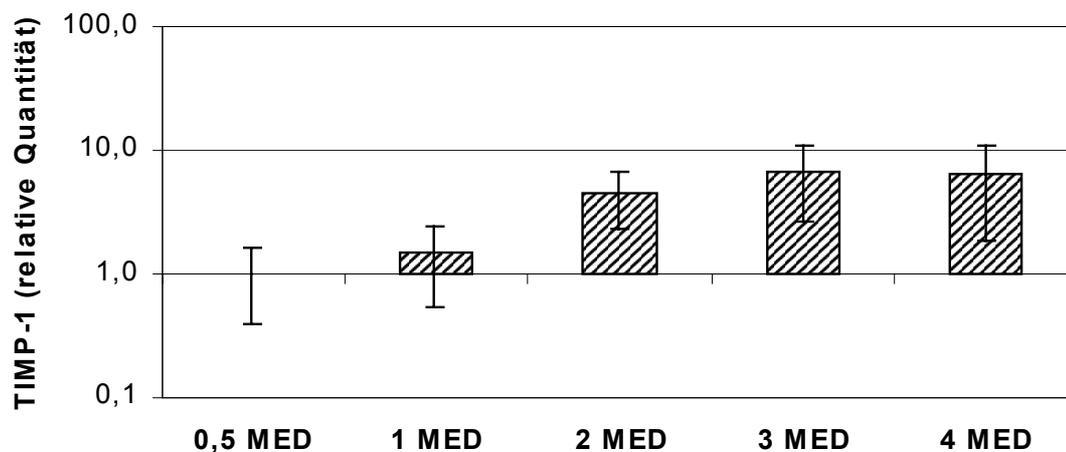


Abbildung 4.11: **SSR-Dosisabhängigkeit der TIMP-1 Induktion in humaner Haut 24 h nach der Bestrahlung**

Relative Quantifikation der TIMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 6$ ).

#### 4.2.4 Reproduzierbarkeits- bzw. Epidermis-Dermis Trennstudie (SSR)

Die beiden vorherigen Studien zeigten große individuelle Unterschiede in der MMP-1 mRNA Expression nach UV-Bestrahlung auf. Daher wurde eine dritte Studie durchgeführt, um zu überprüfen und zu beweisen, dass dieses Phänomen auf charakteristische Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden und nicht auf eine mangelnde Reproduzierbarkeit der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Technik zurückzuführen war. Bei fünf Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 13-17) wurden jeweils zwei gleich behandelte Biopsien pro Testperson genommen: zwei unbestrahlte Kontrollen, zwei mit 2 MED SSR exponierte Areale (24 h) und zusätzlich zwei mit 2 MED bestrahlte Biopsien (24 h), die im Anschluss in Epidermis und Dermis aufgetrennt wurden. Die Separation wurde mittels Hitze durchgeführt, da dieses eine gute Methode darstellt, um Cross-Kontaminationen zwischen den Geweben zu vermeiden (Wilkinson und Walsh 1974). In allen Hautproben konnten für MMP-1 C<sub>T</sub>-Werte zwischen 22,1 und 35,0 sowie für TIMP-1 zwischen 17,4 und 23,1 ermittelt werden. Für die relative Quantifizierung wurden nach dem Normalisieren auf GAPDH die unbestrahlten Kontrollen gemittelt als Kalibrator benutzt und die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt. Bei den „intakten“ Hautbiopsien der fünf Probanden konnten nach der Bestrahlung MMP-1 mRNA Induktionen zwischen (310 ± 4,6 (SD))-fach (Testperson 17) und (2282 ± 189,9 (SD))-fach (Testperson 14) gemessen werden (siehe Abbildung 4.12). Die relativ kleinen Standardabweichungen der Duplikate deuten darauf hin, dass es sich bei der Bestrahlungstechnik in Verbindung mit den TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Systemen um einen sehr reproduzierbaren Assay handelt. Damit können die großen Unterschiede in der MMP-1 Expression der einzelnen Probanden als individuelle Donorvariabilitäten bestätigt werden. Auch bei den in Epidermis und Dermis aufgetrennten Proben konnte eine Reproduzierbarkeit der Methode festgestellt werden. Epidermale MMP-1 mRNA Expression war zwischen (143 ± 34,3 (SD))-fach (Proband 16) und (1301 ± 123 (SD))-fach (Proband 14) erhöht nach UV-Exposition zu finden, dermale zwischen (84,4 ± 72,7 (SD))-fach (Proband 17) und (847 ± 335 (SD))-fach (Proband 14). Mit Ausnahme der Testperson 13 zeigten alle Teilnehmer der Untersuchung in der Epidermis eine etwas höhere MMP-1 Expression als in der Dermis.

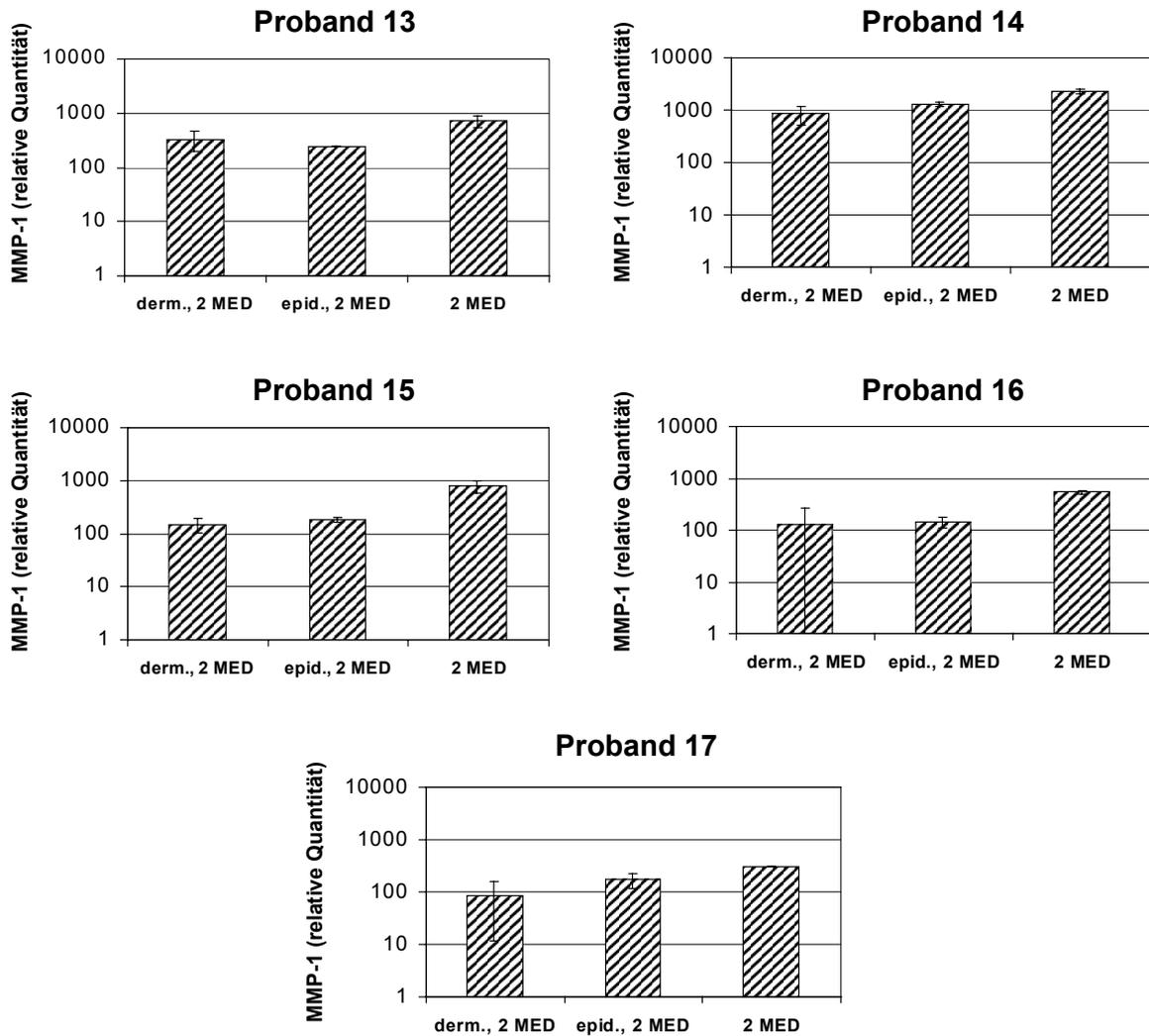


Abbildung 4.12: **Bestätigung der Reproduzierbarkeit des MMP-1 TaqMan® RT-PCR Systems sowohl für „intakte“ als auch für separierte Haut (Dermis-Epidermis) in vivo**

Relative Quantifizierung der MMP-1 mRNA Expression nach SSR-Exposition mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und den gemittelten  $\Delta C_T$ -Wert zweier unbestrahlter Kontrollen. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 2$ ).

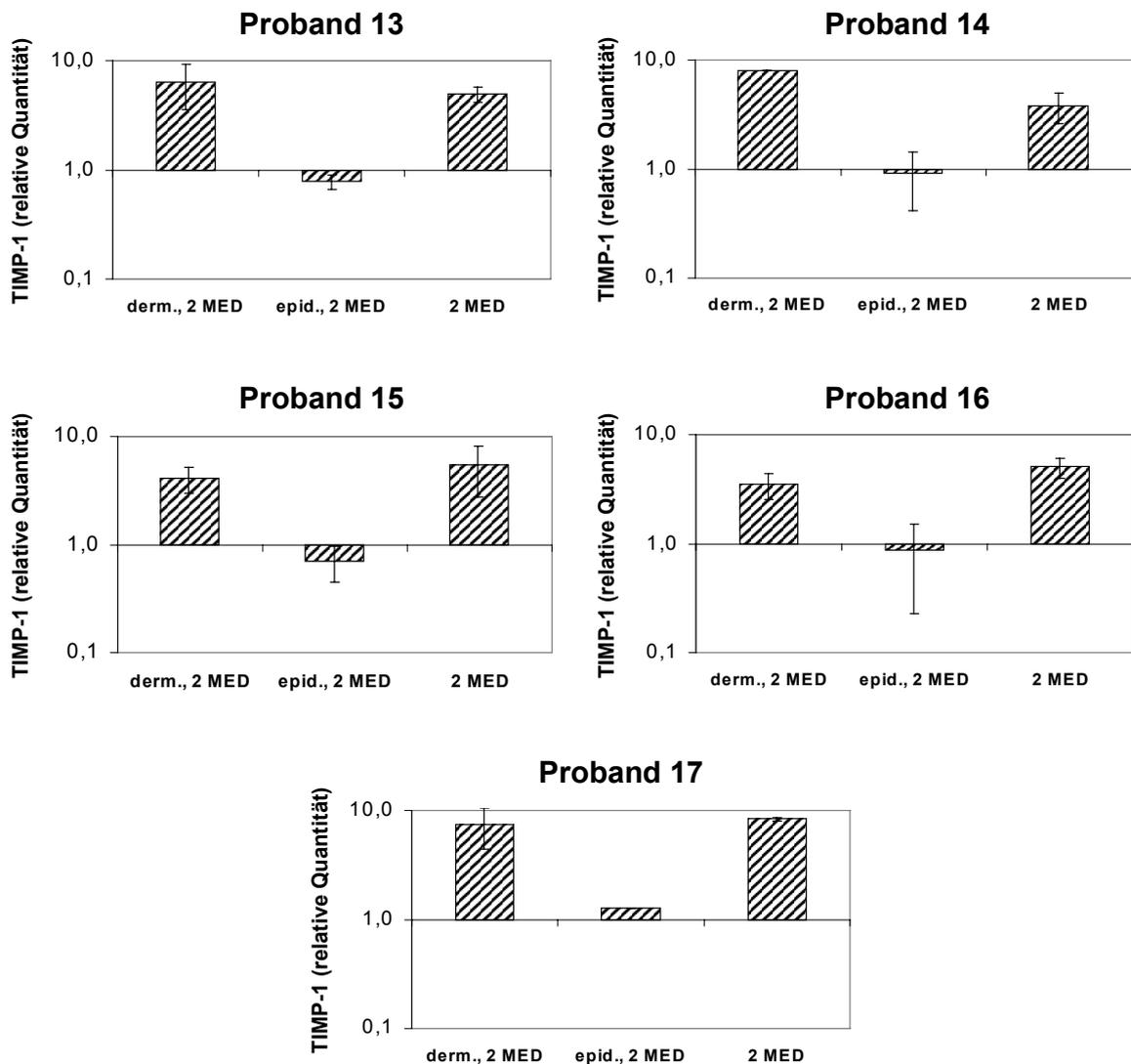


Abbildung 4.13: **Bestätigung der Reproduzierbarkeit des TIMP-1 TaqMan® RT-PCR Systems sowohl für „intakte“ als auch für separierte Haut (Dermis-Epidermis) in vivo**

Relative Quantifizierung der TIMP-1 mRNA Expression nach SSR-Exposition mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und den gemittelten  $\Delta C_T$ -Wert zweier unbestrahlter Kontrollen. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 2$ ).

Die TIMP-1 mRNA Induktion der fünf mit 2 MED SSR bestrahlten Probanden erreichte Werte zwischen ( $3,8 \pm 1,2$  (SD))-fach (Nummer 14) und ( $8,4 \pm 0,3$  (SD))-fach (Nummer 17) in nicht separierter Haut (siehe Abbildung 4.13). In der Dermis konnte TIMP-1

zwischen ( $3,5 \pm 0,9$  (SD))-fach (Testperson 16) und ( $8,0 \pm 0,0$  (SD))-fach (Testperson 14) erhöht bestimmt werden. Im Gegensatz zum MMP-1 konnte eine Induktion der TIMP-1 mRNA nur in der Dermis beobachtet werden. In der bestrahlten Epidermis näherten sich die Werte für die TIMP-1 mRNA Expression denen des unbestrahlten Zustandes an: ( $0,7 \pm 0,3$  (SD))-fach (Nummer 15) bis ( $1,3 \pm 0,0$  (SD))-fach (Nummer 17).

#### 4.2.5 UVA-Studie

Im Anschluss an die SSR-Studien wurde eine Versuchsreihe mit verschiedenen Dosen von UVA II (340-400 nm) durchgeführt, um Aufschluss über die relativen Effekte des UVA - mit über 90 % Hauptanteil des SSR - zu erlangen. Sechs Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 18-23) wurden mit UVA-Dosen zwischen 0,2 und 2 MED bestrahlt und 24 h später analysiert. Abbildung 4.14 zeigt anhand der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten, dass in der Hälfte der unbestrahlten Hautproben (bei Proband 18, 20 und 21) sehr wenig oder gar keine MMP-1 mRNA ermittelt werden konnte ( $C_T \geq 36$ ). Die stabilen GAPDH Rohdaten verdeutlichen wie bei den SSR-Experimenten, dass die mRNA Expression des Housekeeping-Gens nicht vom UV beeinflusst wird. Unter der Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und der Verwendung des 0 MED  $C_T$ -Wertes als Kalibrator wurde für jede Testperson die relative Induktion von MMP-1 mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode bestimmt und diese Werte gemittelt (siehe Abbildung 4.15). Im Allgemeinen konnte eine erhöhte MMP-1 Genexpression erst ab erythemalen ( $\geq 1$  MED) UVA-Dosen ermittelt werden. Eine sehr deutliche Induktion der MMP-1 mRNA erfolgte ab einer Dosis von 2 MED wie nach der Exposition mit SSR. Dabei konnten nach der UVA-Bestrahlung mit 2 MED Werte zwischen 202-facher (Proband 22) und 459593-facher (Proband 18) MMP-1 Induktion gemessen werden. Bei allen Probanden entsprach der mit 2 MED UVA-induzierte MMP-1 mRNA Level in etwa dem von 2 MED SSR ( $96979 \pm 181641$  (SD)  $\cong$   $81722 \pm 115612$  (SD)). Erneut konnte eine sehr große Donorvariabilität in der MMP-1 Expression detektiert werden.

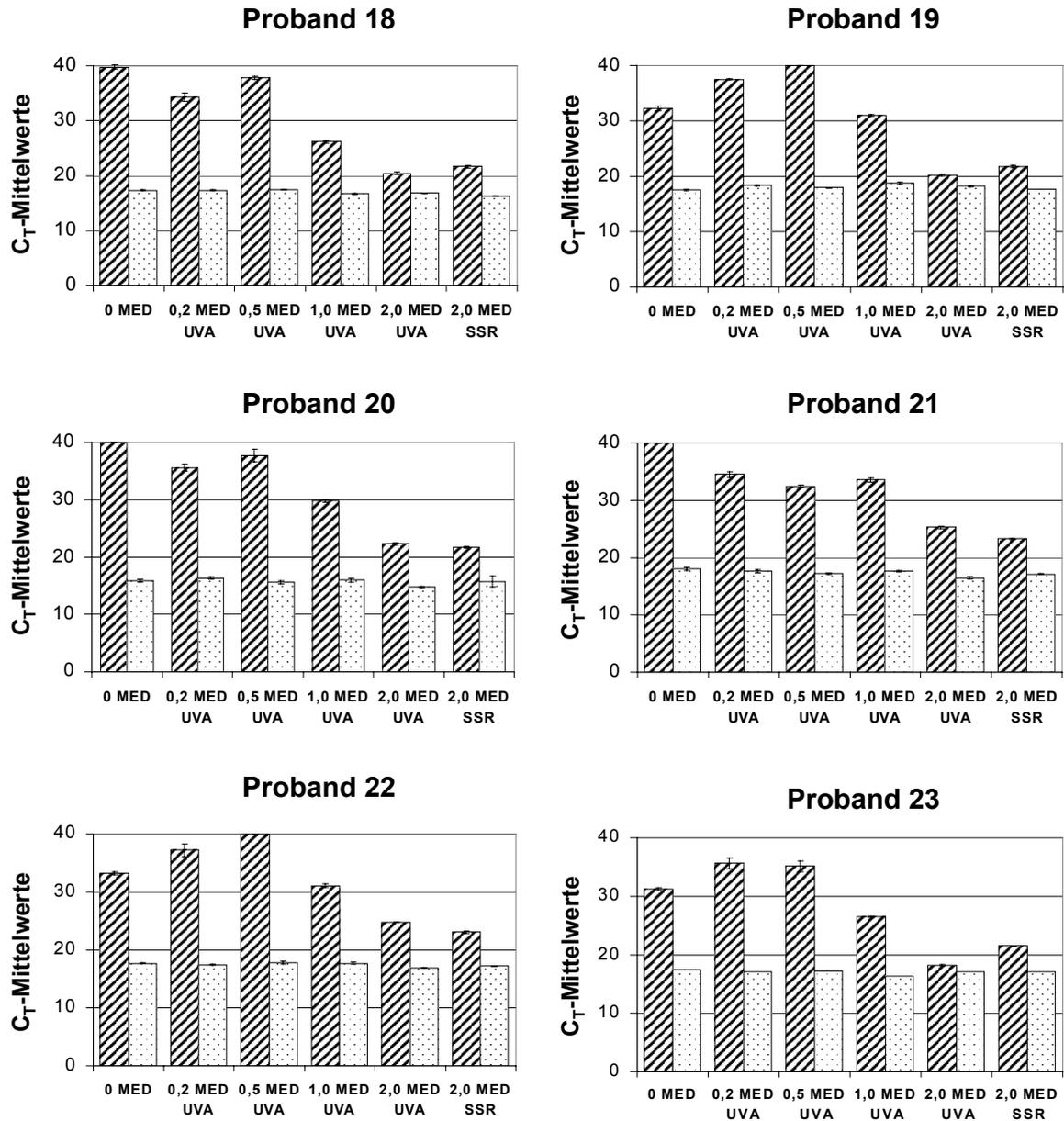


Abbildung 4.14: *MMP-1* und *GAPDH* TaqMan® RT-PCR Rohdaten der UVA-Studie

Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD abgebildet. Ein C<sub>T</sub>-Wert von 40 bedeutet, dass keine mRNA detektiert werden konnte. (▨ = *MMP-1*, ▩ = *GAPDH*)

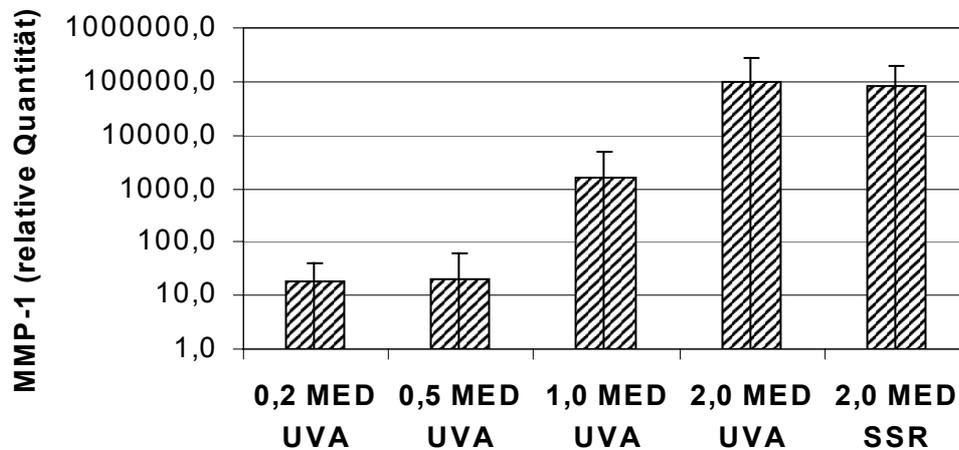


Abbildung 4.15: **UVA-Dosisabhängigkeit der MMP-1 Induktion in humaner Haut 24 h nach der Bestrahlung**

Relative Quantifizierung der MMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD abgebildet ( $n = 6$ ). Die hohen Standardabweichungen verdeutlichen große individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden.

Für TIMP-1 konnten in den unbestrahlten und UV-exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 21,0 und 17,2 vergleichbar mit den Daten der SSR-Studien gemessen werden. Für die relative Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde auf GAPDH normiert und die unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator benutzt. In Abbildung 4.16 sind die Mittelwerte der relativen Quantitäten dargestellt. Entsprechend der SSR Dose Response Studie konnte eine leichte Erhöhung des TIMP-1 Levels bei 1 MED UVA gemessen werden. Eine deutliche Induktion der TIMP-1 mRNA bei allen Probanden wurde jedoch erst nach einer Bestrahlung mit 2 MED UVA erzielt. Dabei zeigte Testperson 19 bei 2 MED UVA die stärkste TIMP-1 Induktion mit 16,6-fach. Im Allgemeinen entsprach der mit 2 MED UVA-induzierte TIMP-1 mRNA Level in etwa dem von 2 MED SSR ( $6,9 \pm 5,0$  (SD)  $\cong$   $9,1 \pm 5,4$  (SD)). Wie in den vorherigen Studien konnten für das TIMP-1 keine Donorvariabilitäten in dem Ausmaße wie für das MMP-1 beobachtet werden.

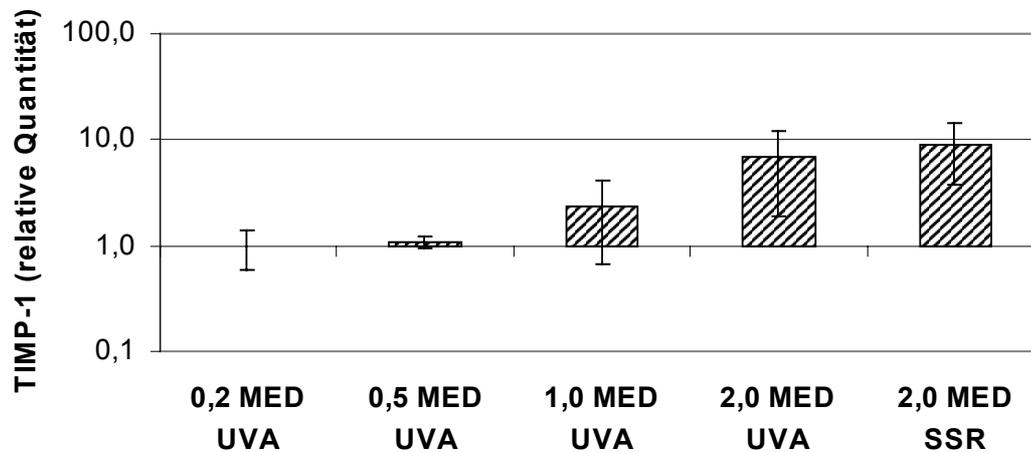


Abbildung 4.16: ***UVA-Dosisabhängigkeit der TIMP-1 Induktion in humaner Haut 24 h nach der Bestrahlung***

*Relative Quantifikation der TIMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 6$ ).*

#### 4.2.6 UVB-Studie

Um neben der relativen Effekte des UVA auch die relativen Effekte des UVB (8,5 % der Bestrahlungsstärke des SSR) im Vergleich zum Gesamt-SSR zu untersuchen, wurden zehn Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 24-33) mit verschiedenen UVB-Dosen (300 nm) zwischen 0,2 und 2 MED bestrahlt und die Biopsien nach 24 h entnommen. Die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten in der Abbildung 4.17 zeigen, dass in über der Hälfte der unbestrahlten Hautproben (bei Proband 24, 26, 27, 28, 30 und 32) sehr wenig oder gar keine MMP-1 mRNA detektiert werden konnte ( $C_T \geq 36$ ). Generell waren die MMP-1  $C_T$ -Werte weitaus weniger homogen als die der SSR- und UVA-Studien. Daher wurde die Anzahl der Probanden nach der Analyse von sechs - wie bei den anderen Untersuchungen - auf zehn erhöht. Die GAPDH Rohdaten verdeutlichen wie bei den SSR- und UVA-Experimenten, dass das UV keine Wirkung auf die mRNA Expression des Housekeeping-Gens ausübt.

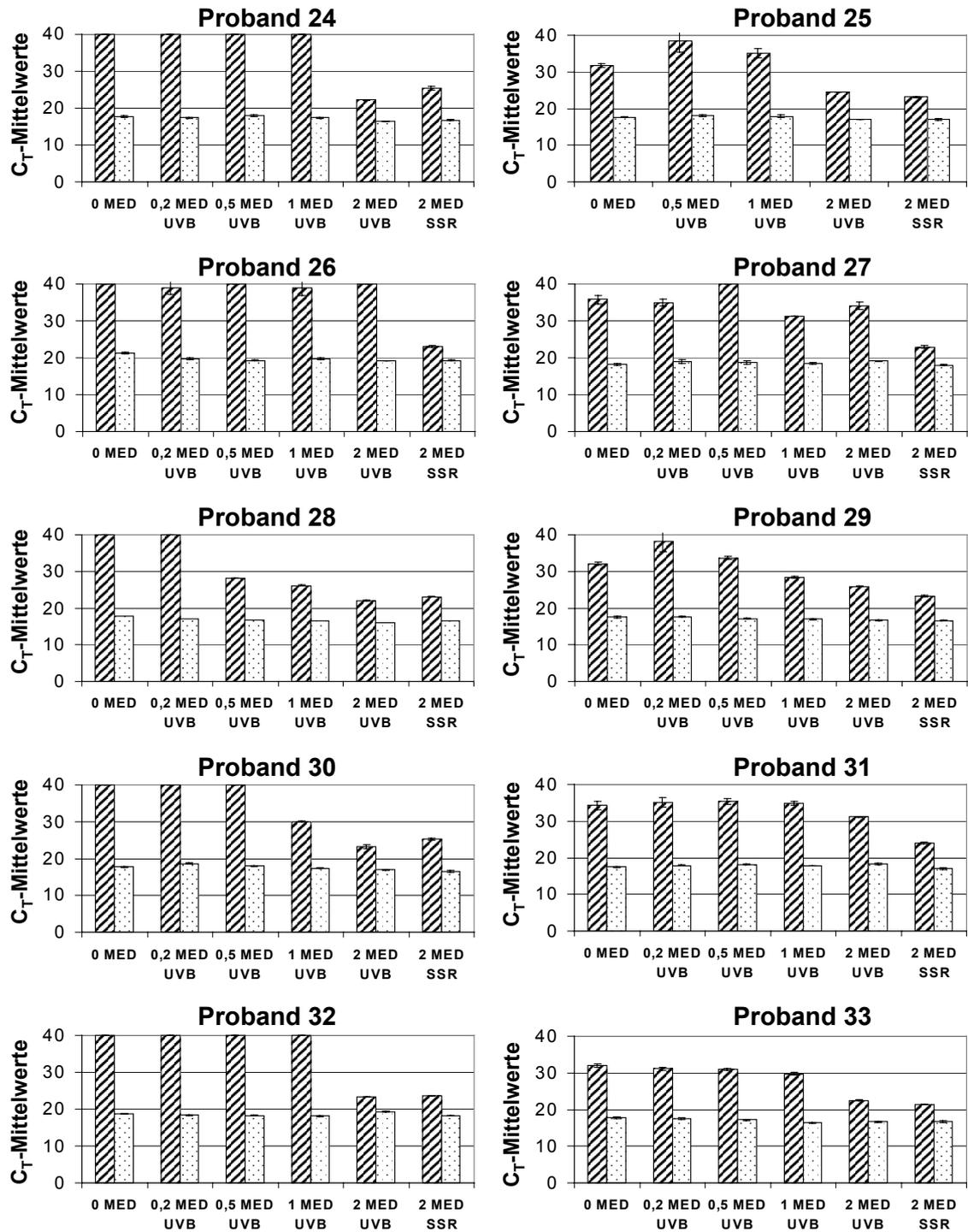


Abbildung 4.17: *MMP-1* und *GAPDH* TaqMan® RT-PCR Rohdaten der UVB-Studie

Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD abgebildet. Ein C<sub>T</sub>-Wert von 40 bedeutet, dass keine mRNA detektiert werden konnte. (▨ = *MMP-1*, ▩ = *GAPDH*)

Nach der Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und der Verwendung des 0 MED  $C_T$ -Wertes als Kalibrator wurde für jede Testperson die relative Induktion von MMP-1 mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode bestimmt und diese Werte gemittelt (siehe Abbildung 4.18). Bei fünf der zehn Probanden erfolgte eine Erhöhung der Genexpression bereits mit erythemalen ( $\geq 1$  MED) UVB-Dosen (Nummer 27, 28, 29, 30 und 33), bei Proband 28 sogar schon mit 0,5 MED UVB. Bis auf Testperson 26 zeigten alle Probanden eine deutliche Induktion der MMP-1 mRNA nach einer Bestrahlung mit 2 MED UVB. Dabei entsprach der 2 MED UVB-induzierte MMP-1 mRNA Level bei dem Großteil dieser Probanden in etwa dem von 2 MED SSR ( $38642 \pm 55006$  (SD)  $\cong 16782 \pm 20733$  (SD) für  $n = 10$ ). Insgesamt konnten nach der UVB-Bestrahlung mit 2 MED MMP-1 Induktionen zwischen 6,0-fach (Proband 27) und 89525-fach (Proband 24) entsprechend einer großen Donorvariabilität detektiert werden.

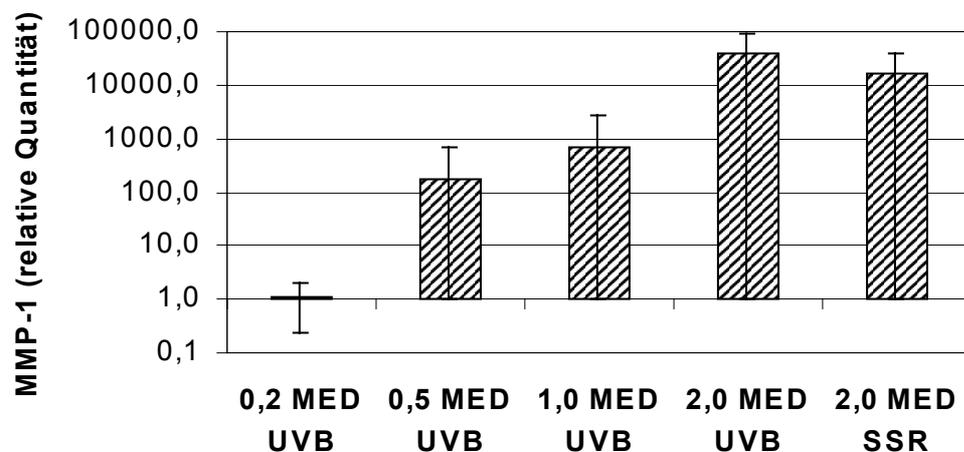


Abbildung 4.18: **UVB-Dosisabhängigkeit der MMP-1 Induktion in humaner Haut 24 h nach der Bestrahlung**

Relative Quantifizierung der MMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 10$ ). Die hohen Standardabweichungen verdeutlichen große individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden

Für TIMP-1 konnten in den unbestrahlten und UV-exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 26,6 und 17,4 gemessen werden, stärker streuende Werte als die der SSR- und UVA-Studien. Für die relative Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde auf GAPDH normiert und die unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator benutzt. In Abbildung 4.19 sind die Mittelwerte der relativen Quantitäten dargestellt. Eine signifikante Erhöhung des TIMP-1 Levels konnte bei allen Probanden erst nach einer Bestrahlung mit 2 MED UVB gemessen werden, wobei Testperson 32 bei 2 MED UVB die stärkste TIMP-1 Induktion mit 7,1-fach aufwies. Generell lag der mit 2 MED UVB induzierte TIMP-1 mRNA Level in etwa in der Größenordnung des mit 2 MED SSR erzielten ( $3,1 \pm 1,7$  (SD)  $\cong 5,5 \pm 2,3$  (SD)). Auch in dieser Studie konnten für die TIMP-1 Expression keine so großen individuellen Unterschiede wie für das MMP-1 beobachtet werden.

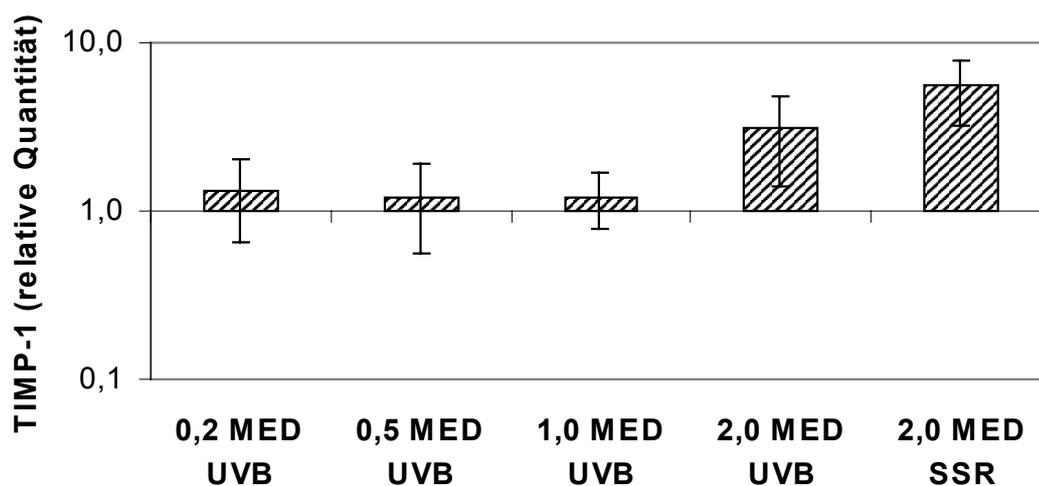


Abbildung 4.19: **UVB-Dosisabhängigkeit der TIMP-1 Induktion in humaner Haut 24 h nach der Bestrahlung**

Relative Quantifikation der TIMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 10$ ).

#### 4.2.7 Repetitive UV-Expositionsstudie (SSR)

In einer letzten *in vivo* Studie wurde der Effekt von repetitiver SSR-Bestrahlung mit suberythemalen UV-Dosen auf die MMP-1 und TIMP-1 Genexpression untersucht. Sechs Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 34-39) wurden für zwei aufeinanderfolgende Wochen fünfmal wöchentlich mit 0,65 MED SSR bestrahlt. 24 h nach der fünften suberythemalen Bestrahlung, also nach der ersten Woche, wurde jeweils die erste Biopsie genommen. Die zweite folgte nach der zweiten Woche, 24 h nach der zehnten UV-Exposition, und die dritte eine Woche nach der zehnten Bestrahlung. Eine vierte Hautstanze wurde 24 h später einem Areal entnommen, dass direkt nach der zehnten Bestrahlung mit 0,65 MED einer Dosis von 2 MED SSR exponiert wurde. Als Kontrollen wurde jeweils ein Areal mit einer einzelnen Dosis von 0,65 MED sowie eins mit 2 MED bestrahlt und 24 h später entnommen. In Abbildung 4.20 sind die MMP-1 TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten dieser Studie dargestellt. Dabei bedeutet ein  $C_T$ -Wert von  $\geq 36$ , dass sehr wenig oder gar keine MMP-1 mRNA bestimmt werden konnte. Dieses war bei allen Probanden in den unbestrahlten Hautproben der Fall, ebenso in der mit einer einzelnen Dosis von 0,65 MED bestrahlten Biopsie von Proband 36, 37, 38 und 39. Die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten von GAPDH verdeutlichen wie in den übrigen Untersuchungsreihen stabile Level des Housekeeping-Gens nach UV-Exposition. Abbildung 4.21 zeigt die relative Induktion der MMP-1 mRNA mittels der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode, wobei auf GAPDH normalisiert und der 0 MED  $C_T$ -Wert als Kalibrator verwendet wurde. Generell konnte 24 h nach der fünfmaligen Bestrahlung mit einer suberythemalen SSR-Dosis von 0,65 MED eine deutlich erhöhte MMP-1 Genexpression gemessen werden. Diese erreichte bei allen Probanden bis auf Testperson 38 annähernd den MMP-1 mRNA Level nach einer einmaligen Dosis von 2 MED SSR ( $19491 \pm 16072$  (SD)  $\cong$   $63308 \pm 44968$  (SD) für  $n = 6$ ). Bei der fortgesetzten repetitiven Bestrahlung mit der suberythemalen SSR-Dosis war ein klarer Hinweis auf eine „Hardening“-Effekt zu verzeichnen: In der Regel war nach der zehnmaligen Bestrahlung mit 0,65 MED sowohl nach 24 h als auch nach einer Woche ein deutlicher Rückgang der MMP-1 Induktion im Vergleich zu der fünfmaligen SSR-Exposition zu beobachten (Ausnahme: Proband 38, 24 h). Bei drei von sechs Probanden (Nummer 34, 38 und 39) wurde sogar eine Woche nach der letzten suberythemalen

Bestrahlung der MMP-1 Level der unbestrahlten Kontrollen, also  $\pm$  keine MMP-1 mRNA, beobachtet.

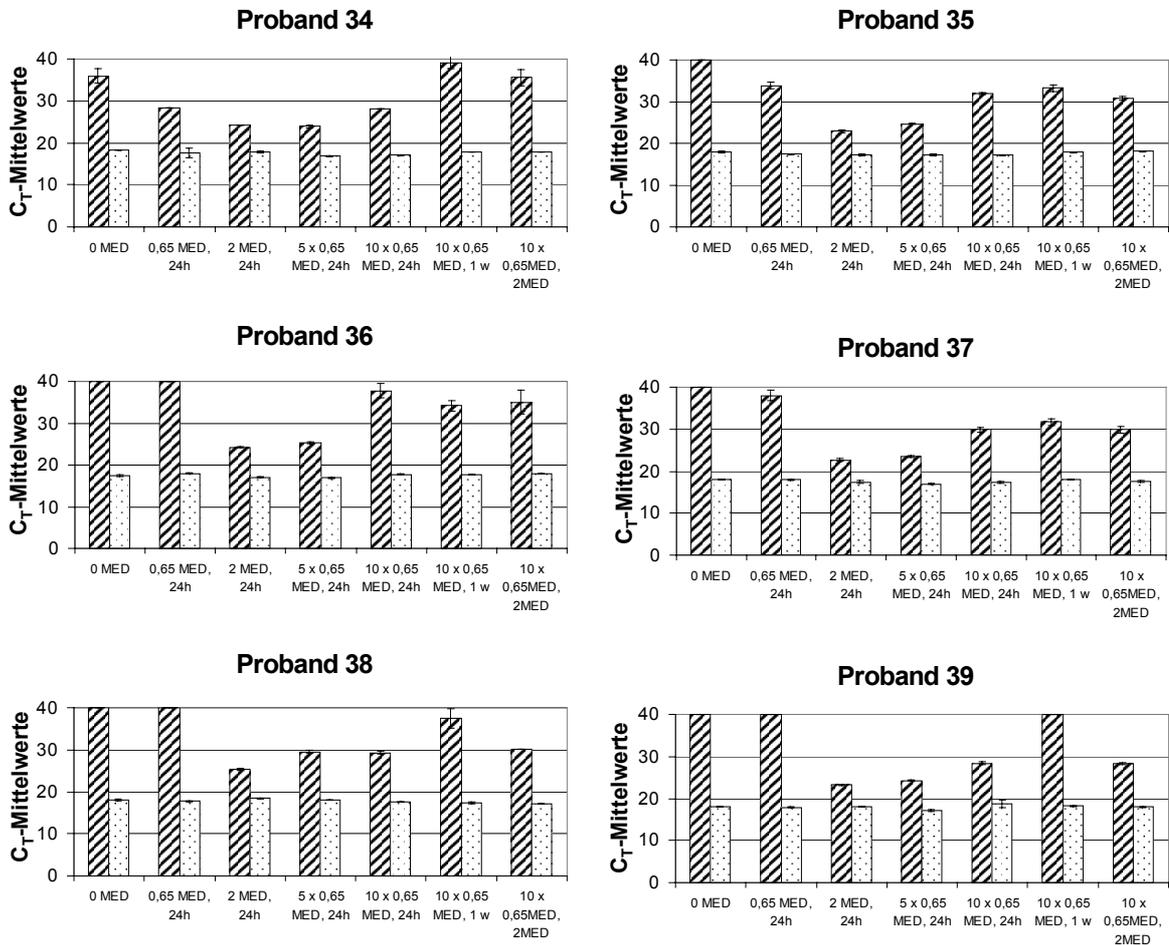


Abbildung 4.20: *MMP-1 und GAPDH TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Rohdaten der repetitiven SSR-Expositionsstudie*

Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet. Ein  $C_T$ -Wert von 40 bedeutet, dass keine mRNA detektiert werden konnte. (▨ = MMP-1, ▩ = GAPDH)

Bei den Proben, die im Anschluss an die zehnmahlige suberythemale UV-Exposition mit 2 MED SSR bestrahlt wurden, konnte ebenfalls ein Hinweis auf einen ausgeprägten „Hardening“-Effekt verzeichnet werden. Bis auf Proband 34, bei dem sogar ein MMP-1 Level in der Größenordnung der unbestrahlten Kontrolle bestimmt werden konnte,

zeigten alle anderen Testpersonen eine MMP-1 Genexpression wie nach der zehnmaligen suberythemalen Bestrahlung nach 24 h. Damit war bei allen Probanden deutlich weniger MMP-1 induziert als bei der 2 MED SSR Positivkontrolle.

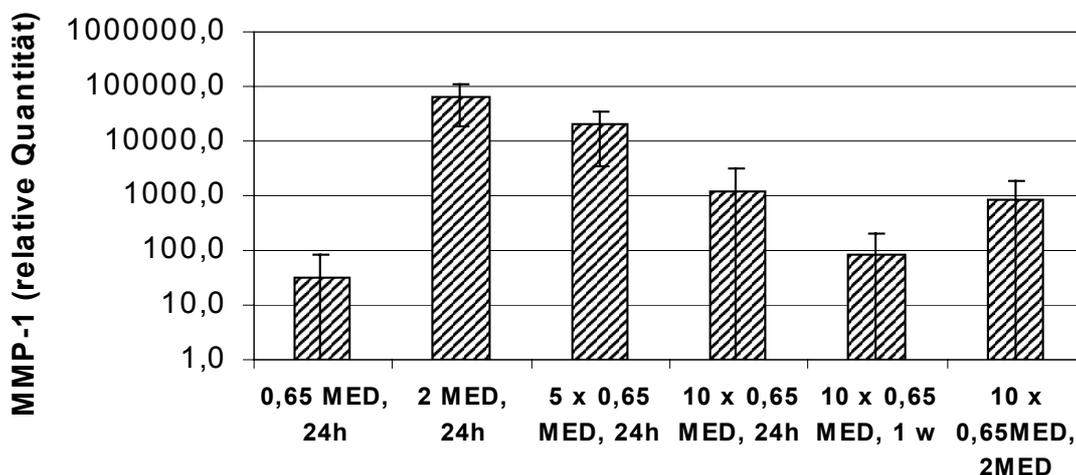


Abbildung 4.21: **Hinweis auf einen „Hardening“ Effekt auf MMP-1 Expressionsebene in vivo nach repetitiver SSR-Bestrahlung**

Relative Quantifizierung der MMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD abgebildet ( $n = 6$ ). Die hohen Standardabweichungen verdeutlichen individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden.

Für TIMP-1 konnte in den unbestrahlten und UV-exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 22,0 und 17,5 wie in den anderen SSR- und den UVA-Studien gemessen werden. Für die relative Quantifizierung des spezifischen Inhibitoren von MMP-1 wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt, wobei nach der Normierung auf GAPDH die unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator benutzt wurde (siehe Abbildung 4.22). Bei TIMP-1 konnte ein Hinweis auf einen „Hardening“-Effekt eigentlich nur bei den Hautproben, die im Anschluss an die zehnmalige SSR-Exposition mit 2 MED bestrahlt wurden, beobachtet werden. Bei diesem Ansatz ging die TIMP-1 mRNA Induktion im Vergleich zur 2 MED SSR Positivkontrolle deutlich zurück, von  $5,8 \pm 1,7$  (SD) für 2 MED SSR auf  $1,2 \pm 0,2$  (SD) für zehnmal 0,65 MED plus 2 MED (24 h). Bei den anderen mit

suberythemalen SSR-Dosen repetitiv bestrahlten Proben konnte  $\pm$  keine Induktion der TIMP-1 mRNA und somit auch kein „Hardening“-Effekt beobachtet werden.

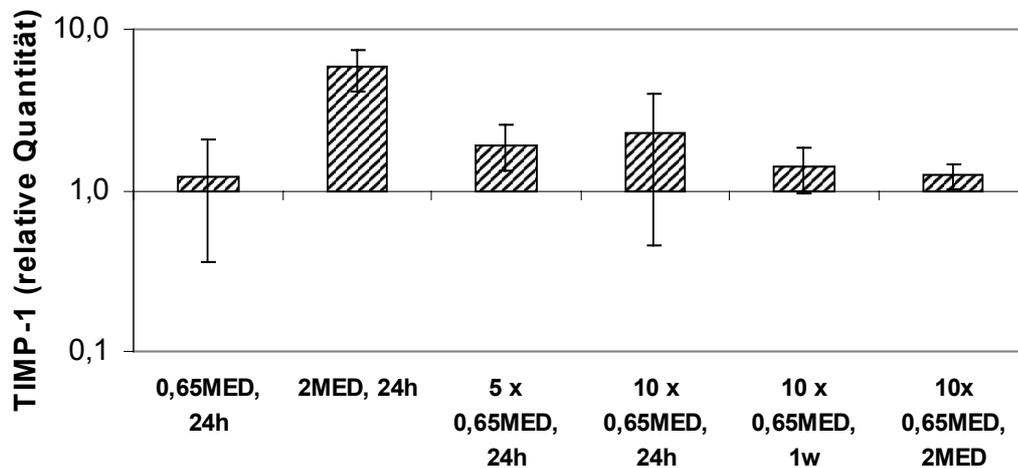


Abbildung 4.22: **Hinweis auf einen „Hardening“ Effekt auf TIMP-1 Expressionsebene in vivo nach repetitiver SSR-Bestrahlung**

Relative Quantifikation der TIMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 6$ ).

### 4.3 Relative Quantifizierung von MMP-1 und TIMP-1 mRNA *in vitro*

Parallel zu den Genexpressionsuntersuchungen *in vivo* wurde die MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression nach UV-Exposition auch *in vitro* analysiert. Damit sollte überprüft werden, inwieweit die *in vivo* auf die *in vitro* Situation übertragbar sei, um somit *in vitro* Assays für die Testung von Wirkstoffen und Regulationsmechanismen etablieren zu können. Da die Substrate der MMP-1, die fibrillären Kollagene, im ECM der Dermis lokalisiert sind, wurden für die *in vitro* Bestrahlungsexperimente die dominierenden Zellen der Dermis, die Fibroblasten (siehe Abbildung 4.23) verwendet. Als Strahlungsquelle wurde UVA (326-402 nm) ausgewählt, da dieses in tiefere Zellschichten der Dermis als das UVB vordringen kann. Nach der UVA-Exposition wurde entweder die sensitive TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR oder - u. a. auch als Vergleich - die herkömmliche Nor-

thern-Technik für die relative Quantifizierung der MMP-1 und TIMP-1 Genexpression benutzt. Für jede TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktion wurden 50 ng der aus den HDF-Zellen isolierten Total-RNA eingesetzt und jeweils die optimierten, System-spezifischen Reaktionsbedingungen verwendet. Alle Reaktionen wurden mit dem TaqMan<sup>®</sup> EZ RT-PCR Kits im ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System durchgeführt. Für die Northern-Analyse mussten pro Ansatz bis zu 40-fach mehr der aus den HDF-Zellen isolierten Total-RNA eingesetzt werden (1-2 µg), um ein auswertbares Signal zu erhalten. Im Gegensatz zu der limitierten Menge an *in vivo* Stanzbiopsien-RNA, stellte dieses *in vitro* kein Problem dar.

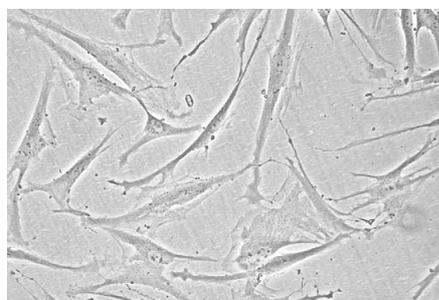


Abbildung 4.23: **HDF-Zellkultur des Spenders 3 (Tabelle 2.1), Passage 8 (Vergrößerung 1:100)**

#### 4.3.1 UVA Time Course Studie

Zunächst wurde wie *in vivo* eine Studie zur Zeitabhängigkeit durchgeführt. HDF-Zellen dreier Spender (Tabelle 2.1, Spender Nummer 3 (Passage 8), 4 (Passage 5) und 5 (Passage 2)) wurden mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt und die RNA zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 72 h nach der UV-Exposition isoliert. Alle Bestrahlungsexperimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Im Anschluss wurde die MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR detektiert. Für MMP-1 wurden in allen unbestrahlten und UV-exponierten Proben C<sub>T</sub>-Werte zwischen 24,57 und 16,13 gemessen, für TIMP-1 C<sub>T</sub>-Werte zwischen 18,21 und 15,73. Damit wurden für beide Hautalterungsmarker deutlich kleinere C<sub>T</sub>-Werte und somit mehr der entsprechenden RNA als *in vivo* gemessen. Der bedeutendste Unterschied bestand allerdings zwischen den unbestrahlten *in vivo* Ansätzen, die teilweise überhaupt kein MMP-1 exprimierten, und den

unbestrahlten *in vitro* Proben, die wenigstens einen  $C_T$ -Wert von 24,57, also bereits stark erhöhte MMP-1 mRNA Level, aufwiesen. Sowohl für die relative Quantifizierung des MMP-1 als auch für die des spezifischen Inhibitors TIMP-1 wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet, wobei nach der Normierung auf GAPDH jeweils eine entsprechende unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator benutzt wurde (siehe Abbildung 4.24).

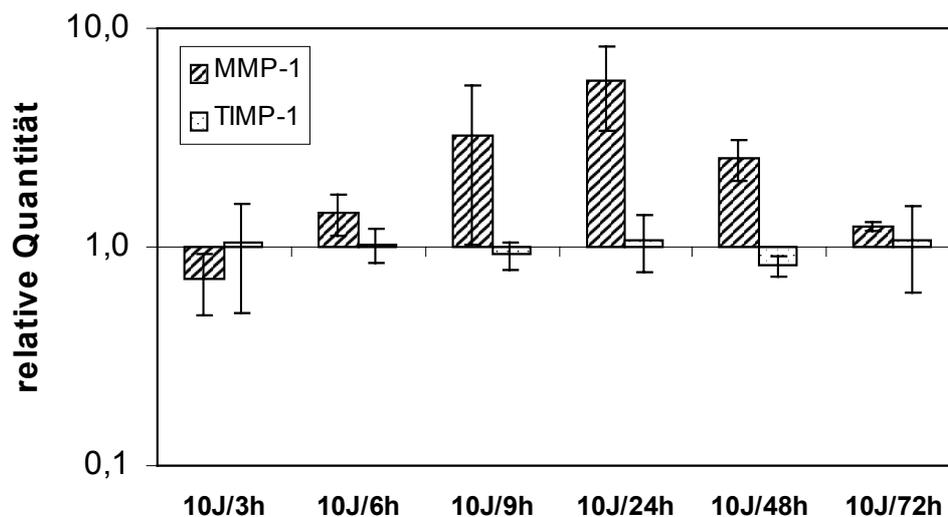


Abbildung 4.24: **Maximale MMP-1 Induktion in humanen HDF-Zellen 24 h nach Bestrahlung mit  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA und  $\pm$  keine Beeinflussung der TIMP-1 mRNA Expression**

Relative Quantifizierung der MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine entsprechende unbestrahlte Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 3$ ).

In dieser *in vitro* Time Course Studie konnte eine ähnliche Zeitabhängigkeit der MMP-1 mRNA Expression nach UV-Bestrahlung wie *in vivo* detektiert werden: 3 h nach der UVA-Exposition mit  $10 \text{ J/cm}^2$  wurde eine reprimierte MMP-1 Expression gemessen. Nach 6 h änderte sich diese Entwicklung, so dass nach 24 h ein Expressionsmaximum von 3,7-fach (Proband 4) bis zu 8,4-fach (Proband 5) erreicht wurde. 48 h nach der UVA-Bestrahlung war die MMP-1 Induktion für alle Fibroblasten wieder rückläufig und näherte sich nach 72 h dem unbestrahlten Zustand an. Generell wurden die hohen MMP-1 Induktionswerte einschließlich der großen Donorvariabilitäten wie *in vivo* nicht

erreicht, insbesondere aufgrund der im Vergleich hohen MMP-1 Ausgangslevel der unbestrahlten HDF-Proben. Für TIMP-1 konnte im Gegensatz zur *in vivo* Situation  $\pm$  gar keine Beeinflussung der mRNA Expression durch  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA ermittelt werden.

#### 4.3.2 UVA Dose Response Studie

Neben der Studie zur Zeitabhängigkeit wurde eine UVA Dose Response Studie *in vitro* durchgeführt. Dabei wurde gemäß der *in vivo* und *in vitro* Time Course Studien der 24 h Zeitpunkt mit der maximalen MMP-1 Induktion zur Probenentnahme ausgewählt. Die HDF-Zellen zweier Spender in unterschiedlichen Passagen (Tabelle 2.1, Proband 2 (Passage 10, 11 und 13) sowie Testperson 3 (Passage 5 und 7)) wurden mit verschiedenen UVA-Dosen bis zu  $20 \text{ J/cm}^2$  UVA bestrahlt, wobei alle Bestrahlungsexperimente in Triplikaten durchgeführt wurden. Im Anschluss wurde die MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR detektiert. Für MMP-1 ergaben sich in allen unbestrahlten und UV-exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 23,16 und 17,49, für TIMP-1  $C_T$ -Werte zwischen 17,85 und 15,52. Ebenso wie in der *in vitro* Zeitabhängigkeitsstudie wurden damit für MMP-1 und TIMP-1 deutlich kleinere  $C_T$ -Werte entsprechend eines höheren Genexpressionslevels als *in vivo* gemessen. Erneut lagen die größten Unterschiede in der basalen MMP-1 Expression der unbestrahlten *in vivo* bzw. *in vitro* Ansätze. Für die relative Quantifizierung von MMP-1 sowie TIMP-1 wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet, wobei erst auf das Housekeeping-Gen GAPDH und dann auf eine jeweils entsprechende unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator normiert wurde (siehe Abbildung 4.25).

Ab einer UVA-Dosis von  $4 \text{ J/cm}^2$  konnte eine Induktion der MMP-1 mRNA detektiert werden, die nach einer Bestrahlung mit  $16 \text{ J/cm}^2$  ihr Maximum erreichte. Die höchste MMP-1 mRNA Induktion konnte bei Proband 2 (Passage 11) mit 10,7-fach gemessen werden. Durchgehend wurden auch in dieser *in vitro* Dose Response Studie aufgrund der im Vergleich hohen MMP-1 Ausgangslevel der unbestrahlten HDF-Proben nicht die hohen MMP-1 Induktionen und großen Donorvariabilitäten der *in vivo* Studien beobachtet. Für TIMP-1 konnte erneut  $\pm$  keine Induktion der mRNA Expression durch UVA-Exposition mit Dosen bis zu  $20 \text{ J/cm}^2$  ermittelt werden.

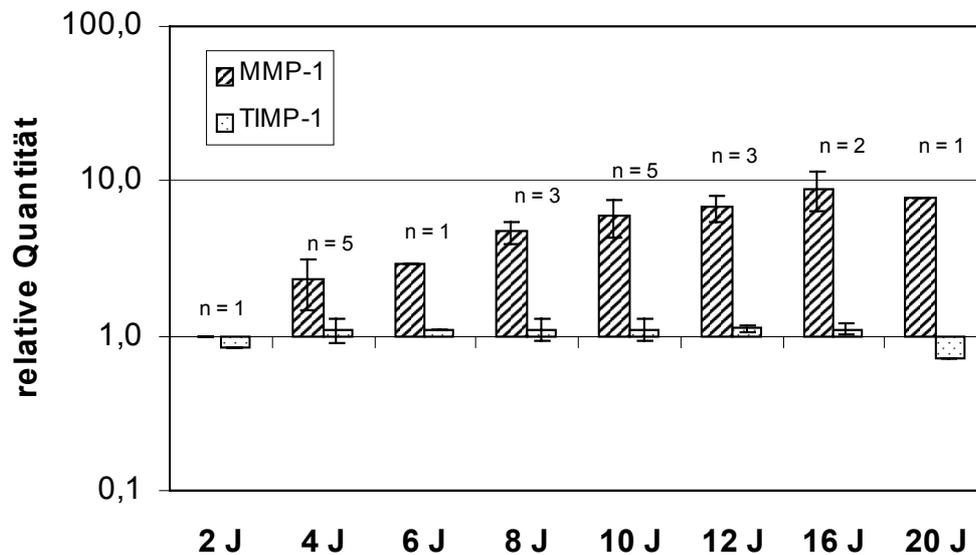


Abbildung 4.25: **UVA-Dosisabhängigkeit der MMP-1 Induktion in humanen HDF-Zellen 24 h nach der Bestrahlung und ± keine Beeinflussung der TIMP-1 mRNA Expression**

Relative Quantifizierung der MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine entsprechende unbestrahlte Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet.

Im Zuge der Genexpressionsuntersuchungen *in vitro* wurde die neu etablierte sensitive TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode mit der gängigen Northern-Technik verglichen. HDF-RNA, die aus mit 2-10 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlten Fibroblasten (Tabelle 2.1, Proband 1, 17. Passage) isoliert wurde, wurde sowohl mit der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR als auch mittels der Northern-Technik hinsichtlich ihrer MMP-1 mRNA Induktion analysiert. Dabei wurde für die relative Quantifizierung der MMP-1 mRNA, die mit Hilfe der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR detektiert wurde, die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode angewandt. Hierfür wurde zunächst auf die interne Referenz GAPDH und im Anschluss auf die unbestrahlte Kontrolle normiert. Bei der Northern-Analyse wurde ebenfalls erst auf das Housekeeping-Gen GAPDH und dann auf die unbestrahlte Kontrolle abgeglichen. Die Abbildung 4.26 zeigt, dass die Ergebnisse der beiden Methoden ungefähr im gleichen Bereich liegen und die gleichen Tendenzen aufweisen, siehe z. B. die leichte Abnahme der MMP-1 mRNA Expression bei 10 J/cm<sup>2</sup> im Vergleich zur mit 8 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlten Probe.

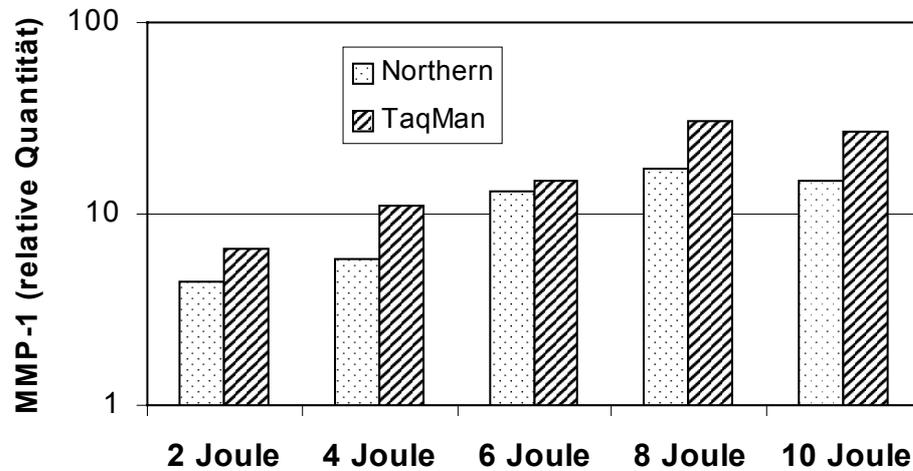


Abbildung 4.26: *Vergleich der Northern Technik mit der sensitiven TaqMan® RT-PCR Methode*  
 HDF-Zellen wurden mit UVA-Dosen bis zu 10 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt, und im Anschluss wurde die MMP-1 mRNA Expression sowohl mit der Northern als auch mit TaqMan® RT-PCR Methode analysiert. Es resultierten vergleichbare Ergebnisse in vitro.

### 4.3.3 Einfluss von $\alpha$ -Tocopherol

Um den Einfluss des Antioxidans  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) auf die MMP-1 mRNA Expression nach UVA-Exposition zu untersuchen, wurden HDF-Zellen (Tabelle 2.1, Spender Nummer 1, Passage 17, 19 und 22) für 24 h mit Vitamin E inkubiert und anschließend mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt. 24 h später wurde die RNA isoliert und die MMP-1 Expression mittels Northern analysiert, wobei nach der Normierung auf GAPDH auf die unbestrahlte, unbehandelte Kontrolle abgeglichen wurde. Als Vergleichsuntersuchungen wurden parallel dazu Fibroblasten ohne Vitamin E-Vorbehandlung mit 10 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt, oder die HDF-Zellen wurden nach der Inkubation mit dem Antioxidans nicht UV-exponiert. Die Abbildung 4.27 verdeutlicht, dass Vitamin E die MMP-1 Induktion nach UVA-Bestrahlung mit 10 J/cm<sup>2</sup> um rund 64 % senken kann (von  $7,51 \pm 5,41$  auf  $2,71 \pm 0,26$ ), wobei das Vitamin E selbst zu  $\pm$  keiner MMP-1 Induktion führt, siehe die unbestrahlte Vitamin E Kontrolle.

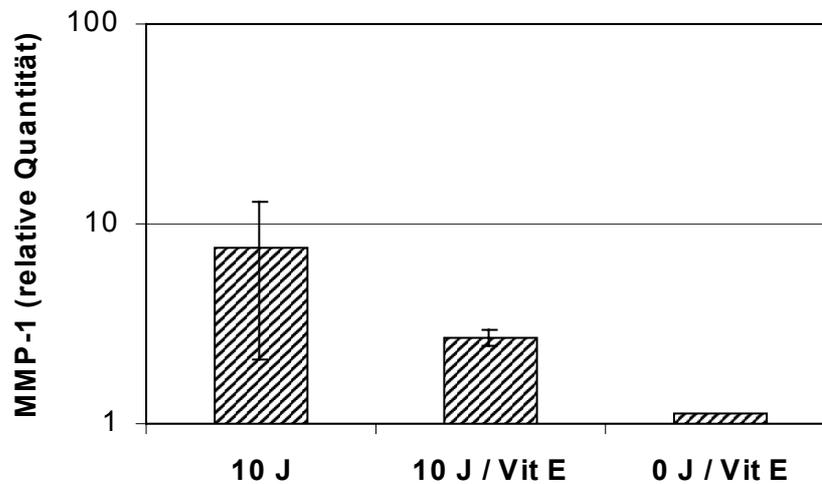


Abbildung 4.27: **Einfluss von Vitamin E auf die MMP-1 Genexpression nach UVA-Bestrahlung**

Relative Quantifizierung der MMP-1 mRNA Expression mittels Northern-Technik mit Normierung auf GAPDH und eine unbestrahlte, unbehandelte Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 3$ ).

Daneben wurde mit Hilfe des Neutralrot-Testes die Viabilität von HDF-Zellen (Tabelle 2.1, Spender Nummer 1, Passage 24), die unbehandelt mit UVA-Dosen von 2,5-10 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt oder vor der UVA-Exposition (10 J/cm<sup>2</sup>) mit 3 mM Vitamin E vorinkubiert wurden, in sechsfach Ansätzen getestet. Die Viabilität der unbehandelten, unbestrahlten Kontrollen wurde gleich 100 % gesetzt. Wie in der Abbildung 4.28 zu sehen, nimmt die Viabilität der Fibroblasten mit zunehmender Bestrahlungsintensität ab, so dass sie nach 10 J/cm<sup>2</sup> bei ca. 56 % liegt. Wurden die Zellen hingegen vor der UVA-Exposition mit Vitamin E vorinkubiert, entsprach die Viabilität nach der Bestrahlung mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA ungefähr dem Level der unbestrahlten, unbehandelten Kontrollen, also 100 %.

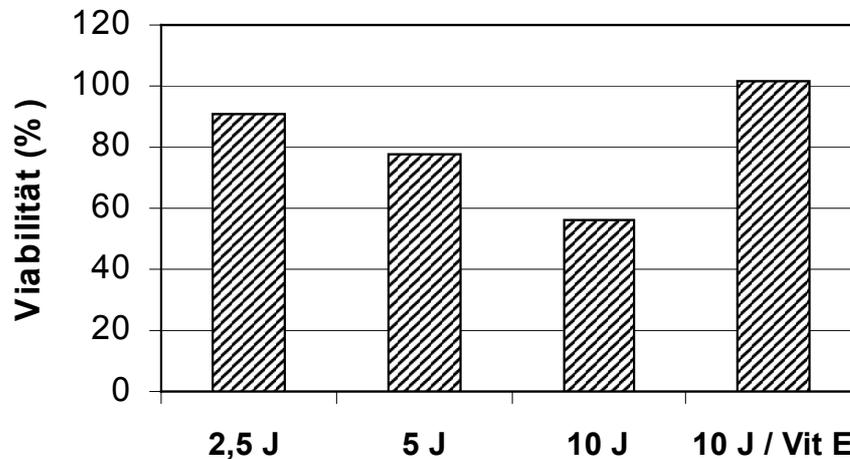


Abbildung 4.28: *Viabilität von HDF-Zellen nach UVA-Exposition ohne bzw. mit Vitamin E Vorinkubation*

Mittels Neutralrot-Test wurde eine dosisabhängige Abnahme der Viabilität von HDF-Zellen nach UVA-Exposition ermittelt. Dieses konnte durch eine Vorinkubation mit 3 mM Vitamin E bei einer UVA-Bestrahlung mit 10 J/cm<sup>2</sup> vollständig verhindert werden.

#### 4.3.4 Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

HDF-Zellen wurden in drei unabhängigen Versuchen (Tabelle 2.1, Spender 2 (Passage 13 und 14) sowie Proband 3 (Passage 6)) für 1 h mit 0,1 bzw. 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HDF-Medium oder PBS bei 37°C inkubiert, um den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies auf die MMP-1 bzw. TIMP-1 Genexpression zu untersuchen. Alle Ansätze wurden in Duplikaten durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden Fibroblasten mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt. Nach der RNA-Isolierung 24 h später wurde die MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR bestimmt. Für MMP-1 wurden in allen Proben, unbestrahlt oder UV-exponiert, unbehandelt oder mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert, C<sub>T</sub>-Werte zwischen 24,14 und 19,45 gemessen, für TIMP-1 C<sub>T</sub>-Werte zwischen 18,30 und 15,61. Für die relative Quantifizierung sowohl von MMP-1 als auch von TIMP-1 wurde die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet, wobei nach der Normierung auf GAPDH jeweils eine entspre-

chende unbestrahlte, unbehandelte Kontrolle als Kalibrator benutzt wurde (siehe Abbildung 4.29).

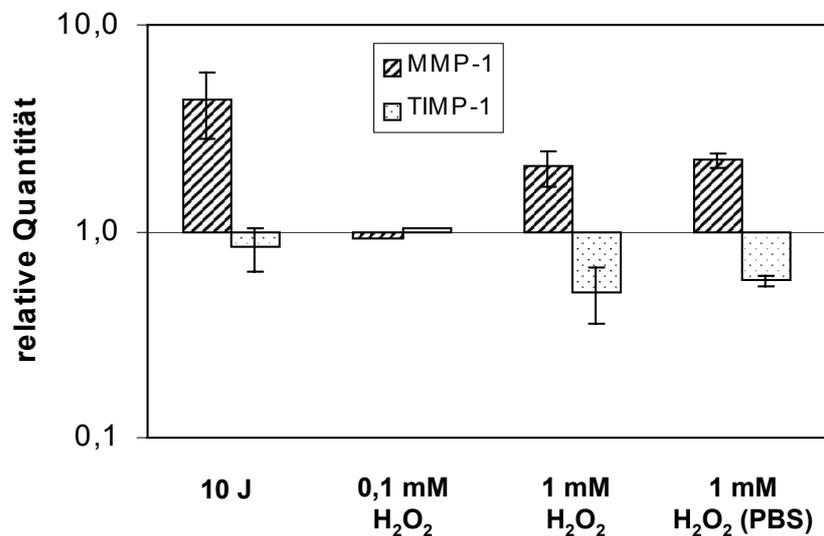


Abbildung 4.29: **1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verdoppelt die MMP-1 mRNA Expression und halbiert den TIMP-1 Genexpressionslevel**

Relative Quantifizierung der MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine entsprechende unbestrahlte Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD mit  $n = 3$  abgebildet.

0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte keinen signifikanten Effekt auf die MMP-1 bzw. TIMP-1 mRNA Expression. Die Inkubation mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hingegen führte, unabhängig davon, ob das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in HDF-Medium oder PBS verdünnt war, zu einer Verdopplung des MMP-1 mRNA Levels. Im Durchschnitt wurde bei 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine  $2,1 \pm 0,4$  (SD)-fache (für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im HDF-Medium) bzw.  $2,2 \pm 0,2$  (SD)-fache (für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS) MMP-1 Induktion gemessen. Im Vergleich dazu ergab die Bestrahlung mit  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA eine  $4,4 \pm 1,5$  (SD)-fach erhöhte MMP-1 mRNA Expression. Auf die TIMP-1 mRNA Expression hatte die Inkubation mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einen stärkeren Effekt als die UVA-Exposition. Die Inkubation mit der reaktiven Sauerstoffspezies führte ungefähr zu einer Halbierung der TIMP-1 Expression. Für das im HDF-Medium gelöste 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

ergab sich im Mittel eine  $0,5 \pm 0,15$  (SD)-fache TIMP-1 Expression, für das im PBS verdünnte  $H_2O_2$  eine  $0,6 \pm 0,04$  (SD)-fache.

#### 4.4 Quantifizierung von MMP-1 und TIMP-1 Protein *in vitro*

Um neben den Genexpressionserhebungen *in vivo* und *in vitro* Hinweise bezüglich der entsprechenden Proteinexpressionen zu erhalten, wurden die extrazellulären Proteine MMP-1, TIMP-1 sowie der Komplex aus MMP-1 und TIMP-1, der durch TIMP-1 inaktiviertes MMP-1 Protein detektiert, mit Hilfe der entsprechenden ELISA-Systeme in einer UVA-Zeitabhängigkeitsstudie *in vitro* untersucht. HDF-Zellen (Tabelle 2.1, Spender 6 (Passage 3), 7 (Passage 8) und Proband Nummer 8 (Passage 5)) wurden mit  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA (326-402 nm) bestrahlt und die Zellüberstände mit den extrazellulären Proteinen zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 160 h nach der UV-Exposition für die Analyse mittels ELISA abgenommen. Zusätzlich wurden die Zellzahlen einer jeden Zellkulturschale gezählt, um nach der ELISA-Messung die detektierten Proteine darauf zu beziehen. Alle Bestrahlungsexperimente wurden in Triplikaten durchgeführt. In den unbestrahlten und UV-exponierten Proben wurden für MMP-1 Proteinmengen von 0,04-1,98 pg/Zelle, für TIMP-1 von 0,03-0,68 pg/Zelle und für den MMP-1/TIMP-1 Komplex von 0-0,02 pg/Zelle bestimmt. Für die relative Quantifizierung der Ansätze wurde jeweils auf eine entsprechende unbestrahlte Kontrolle normiert (siehe Abbildung 4.30). Eine maximale MMP-1 Proteininduktion von  $6,02 \pm 3,12$  (SD)-fach konnte 96 h nach der UVA-Bestrahlung mit  $10 \text{ J/cm}^2$  gemessen werden. Die am stärksten reprimierte TIMP-1 Proteinexpression von  $0,75 \pm 0,13$  (SD)-fach wurde nach 72 h und die minimale MMP-1/TIMP-1 Komplex Proteininduktion von  $1,73 \pm 0,24$  (SD)-fach nach 96 h ermittelt. Damit wurden z. B. bei den Fibroblasten des Spenders 7 zum Zeitpunkt 96 h nach der UVA-Exposition nur 1 % des detektierten MMP-1 Proteins im Komplex mit TIMP-1, also inaktiviert, detektiert (0,63 pg/Zelle MMP-1 vs. 0,006 pg/Zelle MMP-1/TIMP-1 Komplex). Demgegenüber stand eine TIMP-1 Proteinmenge (0,19 pg/Zelle) von 30 % des MMP-1.

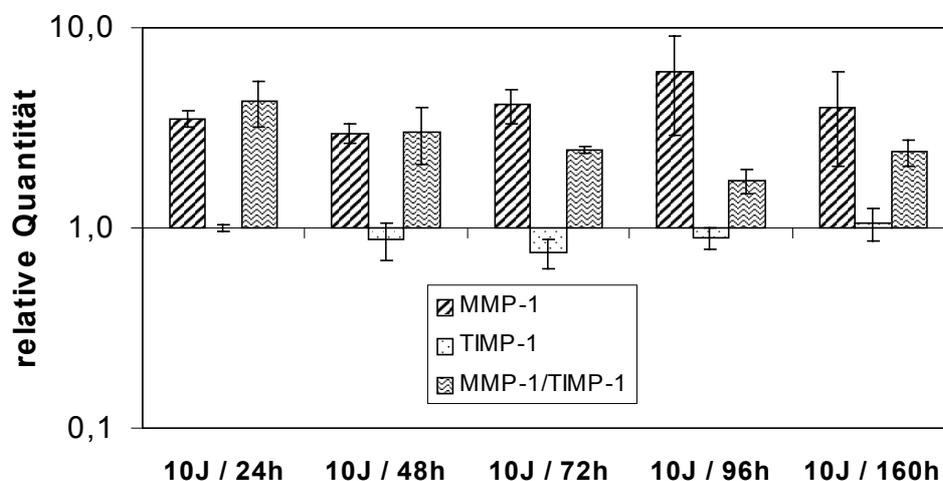


Abbildung 4.30: **Zeitabhängige MMP-1, TIMP-1 und MMP-1/TIMP-1 Komplex Proteinexpression nach Bestrahlung mit 10 J/cm<sup>2</sup> UVA**

Quantitativer Proteinnachweis mittels ELISA-Technik und Bezug auf die Zellzahl sowie eine entsprechende unbestrahlte Kontrolle. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte dargestellt  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).

#### 4.5 Relative Quantifizierung von Elastin und Elastase mRNA *in vivo*

Parallel zur MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression wurde auch die Genexpression der Hautalterungsmarker Elastin und Elastase nach SSR-Einfluss *in vivo* untersucht. Für jede TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Reaktion wurden 50 ng der aus den Stanzbiopsien isolierten Total-RNA eingesetzt und jeweils die optimierten, System-spezifischen Reaktionsbedingungen verwendet. Alle Reaktionen wurden in Triplikaten angesetzt und mit Hilfe des TaqMan<sup>®</sup> EZ RT-PCR Kits im ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System durchgeführt.

#### 4.5.1 SSR Time Course Studie

Die Proben der Zeitabhängigkeitsstudie, in der sechs Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 1-6) mit 2 MED SSR bestrahlt und die Biopsien zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 48 h nach der UV-Exposition genommen wurden, dienten neben der Analyse der MMP-1 und TIMP-1 mRNA auch für die Untersuchung der Elastin und Elastase Genexpression.

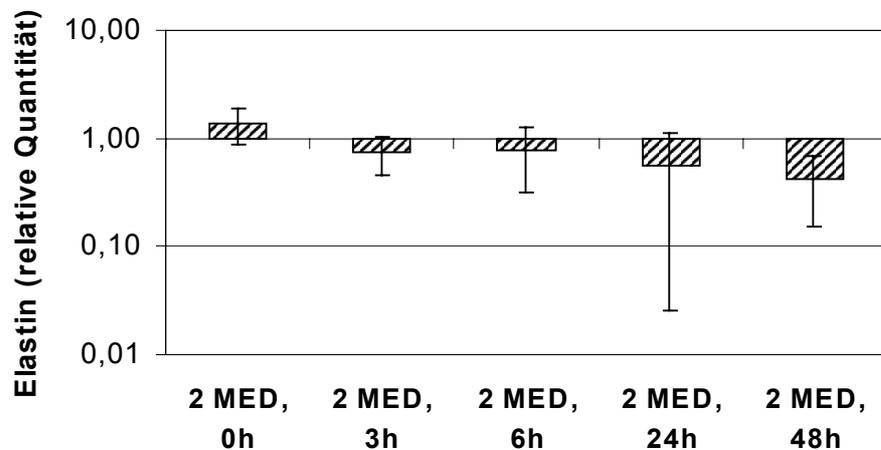


Abbildung 4.31: **Zunehmend reprimierte Elastin Expression in humaner Haut bis zu 48 h nach Bestrahlung mit 2 MED SSR**

Relative Quantifizierung der Elastin mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 6$ ).

Für Elastin wurden in den unbestrahlten und UV-exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 25,6 und 22,0 gemessen, und die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode für die relative Quantifizierung angewandt. Dabei wurde nach der Normierung auf GAPDH die unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator benutzt (siehe Abbildung 4.31). Nach der Bestrahlung mit 2 MED SSR zeigten alle Probanden in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der Probenentnahme eine tendenziell zunehmend reprimierte Elastin mRNA Expression: Sofort nach der UV-Exposition der Haut konnten für Elastin bis zu 2,27-fach induzierte mRNA Level

gemessen werden (Proband 4). Mit Ausnahme von Proband 3 wiesen alle Testpersonen 48 h nach Bestrahlung die größte reprimierte Elastin mRNA Expression mit Werten zwischen 0,69-facher (Proband 5) und 0,04-facher (Proband 2) Genexpression auf.

Für Elastase wurden in den unbestrahlten und mit 2 MED SSR exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 28,1 und 23,8 gemessen. Bei der relativen Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode, wobei auf GAPDH normalisiert und der 0 MED  $C_T$ -Wert als Kalibrator verwendet wurde, konnte wie für das Elastin eine verstärkte reprimierte mRNA Expression mit späterer Probenentnahme detektiert werden (siehe Abbildung 4.32): Direkt nach der Bestrahlung mit 2 MED SSR wurden für Elastase bis zu 1,74-fach induzierte mRNA Level gemessen (Proband 6). Entsprechend der Elastin Expression wiesen alle Testpersonen mit Ausnahme von Proband 3 48 h nach der UV-Exposition die größte reprimierte Elastase mRNA Expression mit Werten zwischen 0,25-facher (Proband 1) und 0,06-facher (Proband 4) Genexpression auf. Beim Vergleich der Elastin- und Elastase mRNA Expression konnten innerhalb der einzelnen Testpersonen deutliche Parallelen festgestellt werden.

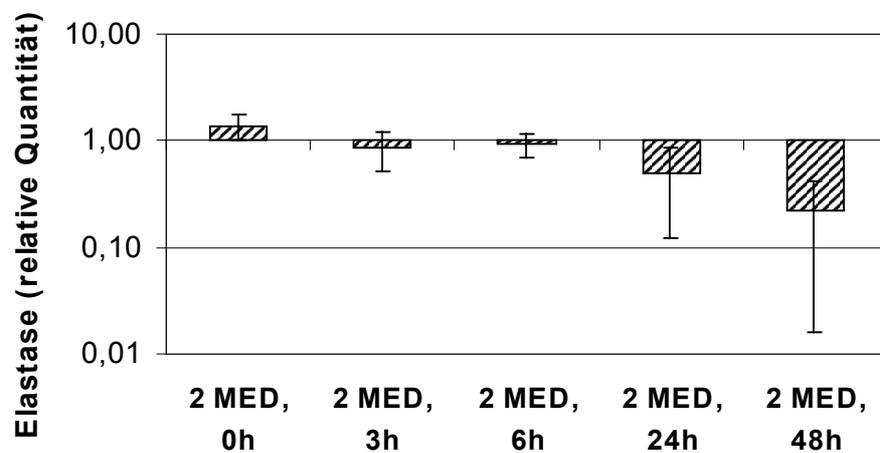


Abbildung 4.32: **Zunehmend reprimierte Elastase Expression in humaner Haut bis zu 48 h nach Bestrahlung mit 2 MED SSR**

Relative Quantifizierung der Elastase mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 6$ ).

#### 4.5.2 SSR Dose Response Studie

Parallel zur MMP-1 und TIMP-1 Expression wurden die Hautproben der SSR-Dosisabhängigkeitsstudie, in der sechs Probanden (Tabelle 2.2, Spendernummer 7-12) mit SSR-Dosen zwischen 0,5 und 4 MED bestrahlt und die Biopsien 24 h später genommen wurden, hinsichtlich ihrer Elastin und Elastase mRNA Expression untersucht.

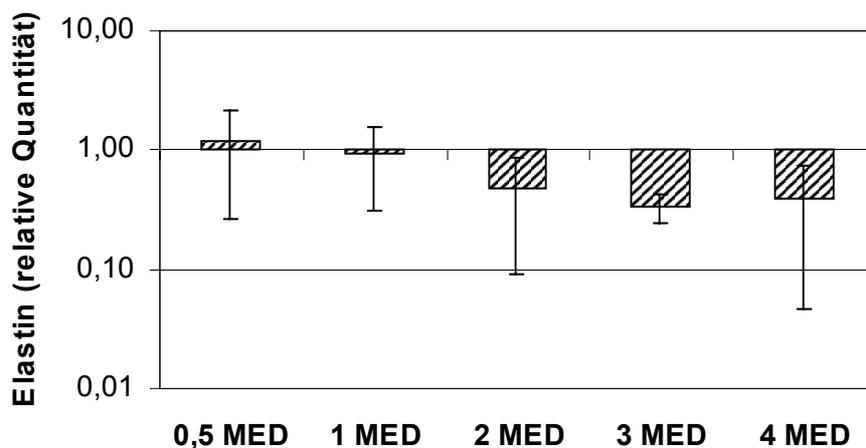


Abbildung 4.33: **SSR-Dosisabhängigkeit der Elastin Expression in humaner Haut 24 h nach der Bestrahlung**

Relative Quantifizierung der Elastin mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$ SD abgebildet ( $n = 6$ ).

Für Elastin wurden in den unbestrahlten und UV-exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 26,8 und 21,7 gemessen. Unter dem Normalisieren auf das Housekeeping-Gen GAPDH und der Verwendung des 0 MED  $C_T$ -Wertes als Kalibrator wurde für jede Testperson die relative Expression von Elastin mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt und der Mittelwert berechnet (siehe Abbildung 4.33). Allgemein konnte der Trend beobachtet werden, dass mit höherer UV-Exposition stärker reprimierte Elastin mRNA Level auftraten. Alle Testpersonen wiesen nach der Bestrahlung mit  $\geq 2$  MED SSR ein Elastin mRNA Repressionsmaximum in der Größenordnung von 0,44-fach (Proband

10) bis 0,09-fach (Proband 9) bei 4 MED auf. Die höchste Elastin Induktion bzw. geringste Repression lag bei Proband 7 (2,13-fach) nach Bestrahlung mit 0,5 MED vor. Für Elastase wurden in den unbestrahlten und UV-exponierten Proben  $C_T$ -Werte zwischen 27,5 und 23,2 gemessen und für die relative Quantifizierung mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet. Dabei wurde nach der Normierung auf GAPDH die unbestrahlte Kontrolle als Kalibrator benutzt (siehe Abbildung 4.34). Nach der Bestrahlung mit SSR-Dosen von 0,5-4 MED (24 h) konnten für die Elastase Expression deutlich größere individuelle Unterschiede als bei der Datenerhebung für die Elastin mRNA und den Time Course für die Elastase Genexpression ermittelt werden. Trotzdem ließen sich generell auch hier für die Elastase die geringsten mRNA Expressionen bei hohen SSR-Dosen bestimmen: Drei der Testpersonen wiesen ein Elastase mRNA Expressionsminimum von 1,04-fach (Proband 9) bis 0,17-fach (Proband 12) bei 4 MED auf. Die höchste Elastase Expression lag bei Proband 9 mit 6,8-facher Induktion bei 1 MED vor. Durch diesen hohen Induktionsfaktor ergab sich auch für die gemittelten Werte aller Probanden ein Elastase Induktionsmaximum bei 1 MED von  $2,1 \pm 2,7$  (SD).

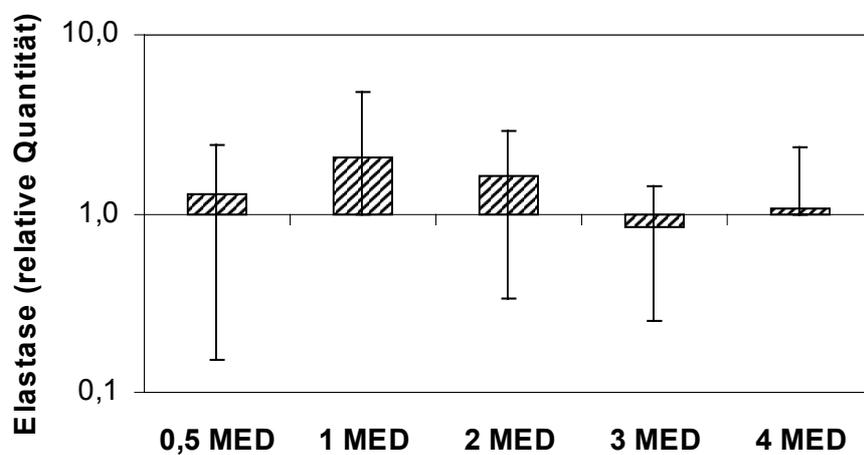


Abbildung 4.34: **SSR-Dosisabhängigkeit der Elastase Expression in humaner Haut 24 h nach der Bestrahlung**

Relative Quantifizierung der Elastase mRNA Expression mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode mit Normierung auf das Housekeeping-Gen GAPDH und eine unbestrahlte Kontrolle. Die Reaktionen wurden als Triplikate pipettiert, die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SD abgebildet ( $n = 6$ ).

---

Wie schon bei der Zeitabhängigkeitsstudie beschrieben lag auch bei dieser Untersuchung in der Regel eine deutliche Korrelation der Elastin und Elastase mRNA Expression innerhalb der einzelnen Testpersonen vor.

## 5 Diskussion

### 5.1 MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression *in vivo*

UV-bedingte Hautalterung (Photoageing) ist u. a. durch einen Abbau und eine zunehmende Desorganisation der dermalen Kollagenfasern gekennzeichnet (Bernstein et al. 1996). 1996 wurde von Fisher et al. die Hypothese aufgestellt, dass Matrixmetalloproteinasen in den Photoageing-Prozess involviert sind, da diese durch UV-Licht induziert dermales Kollagen degradieren können (Fisher et al. 1997, 1998). Die Gruppe um Fisher beschrieb eine Erhöhung der Genexpression von MMP-1, -3 und -9 nach UV-Exposition *in vivo*, wobei die parallel gemessenen Induktionen der Proteinexpressionen und Aktivitäten die der entsprechenden mRNA Expressionen spiegelten.

Die Fibroblasten Kollagenase (MMP-1) gehört zu der Gruppe der Helikasen, die Substratspezifität für natives, fibrilläres Kollagen vom Typ I, III und V in der Haut besitzen (Kähäri und Saarialho-Kere 1997). Diese Helikasen spielen beim Photoageing eine besondere Rolle. Ohne die durch sie bedingte Spaltung des tripelhelikalen Typ I und III Kollagens können die extrem stabilen Kollagenfibrillen der Dermis nicht in thermolabile Fragmente abgebaut werden (Kirsner 2001). Die Aktivität dieser Enzyme bestimmt damit den Abbau des fibrillären Kollagens.

In dieser Arbeit wurde erstmals der solare UV-Einfluss auf die individuelle MMP-1 Genexpression *in vivo* mit Hilfe einer quantitativen Methode, der sensitiven TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR, untersucht (Lahmann et al. 2001 a).

Die hohe Sensitivität der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Technik resultiert aus der hohen Effizienz der Reaktionen, die durch die kleinen Amplifikationsprodukte (< 100 bp) bedingt sind. Damit ist es möglich, auch geringe Mengen an Untersuchungsmaterial wie die in diesen Studien verwendeten humanen Stanzbiopsien zu analysieren. Zusätzlich erlaubt die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Technik eine quantitative Analyse, da sie im Gegensatz zu den herkömmlichen PCR-Methoden keine Endpunktbestimmungen durchführt, sondern die Amplifikate im exponentiellen Bereich der PCR-Reaktion ermittelt.

Da die proteolytische Aktivität der MMP-1 durch den endogenen Inhibitor TIMP-1 reguliert wird, der die aktive Form der MMP-1 durch die Bildung von festen, nicht-kovalenten 1:1 Komplexen inhibiert (Gomis-Rüth et al. 1997), wurde parallel zur MMP-1 mRNA auch die Genexpression von TIMP-1 mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR analysiert.

### 5.1.1 Erhöhte MMP-1 mRNA Expression bei Rauchern

Im Zuge der Untersuchung des Einflusses von solarem UV auf die MMP-1 Genexpression in humaner Haut *in vivo* mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR wurden klare Unterschiede in den unbestrahlten Kontrollbiopsien der individuellen Probanden gemessen. Ein Teil der Testpersonen wies sehr wenig oder überhaupt keine MMP-1 mRNA auf, der andere Teil zeigte eine bereits deutlich erhöhte MMP-1 mRNA Expression in den nicht UV-exponierten Proben.

Es ist bekannt, dass neben der UV-Strahlung der Sonne auch das Rauchen stark zu einer frühzeitigen Hautalterung, insbesondere im Gesicht, beiträgt (Ernster et al. 1995). Die molekularen Grundlagen der Faltenentstehung durch das Rauchen sind jedoch noch weitestgehend ungeklärt. Um zu überprüfen, ob die probandenabhängigen Schwankungen der MMP-1 mRNA-Level in den unbestrahlten Stanzbiopsien im Zusammenhang mit dem Rauchverhalten der Testpersonen stehen, wurden alle 39 Probanden rückwirkend nach ihrem Raucherstatus befragt und die Daten einander gegenübergestellt.

Für die MMP-1 mRNA Expression in den unbestrahlten Stanzbiopsien ergab sich eine signifikante Assoziation mit dem Rauchen ( $p = 0,007$ ). Im Gegensatz dazu konnte bei der TIMP-1 Genexpression ( $p = 0,675$ ) und auch erwartungsgemäß für das Housekeeping-Gen GAPDH ( $p = 0,101$ ) kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern ermittelt werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen *in vitro* Studien. Yin et al (2000) konnten in HDF-Zellen eine dosisabhängige MMP-1 mRNA Induktion sowie eine entsprechende Erhöhung des MMP-1 Proteins durch Zigarettenrauchextrakt detektieren. Im Gegensatz dazu fanden sie - wie in dieser *in vivo* Untersuchung - keine Beeinflussung der TIMP-1 mRNA Expression *in*

*vitro*. Ebenso beschrieben Morimoto et al. (1997) in Lungen von Ratten, die *in vivo* Zigarettenrauch ausgesetzt wurden, eine erhöhte MMP-1 mRNA Expression.

Durch die hier vorliegende Untersuchung konnte zum ersten Mal ein Effekt des Rauchens auf die MMP-1 mRNA Induktion in menschlicher Haut *in vivo* aufgezeigt werden (Lahmann et al. 2001 b). Eine Erhöhung der MMP-1 mRNA Expression ohne Induktion ihres spezifischen Inhibitoren TIMP-1 durch Zigarettenrauch könnte Ursache dafür sein, dass im zunehmenden Maße ein Ungleichgewicht zwischen Biosynthese und Degradation der Extrazellulären Matrix der menschlichen Dermis auftritt. Dieses Ungleichgewicht könnte zu einer abnormalen Akkumulation in der Extrazellulären Matrix führen, die in einer reduzierten Elastizität der Haut mit Faltenbildung resultieren könnte (Uitto und Bernstein 1998). Da Raucher häufig älter aussehen, als sie eigentlich sind (Kadunce et al. 1991), könnte somit eine erhöhte MMP-1 Basalexpression die molekulare Grundlage für die frühzeitige Hautalterung der Raucher darstellen (Lahmann et al. 2001 b).

Diese Erkenntnisse sind von wichtiger gesundheitspolitischer Bedeutung, denn neben der vorzeitigen Alterung der Haut ist das Tabakrauchen auch für weltweit mehr als 3 Millionen Todesfälle pro Jahr verantwortlich. So wird es insbesondere mit Lungenkarzinomen, Emphysemen (Luftansammlungen im Gewebe), chronischer Bronchitis, kardiovaskulären Erkrankungen und peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen ursächlich in Verbindung gebracht (Haustein und Anderegg 2000). In unserer Gesellschaft, in der das Schönheitsbedürfnis eine steigende Bedeutung gewinnt, hätte ein Meiden des Zigarettenrauchens wegen der vorzeitigen Alterung der Haut zudem auch einen positiven Effekt auf die Gesundheit.

### **5.1.2 UV-induzierte MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression *in vivo***

Für die Analyse des Effektes von solarem UV auf die MMP-1 und TIMP-1 Genexpression in humaner Haut *in vivo* mittels TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR wurde eine SSR-Quelle mit einem Anteil von 91,5 % UVA und 8,5 % UVB verwendet, die somit einen direkten Bezug zu der auf die Erdoberfläche treffenden solaren UV-Strahlung gemäß COLIPA-Norm hat.

In zahlreichen UV-Untersuchungsreihen wurde GAPDH bereits als Housekeeping-Gen eingesetzt (Lee et al. 1998, Enk et al. 1996, Krutmann et al. 1994) und wird *in vitro* in epidermalen Zellen nicht durch UV induziert (persönliche Kommunikation Dr. G. M. Boyle, Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Australia ). Auch die hier durchgeführten UV-Studien verdeutlichen stabile Level von GAPDH nach UV-Exposition und bestätigen damit seinen Einsatz als Housekeeping-Gen.

Die Studie, in der Proben vom selben Probanden in Zweifach-Ansätzen analysiert wurden, zeigte bei den Duplikaten für alle untersuchten Testpersonen eine gute Reproduzierbarkeit. Das gilt somit für das UV-Bestrahlungsprotokoll und auch für die mRNA-Detektionsmethode, die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR.

In der Time Course Studie konnte bei allen Probanden ein MMP-1 Expressionsmaximum 24 h nach der Bestrahlung mit 2 MED SSR bestimmt werden. Dieses steht in Übereinstimmung mit anderen publizierten Daten. So ermittelten Scharffetter et al. (1991) und Herrmann et al. (1993) *in vitro* eine maximale MMP-1 mRNA Expression in Fibroblasten 24 h nach UVA-Exposition. Fisher et al. (1996) untersuchten drei verschiedene MMPs (MMP-1, -3 und -9) nach UVB-Bestrahlung *in vivo* und zeigten eine maximale MMP-1 Genexpression zwischen 16 h und 24 h. Im Speziellen war MMP-1 70-fach nach 16 h induziert. Die hohen individuellen MMP-1 mRNA Induktionen von bis zu 34000-fach, die in dieser Studie zur Zeitabhängigkeit gemessen werden konnten, wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Ein Grund hierfür könnte die Verwendung von mRNA-Detektionsmethoden sein, die weitaus weniger sensitiv als die hier eingesetzte TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR sind. So führten z. B. Fisher et al. (1996) ihre Genexpressionsuntersuchungen weder mittels quantitativer Methoden noch für individuelle Probanden durch. Da *in vivo* UV-bestrahltes Hautmaterial in nur sehr limitierter Menge verfügbar ist, vereinigten sie die zu untersuchende RNA mehrerer Probanden und analysierten sie mit Hilfe der Northern-Technik. Durch das Vereinigen des Untersuchungsmaterials wurden insbesondere die großen individuellen Schwankungen der basalen MMP-1 mRNA Level verwischt. Somit konnten die starken MMP-1 Induktionen der Probanden, die im unbestrahlten Zustand keine MMP-1 mRNA exprimierten (i. d. R. die Nichtraucher), nicht gemessen werden. Um die UV-induzierten MMP-Induktionen einzelner Testpersonen zu ermitteln, wurde dann später nur die semi-quantitative Technik der *in situ* Hybridisierung angewendet (Fisher et al. 1997).

Alle Probanden des hier durchgeführten Time Courses zeigten bis auf einen 3 h nach der Bestrahlung im Vergleich zu den Proben, die direkt im Anschluss an die UV-Exposition genommen wurden, reduzierte MMP-1 Genexpressionslevel. Dies könnte ein möglicher Hinweis auf eine frühe schwache und eine spätere, 24 h nach der Bestrahlung, deutliche MMP-1 Antwort sein.

Auf Grund der Ergebnisse des Time Courses erfolgte die Probenentnahme für eine Dose Response Studie 24 h nach der Bestrahlung mit 0,5-4 MED. In dieser Untersuchungsreihe konnte ein Trend für eine erhöhte MMP-1 mRNA Induktion nach erythemalen Dosen, also  $\geq 1$  MED, gemessen werden. Eine deutliche Erhöhung der MMP-1 mRNA Expression bis zu 55000-fach resultierte aber erst aus einer Bestrahlung mit SSR-Dosen von  $\geq 2$  MED. Im Allgemeinen war die MMP-1 Antwort bei 2 MED – unabhängig vom Raucherstatus – gesättigt. Eine SSR-Exposition mit 3 MED oder 4 MED ergab somit keine weitere Erhöhung der MMP-1 Genexpression. Die großen Donorvariabilitäten in der MMP-1 Induktion resultierten hauptsächlich aus den deutlichen Unterschieden der MMP-1 Level in den unbestrahlten Kontrollen, auf den der Raucherstatus der Spender der Stanzbiopsien Einfluss hat. Diese Befunde unterscheiden sich klar von den von Fisher et al. (1996) erhobenen *in vivo* Daten, die bisher als Lehrbuchmeinung galten. Diese Gruppe zeigte zwar keine mRNA Daten, aber ermittelte eine Induktion des MMP-1 Proteins und der Aktivität schon nach einer Bestrahlung mit suberythemalen ( $\geq 0,01$  MED) UVB-Dosen sowie ein MMP-1 Maximum nach 1 MED. Der Grund für diese Differenzen könnte wiederum auf die nicht quantitativen, weniger sensitiven Bestimmungsmethoden zurückzuführen sein. Außerdem benutzten Fisher et al. bei allen Experimenten UV-Quellen, die keinen direkten Bezug zu der auf die Erdoberfläche treffenden solaren UV-Strahlung haben. Ihre Lampen emittierten entweder reines UVB oder „Solar Simulated Radiation“ (290-800 nm) mit einem viel zu hohen Anteil des energiereichen UVB. Ihre SSR-Quellen emittierten 47 % UVB, 27 % UVA und 26 % sichtbares Licht, obwohl in der Regel entsprechend der COLIPA-Norm der solare UVB-Anteil ungefähr ein Zehntel des UVA-Anteils beträgt. Bei der Entwicklung künftiger Lichtschutzkonzepte sollten daher die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, die von biologischer Relevanz sind, bedacht werden.

Der spezifische Inhibitor TIMP-1 reguliert die Aktivität von MMP-1 und den meisten anderen MMPs außer MT1-MMP und MMP-2 (Kähäri und Saarialho-Kere 1997). Die

SSR-Studie zur Zeitabhängigkeit zeigte im Allgemeinen ein Maximum der TIMP-1 mRNA Expression nach 24 h. Die Dose Response Studie ergab eine Sättigung der TIMP-1 Antwort zwischen 3 MED und 4 MED. In der einzigen anderen bisher veröffentlichten *in vivo* Untersuchungsreihe beschrieben Fisher et al. (1997) entsprechend ein TIMP-1 Expressionsmaximum 24 h nach der Bestrahlung von drei Probanden mit 2 MED SSR (290-800 nm), wobei die TIMP-1 Proteindaten die der mRNA spiegelten. Allerdings demonstrierte die Arbeitsgruppe im Unterschied zu der hier vorliegenden Untersuchung eine signifikante TIMP-1 Proteininduktion schon ab einer Dosis von 0,1 MED mit einem Maximum von ca. 3-fach bei 1 MED, ähnlich wie für die MMP-1. Publierte *in vitro* Studien zeigten in Fibroblasten keine Beeinflussung der TIMP-1 mRNA Expression nach UVA-Bestrahlung (Herrmann et al. 1993) oder nur eine geringe Induktion von weniger als 2-fach des TIMP-1 Proteinlevels nach UVA-Exposition (Petersen et al. 1992). Vergleichbare TIMP-1 mRNA Induktionswerte bis zu 1,9-fach wurden von Brenneisen et al. (1996) für UVB-bestrahlte Fibroblasten veröffentlicht. Wie für die MMP-1 Genexpression sind die in dieser Arbeit ermittelten hohen Induktionsraten von bis zu 16-fach für die TIMP-1 mRNA Expression bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Die hier vorliegenden mRNA Daten weisen auf eine fehlende Korrelation zwischen der MMP-1 und TIMP-1 mRNA Induktion nach SSR-Bestrahlung hin (Lahmann et al. 2001 a). Während für MMP-1 im Allgemeinen starke Induktionen sowie deutliche individuelle Unterschiede (von bis zu  $\geq 100$ -fach) ermittelt werden konnten, wurden im Gegensatz dazu für TIMP-1 eher geringere und konsistentere Induktionen gemessen. Diese gestörte Balance zwischen UV-induziertem MMP-1 und TIMP-1 könnte wie beim Rauchen an dem zunehmenden Abbau des dermalen Kollagens und damit am Photoaging beteiligt sein.

In der Epidermis-Dermis Trennstudie wurden die beiden Kompartimente der Haut mittels Hitze separiert, da durch diese Technik Cross-Kontaminationen zwischen Epidermis und Dermis verhindert werden können (Wilkinson und Walsh 1974). 2 MED SSR resultierten in einer deutlichen Induktion der dermalen (bis 850-fach) und epidermalen (bis 1300-fach) MMP-1 mRNA Expression. Diese Ergebnisse bestätigen die *in situ* Hybridisierungsexperimente von Fisher et al. (1997) und können sie zudem quantifizieren. So detektierten Fisher et al. gleichermaßen in der Dermis einen geringeren Level an

UV-induzierter MMP-1 mRNA als in der Epidermis. Die Bedeutung dieser großen epidermalen MMP-1 Induktion im dermalen Photoaging-Prozess erscheint unklar. Allerdings könnte das in der Epidermis synthetisierte MMP-1 Protein durch die Basalmembran geschleust und in der Dermis aktiviert werden, um dann dermales Kollagen zu degradieren. Die Basalmembranzone zwischen Epidermis und Dermis erlaubt einen Austausch von Proteinen zwischen diesen beiden Kompartimenten (Kazama et al. 1988). Im Gegensatz zum MMP-1 konnte eine Erhöhung der TIMP-1 Genexpression durch SSR-Bestrahlung nur in der Dermis, nicht aber in der Epidermis gemessen werden. Damit wird die TIMP-1 mRNA nur dort durch UV induziert, wo das TIMP-1 Protein aktiviertes MMP-1 Protein inhibiert, nämlich in der Dermis, dort wo die Kollagenfasern lokalisiert sind (Lahmann et al. 2001 a).

Die hier diskutierten SSR-Studien haben einen direkten Bezug zu der auf die Erdoberfläche treffenden solaren UV-Strahlung, sagen jedoch nichts über die relativen Effekte der UVB- bzw. UVA-Strahlung aus. Insbesondere in den älteren Publikationen wird UVA häufig als Hauptursache des Photoaging beschrieben, da es besser und tiefer bis in die Dermis penetrieren kann. So ermittelten Petersen et al. (1992) in HDF-Zellen nur durch UVA-Exposition eine Induktion der MMP-1 mRNA sowie des Proteins. Sie konnten aber keinen Effekt auf die MMP-1 Expression durch das kürzerwellige, energiereichere UVB (0-100 mJ/cm<sup>2</sup>, 280-320 nm) messen. Im Unterschied dazu detektierten sowohl Brenneisen et al. (1996) *in vitro* (200 mJ/cm<sup>2</sup>, 300-320 nm), als auch Fisher et al. (1996) *in vivo* (2 MED ≤ 100 mJ/cm<sup>2</sup>) eine durch UVB-induzierte MMP-1 mRNA und Proteinexpression. Weitere *in vivo* Daten zur Wellenlängenabhängigkeit der menschlichen Hautalterung sind allerdings nicht beschrieben. Daher wurde im Anschluss an die SSR-Studien der Einfluss von UVA II (340–400 nm), bzw. UVB (300 nm) allein auf die mRNA Expression von MMP-1 und TIMP-1 *in vivo* untersucht.

Bei der UVA-Studie - UVA stellt mit über 90 % den Hauptanteil des SSR dar - konnte wie bei den SSR-Untersuchungsreihen eine erhöhte MMP-1 und TIMP-1 mRNA Induktion erst nach erythemalen Dosen, also ≥ 1 MED UVA, 24 h nach der Bestrahlung gemessen werden. Entsprechend resultierte eine deutliche Induktion der MMP-1 mRNA Expression von bis zu 460000-fach und eine Erhöhung der TIMP-1 Genexpression von bis zu 17-fach erst aus einer Bestrahlung mit UVA-Dosen von ≥ 2 MED. Diese Induk-

tionswerte bei 2 MED UVA entsprachen in etwa den erhöhten MMP-1 und TIMP-1 mRNA Niveaus nach der Exposition mit 2 MED SSR.

In der UVB-Studie waren die MMP-1 Ergebnisse der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR, die C<sub>T</sub>-Werte, im Allgemeinen weitaus weniger homogen als die der UVA- und SSR-Studien. Dieses könnte u. a. auf den experimentellen Aufbau der Studie zurückzuführen zu sein: Die UVB-bestrahlten Areale des Gesäßes hatten im Gegensatz zu den UVA- und SSR-exponierten (1 cm<sup>2</sup>) nur einen Durchmesser von 5 mm und waren somit nur minimal größer als die im Anschluss an die Bestrahlung genommenen Biopsien mit einem Durchmesser von 4 mm. Zudem könnten die sehr kurzen UVB-Bestrahlungszeiten auf eine mögliche Fehlerquelle schließen lassen. Generell konnte jedoch auch in dieser Untersuchungsreihe eine ähnliche MMP-1 und TIMP-1 mRNA Antwort nach UVB-Exposition wie in den SSR- und UVA-Studien beobachtet werden. So waren hier gleichfalls erythemale ( $\geq 1$  MED) UVB-Dosen i. d. R. notwendig, um die MMP-1 und TIMP-1 mRNA zu induzieren. Eine deutliche Erhöhung der Genexpression erfolgte erst mit UVB-Dosen von  $\geq 2$  MED. Bei 2 MED UVB konnten Induktionen der MMP-1 mRNA von bis zu 89500-fach sowie für TIMP-1 von bis zu 7-fach gemessen werden, wobei diese Werte erneut in etwa denen nach der Bestrahlung mit 2 MED SSR entsprachen.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der UVA bzw. UVB-Studie mit den SSR-Studien sollte berücksichtigt werden, dass das SSR-Emissionsspektrum einen Anteil von 91,5% UVA und 8,5% UVB enthält. Dabei beträgt die „Erythemally Effective Energy“ für UVA 12% und für UVB 88%. Im Durchschnitt war eine ca. 1000-fach höhere UVA-Dosis nötig, um die gleiche erythemale Wirkung wie das UVB zu erzielen. Da bei den vorliegenden Untersuchungen im Allgemeinen vergleichbare erythemale Dosen von UVA, UVB und SSR einen vergleichbaren Effekt auf die MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression *in vivo* zeigten, scheint somit für den Photoageing-Prozess nicht das UVA, sondern das UVB die Hauptursache zu sein. Außerdem könnte für die Induktion der Hautalterungsmarker MMP-1 und TIMP-1 durch die verschiedenen UV-Quellen ein gemeinsamer Chromophor dienen. Dabei könnte es sich um die DNA handeln. So beschrieben Blattner et al. (1998), dass die UV-induzierte Transkription der MMP-1 von Pyrimidin-Dimeren im transkribierten Bereich abhängig ist. Pyrimidin-Dimere als Form der direkten DNA-Schädigung werden durch UVB-Strahlung gebildet (Freeman

et al. 1987). Die Induktion von Signaltransduktionskaskaden für Gene, die erst spät auf UV-Stress reagieren wie die über AP-1 induzierte MMP-1, scheinen dabei häufig nicht direkt über nicht-nukleäre Mechanismen, sondern durch UV-induzierte DNA-Schäden getriggert zu werden (Blattner et al. 1998).

Um Aufschluss über die Effekte mehrmaliger suberythemaler UV-Exposition, der der Mensch in der Natur ausgesetzt ist, zu gewinnen, wurde eine repetitive SSR-Bestrahlungsserie durchgeführt. Nachfolgend wurden die Effekte auf die MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression untersucht. Generell konnte 24 h nach einer fünfmaligen Bestrahlung mit 0,65 MED eine deutlich erhöhte MMP-1 Genexpression gemessen werden, die in etwa dem Level nach einer einmaligen Dosis von 2 MED SSR entsprach. Nach einer zehnmaligen Bestrahlung mit der suberythemalen Dosis war in der Regel sowohl 24 h im Anschluss als auch eine Woche später ein deutlicher Rückgang der MMP-1 Induktion zu verzeichnen. Teilweise wurde sogar der Level der unbestrahlten Proben erreicht. Dies könnte ein Hinweis auf einen „Hardening“-Effekt sein. Auch die MMP-1 mRNA Induktionen der Proben, die im Anschluss an die zehnmalige suberythemale SSR-Exposition mit 2 MED bestrahlt wurden, sprechen für ein derartiges „Hardening“-Phänomen. Diese Stanzbiopsien zeigten eine entsprechend erhöhte MMP-1 mRNA Expression wie die nur zehnmal mit 0,65 MED (24 h) bestrahlten Ansätze. In der Literatur findet sich nur eine weitere *in vivo* Studie mit repetitiver UV-Exposition. Fisher et al. (1997) bestrahlten Probanden für eine Woche viermal jeden zweiten Tag mit 0,5 MED fluoreszentem UV (290-800 nm) und bestimmten die MMP-1 Proteinaktivität für alle Ansätze 24 h nach der letzten UV-Exposition. Bereits nach einer suberythemalen Bestrahlung konnte die Arbeitsgruppe eine 4,5-fache Induktion der MMP-1 Aktivität messen, die unabhängig von der Anzahl der UV-Expositionen auf diesem maximalen Level die ganze Woche über erhalten blieb. Dass Fisher et al. schon mit einer einzigen suberythemalen UV-Dosis eine maximal erhöhte MMP-1 Aktivität ermittelten, wurde schon beim Time Course und der Dose Response Studie weiter oben diskutiert (weniger sensitive Detektionsmethoden, nicht solare, UVB-reiche Strahlungsquellen). Allerdings steht die von ihnen gemessene Aufrechterhaltung der MMP-1 Aktivität über die gesamte Woche nicht im Widerspruch zu der hier durchgeführten Studie mit dem Hinweis auf einen „Hardening“-Effekt. Dieser konnte erst nach zwei Wochen Bestrahlung mit suberythemalen Dosen beobachtet werden. Die Fisher Studie jedoch fand nur

über einen Zeitraum von 7 Tagen statt. Nach einer Woche konnte auch in dieser repetitiven suberythemalen UV-Expositionsstudie eine nahezu maximal erhöhte MMP-1 mRNA Expression detektiert werden. Dennoch sollte im Anschluss an diese Arbeit in weiteren Studien überprüft werden, ob sich dieses Phänomen auch auf Proteinebene, insbesondere für die MMP-1 Aktivität, nachweisen lässt. Für TIMP-1 gab es einen Hinweis für einen „Hardening“-Effekt nur bei den Hautproben, die im Anschluss an die zehnmahlige suberythemale UV-Exposition mit 2 MED SSR bestrahlt wurden. Hier ging die TIMP-1 mRNA Induktion im Vergleich zur 2 MED Positivkontrolle deutlich zurück, nahezu auf den Level der unbestrahlten Probe.

## 5.2 MMP-1 und TIMP-1 Expression *in vitro*

Parallel zu den *in vivo* UV-Studien wurde die MMP-1 und TIMP-1 Genexpression auch nach UV-Exposition *in vitro* untersucht. Dabei wurde kontrolliert, inwieweit die *in vitro* auf die *in vivo* Verhältnisse übertragbar seien. *In vitro* Assays bieten sich für eine Prüfung von Wirkstoffen und eine genauere Untersuchung von Regulationsmechanismen der Expressionen an. Beispielsweise führten Scharffetter et al. (1991) im Zusammenhang mit der MMP-1 Genexpression an, dass UVB-Strahlung fast vollständig innerhalb der Epidermis absorbiert wird und somit im Gegensatz zum längerwelligen UVA von untergeordneter biologischer Bedeutung ist. Daher wurde für die hier durchgeführten *in vitro* Untersuchungen eine UVA-Strahlungsquelle (326-402 nm) verwendet, die jedoch nicht direkt mit den UV-Quellen der *in vivo* Studien verglichen werden kann. Mit Hilfe dieser wurden Fibroblasten bestrahlt und im Anschluss die MMP-1 und TIMP-1 Expression analysiert. Fibroblasten stellen dabei die dominierenden Zellen der Dermis dar, dem Kompartiment, in dem die fibrillären Kollagene im Zuge der frühzeitigen Hautalterung durch die aktivierten MMPs abgebaut werden.

In der *in vitro* UVA Time Course Studie ergab sich mit Hilfe der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode eine ähnliche Zeitabhängigkeit der MMP-1 mRNA Expression wie in der *in vivo* SSR Time Course Studie. 3 h nach der UVA-Exposition mit 10 J/cm<sup>2</sup> konnte eine reprimierte MMP-1 Genexpression wie *in vivo* ermittelt werden. Diese Beobachtung untermauert die Hypothese von einer frühen, zunächst schwachen MMP-1 Induktion

und einer zweiten deutlichen Induktion 24 h nach der UV-Bestrahlung. Damit wurde auch hier der 24 h Zeitpunkt nach der Bestrahlung als MMP-1 mRNA Expressionsmaximum bestimmt. In der anschließenden *in vitro* Studie zur Dosisabhängigkeit konnte 24 h nach der Bestrahlung eine UVA-dosisabhängige MMP-1 mRNA Expression detektiert werden. Bei  $16 \text{ J/cm}^2$  wurden die höchsten MMP-1 Induktionswerte von bis zu 11-fach gemessen. In der Literatur finden sich ähnliche Erhöhungen des MMP-1 Levels nach UV-Bestrahlung von Fibroblasten. So berichten Petersen et al. (1992) von einer 12-fachen MMP-1 mRNA bzw. 13-fachen MMP-1 Proteininduktion 24 h nach einer Bestrahlung mit  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA. Wlaschek et al. (1993) konnten nach UVA-Exposition einen 4-fachen Anstieg der MMP-1 mRNA und des Proteins, Brenneisen et al. (1996) nach UVB-Bestrahlung eine 6-fache Induktion der MMP-1 mRNA bzw. eine 4-fache Steigerung der MMP-1 Proteinexpression messen.

Beim Vergleich der *in vitro* mit der *in vivo* Situation der in dieser Arbeit durchgeführten Studien wird deutlich, dass generell *in vitro* die hohen Steigerungsraten der *in vivo* MMP-1 Genexpression von mehreren tausendfach sowie die großen Donorvariabilitäten nicht ermittelt werden konnten. Dieses liegt insbesondere an dem im Vergleich zur *in vivo* Situation hohen MMP-1 Ausgangslevel der unbestrahlten HDF-Proben. Ursache dafür könnten in den Zellkulturbedingungen liegen, die für die Fibroblasten einen gewissen Stress - wie z. B. das Passagieren der Zellen - darstellen und somit zu einer erhöhten MMP-1 mRNA Expression auch in den unbestrahlten Ansätzen führen. So konnten auch insgesamt in allen Proben des *in vitro* Time Courses und der *in vitro* Dose Response Studie kleinere  $C_T$ -Werte entsprechend eines höheren MMP-1 Levels als *in vivo* gemessen werden. Diese höheren MMP-1 mRNA Expressionen konnten ebenso von der bisher im Labor gängigen, weniger sensitiven Northern-Technik (Bergemann et al. 1998) detektiert werden. Dabei resultierten sie in Ergebnissen, die direkt vergleichbar mit den Ergebnissen der neu etablierten TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode waren. Die Northern-Analyse ist jedoch nicht sensitiv genug, um die geringen MMP-1 mRNA Level in den unbestrahlten *in vivo* Stanzbiopsien zu quantifizieren. Zugleich kommt erschwerend hinzu, dass im Allgemeinen die absoluten *in vivo* Probenmengen für eine Analyse mittels Northern-Technik nicht ausreichen.

Für TIMP-1 konnte *in vitro* ± keine Beeinflussung der Genexpression durch UVA-Exposition mit Dosen bis zu  $20 \text{ J/cm}^2$  ermittelt werden. Dieses steht im Einklang mit

publizierten *in vitro* Studien, die keine oder nur eine geringe Induktion der TIMP-1 mRNA bzw. Proteinexpression von weniger als 2-fach nach UVA- oder auch nach UVB-Bestrahlung von Fibroblasten zeigten (Herrmann et al. 1993, Petersen et al. 1992, Brenneisen et al. 1996). Die *in vivo* für die TIMP-1 mRNA Expression bestimmten hohen Induktionsraten von bis zu 16-fach konnten in den hier durchgeführten *in vitro* Studien zur Zeit- und Dosisabhängigkeit wie beim MMP-1 nicht gemessen werden. Da für die Detektion der mRNA sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode verwendet wurde, muss der Grund für diesen Unterschied im artifiziellen System der HDF-Zellkultur liegen. Damit wird deutlich, dass eine Übertragung der *in vitro* ermittelten Ergebnisse auf die *in vivo* Situation nur bedingt möglich ist. So sollte z. B. bei der Testung von Wirkstoffen nach möglichen Vorversuchen *in vitro* stets mit Hilfe der etablierten TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode *in vivo* die MMP-1 und TIMP-1 Ergebnisse überprüft werden.

Neben den *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen auf mRNA Ebene wurden auch die extrazellulären Proteine MMP-1, TIMP-1 sowie der Komplex aus MMP-1 und TIMP-1, der durch TIMP-1 inaktiviertes MMP-1 Protein detektiert, mittels der entsprechenden ELISA-Systeme in einer UVA Time Course Studie analysiert. Nach der Bestrahlung von Fibroblasten mit 10 J/cm<sup>2</sup> konnte bereits eine deutliche Steigerung der MMP-1 Proteinexpression nach 24 h gemessen werden. Die maximale MMP-1 Proteininduktion von 8-fach konnte jedoch – im Unterschied zur mRNA - erst nach 96 h ermittelt werden. Dabei entsprachen die Induktionswerte auf mRNA und Proteinebene jedoch einander. Die Ergebnisse dieses Time Courses stehen nicht im Widerspruch zu der UVB-Bestrahlungsstudie von Brenneisen et al. (1996), in der die MMP-1 Proteinexpression von Fibroblasten allerdings nur bis zu 48 h nach der Bestrahlung bestimmt wurde. Bei dieser Untersuchung wurde nach 48 h die größte MMP-1 Proteininduktion von 7-fach detektiert. Im Gegensatz dazu ermittelten Fisher et al. (1996) bei den *in vivo* UV-Bestrahlungsstudien wie auf mRNA Ebene den 24 h Zeitpunkt als Maximum der MMP-1 Proteinexpression und –aktivität. Fisher et al. fanden in ihrer Untersuchungsreihe heraus, dass die MMP-1 Proteinexpression die Proteinaktivität spiegelte, d. h. dass alles induzierte Protein auch proteolytisch aktiv war. Ähnliches konnte in dieser UVA *in vitro* Studie abgeleitet werden. Zum Zeitpunkt der maximalen MMP-1 Proteinexpression, 96 h nach der UVA-Exposition von HDF-Zellen, konnte nur 1 % des detektierten

MMP-1 Proteins inaktiviert im Komplex mit TIMP-1 ermittelt werden. Trotzdem konnte parallel dazu weitaus mehr TIMP-1 Protein gemessen werden, nämlich 30 % der Proteinmenge des MMP-1. Insgesamt blieb die TIMP-1 Proteinexpression von der UV-Exposition *in vitro* wie auf der mRNA Ebene relativ unbeeinflusst.

In vielen experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass Antioxidantien wie das  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) sowohl einen UV-vermittelten zellulären Schaden als auch eine UV-bedingte Zytotoxizität durch ein Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies und freier Radikale verhindern können (Mariéthoz et al. 1998). So inhibiert bzw. minimiert Vitamin E z. B. die UV-induzierte Lipidperoxidation, Immunsuppression, Apoptose, Tumorgenese und Sonnenbrand. Neuere Untersuchungen zeigen, dass das  $\alpha$ -Tocopherol auch auf zellulärer Ebene in nicht oxidativer Weise u. a. die Proteinkinase C Aktivität und die Freisetzung von Zytokinen wie IL-1  $\beta$  hemmt (Azzi et al. 2001). Daneben konnten Ricciarelli et al. (1999) eine Reduktion der altersabhängigen Zunahme der MMP-1 Gen- und Proteinexpression durch  $\alpha$ -Tocopherol ohne eine entsprechende Induktion von TIMP-1 beobachten. Bei der hier durchgeführten UVA-Bestrahlung von mit Vitamin E vorinkubierten Fibroblasten konnte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen nach 24 h ebenfalls eine reduzierte MMP-1 mRNA Induktion mittels Northern-Technik gemessen werden. Dabei wurde die MMP-1 Induktion nach UVA-Bestrahlung mit  $10 \text{ J/cm}^2$  durch das  $\alpha$ -Tocopherol um über 60 % gesenkt. Ricciarelli et al. (1999) stellten zwei Hypothesen für die durch oxidativen Stress wie UV bedingte Hautalterung und deren Protektion durch  $\alpha$ -Tocopherol auf: Entweder könnte das Vitamin E direkt durch die Eliminierung von Radikalen und Oxidantien wirken oder indirekt über eine Hemmung der AP-1 Aktivierung. Diese AP-1 Aktivierung könnte in einer verminderten MMP-1 Genexpression und somit in einem verminderten Kollagenabbau, also einer reduzierten Hautalterung, resultieren. Die Ergebnisse des Neutralrot-Testes bestätigen daneben, dass das  $\alpha$ -Tocopherol eine UV-bedingte Zytotoxizität durch ein Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies und freier Radikale verhindern kann (Mariéthoz et al. 1998). Bei der Bestrahlung von Fibroblasten mit  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA lag die Viabilität der Zellen nur noch bei 56 %. Eine Vorinkubation der HDF-Zellen mit Vitamin E hingegen resultierte in einer Viabilität, die denen der unbestrahlten, unbehandelten Zellen (100 %) entsprach.

Um die direkte Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf die MMP-1 und TIMP-1 Genexpression zu untersuchen, wurden Fibroblasten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert und parallel dazu im Vergleich mit  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA bestrahlt. Für die Analyse der mRNA Expression nach 24 h wurde die TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode verwendet. Eine Inkubation mit 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  resultierte in etwa in einer Verdopplung der MMP-1 Genexpression, wobei  $10 \text{ J/cm}^2$  UVA zu einer 4-fachen Erhöhung der MMP-1 mRNA Expression führten. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den von Brenneisen et al. (1997) erhobenen Daten, die eine MMP-1 Induktion von 2,6-fach nach 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ermittelten. Damit konnte die potentielle Rolle des  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der UV-induzierten MMP-1 Induktion *in vitro* bestätigt werden.

Die TIMP-1 mRNA Expression der mit 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubierten Fibroblasten wurde im Unterschied zur MMP-1 um die Hälfte gesenkt. Dieses konnte für die bestrahlten Zellen nicht beobachtet werden, deren TIMP-1 mRNA Level im Gegensatz dazu von der UV-Exposition  $\pm$  unbeeinflusst blieb. Weitere Vergleichsmessungen liegen in der Literatur nicht vor. Das  $\text{H}_2\text{O}_2$  scheint somit bei der TIMP-1 mRNA Expression nach UV-Exposition *in vitro* nicht elementar beteiligt zu sein.

### **5.3 Elastin und Elastase mRNA Expression *in vivo***

Photoageing ist histologisch neben einem Abbau und einer zunehmenden Desorganisation der Kollagenfasern auch durch eine starke Akkumulation elastotischen Materials in der menschlichen Dermis charakterisiert (Pasquali-Ronchetti und Baccarani-Contri 1997). Immunohistochemische Studien von sonnenexponierter Haut haben gezeigt, dass sich diese Ansammlungen hauptsächlich aus Elastin, der Hauptkomponente der elastischen Fasern der Haut, zusammensetzen (Mera et al. 1987). Daher wurde mittels der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Methode parallel zur MMP-1 und TIMP-1 Genexpression der Einfluss von SSR auf die mRNA Expression von Elastin und seinem degradierenden Enzym Elastase in humaner Haut *in vivo* untersucht.

Trotz individueller Probandenunterschiede konnten sowohl in der Studie zur Zeitabhängigkeit, als auch in der zur Dosisabhängigkeit deutliche Trends in der Beeinflussung der Elastin und Elastase mRNA Expression in humaner Haut durch SSR-Exposition *in vivo*

aufgezeigt werden. Direkt nach der Bestrahlung mit 2 MED wurden z. T. leichte Induktionen von bis zu 2-fach für die Elastin bzw. die Elastase mRNA detektiert. Eventuell könnte dies ein Hinweis auf eine schnelle, jedoch schwach induzierende UV-Antwort darstellen, die sich spätestens nach 3 h in eine deutlich reprimierte umkehrt. Je später die Biopsien nach der Bestrahlung entnommen wurden, desto stärker reprimierte Werte ergaben sich für beide Targets. So wurden für Elastin Repressionen bis 0,04-fach und für Elastase bis 0,06-fach ermittelt. Über den Verlauf der mRNA Expressionen von Elastin und Elastase nach mehr als 48 h lässt sich mit Hilfe dieser Zeitabhängigkeitsstudie keine Aussage treffen. Auch in der Literatur finden sich keine Hinweise.

Diese Untersuchungen wurden an Probanden durchgeführt, deren Bestrahlungsdosis und Zeitpunkt der Biopsieentnahme für das MMP-1/TIMP-1 System optimiert waren. Deshalb wurden die Biopsien für die Studie zur Dosisabhängigkeit 24 h nach der UV-Exposition genommen. Sowohl für die Elastin als auch für die Elastase Genexpression zeigte sich der Trend auf, dass mit zunehmender Bestrahlungsdosis stärker reprimierte Expressionen auftraten. Für das Elastin konnten 24 h nach der UV-Bestrahlung mit 4 MED bis zu 0,09-fach, für die Elastase bis zu 0,17-fach reprimierte Expressionen gemessen werden. Das bedeutet für das Elastin, dass bei stärkerer UV-Exposition weniger Elastin transkribiert wird und somit weniger Elastinprotein für den Aufbau elastischer Fasern, die für die Elastizität der Haut verantwortlich sind (Christiano und Uitto 1994), zur Verfügung stünde (Photoageing). Diese Hypothese steht im Einklang mit Montagna et al. (1989), die einen Verlust der normalen Struktur von elastischen Fasern in UV-geschädigter Haut beschreiben. Auch in HDF-Kulturen älterer Individuen konnte beobachtet werden, dass nach der vierten oder fünften Passage die Elastin mRNA Expression deutlich reduziert ist (Uitto et al. 1989). Andere Forschungsgruppen vertreten kontroverse Hypothesen, die aufgrund der weitaus weniger sensitiven Methoden als der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR sehr kritisch zu betrachten sind. So legt Bernstein et al. (1994) dar, dass die Elastin Genexpression in UV-geschädigten Zellen der Dermis deutlich induziert ist. Die verwendeten HDF-Zellen stammten dabei aus Biopsien von UV- bzw. nicht UV-exponierten Körperstellen, und die Elastin Induktion wurde im Vergleich von bestrahlt zu unbestrahlt mittels Northern bestimmt. In Übereinstimmung mit dieser Theorie beschreiben Uitto und Bernstein (1998) eine UV-induzierte humane Elastinpromoter-Aktivierung, allerdings im Maussystem *in vitro* und *in vivo*. Kawa-

guchi et al. (1997) hingegen konnten nach der UVA-Bestrahlung von HDF-Zellen keinen Effekt des UVA auf die Elastin mRNA Expression mittels Northern messen.

Neben Elastin konnte auch für die Elastase eine verstärkte mRNA Repression mit zunehmender Bestrahlungsdosis verzeichnet werden. Elastasen sind eine Gruppe von proteolytischen Enzymen, die elastische Fasern degradieren (Uitto et al. 1995). Die neutrophile Elastase wird in den Myeloid-Vorläuferzellen des Knochenmarks exprimiert und in Granula reifer neutrophiler Zellen vor dem Verlassen des Knochenmarks gespeichert (Takahashi et al. 1988). Laut Starcher und Conrad (1995) transportieren die neutrophilen Zellen die Elastase an den Ort, wo sie proteolytisch aktiv werden soll, so z. B. in die Nähe der elastischen Fasern der Dermis. Die hier durchgeführten *in vivo* Messungen ergaben allerdings für die Elastase in der Haut  $C_T$ -Werte zwischen 23 und 28. Das bedeutet, dass Elastase nicht nur im Knochenmark transkribiert werden kann, sondern dass auch eine deutliche Elastase Genexpression in der Haut selbst stattfindet. Dabei scheinen nach den Ergebnissen der Optimierungsphase der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Systeme weder die Fibroblasten noch die Keratinozyten elementar beteiligt zu sein. Unbestrahlte Fibroblasten zeigten eine sehr schwache Elastase mRNA Expression mit einem  $C_T$ -Wert zwischen 33 und 35. Mit 33 mJ bestrahlte primäre Keratinozyten ergaben für die Elastase  $C_T$ -Werte um die 40. Diese Zellen sind somit nicht in die Elastase mRNA Expression involviert. Es ist zu vermuten, dass hauptsächlich die inflammatorischen Zellen nicht nur für den Transport, sondern auch für die Elastase Transkription in der Haut verantwortlich sind. Im Zuge der Optimierungsphase der TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Systeme wurden unstimulierte PBMCs (Periphere mononukleäre Blutzellen, Lymphozyten und Monozyten) eingesetzt, die  $C_T$ -Werte um die 24,5 aufzeigten. Dass durch die Bestrahlung mit zunehmenden Dosen von SSR die Elastase mRNA in der Haut aller Probanden nicht induziert, sondern eher reprimiert wurde, steht nicht im Widerspruch zu der Theorie Takahashis et al. (1988). Die von den neutrophilen Zellen aus dem Knochenmark zu den elastischen Fasern in der Dermis transportierte Elastase könnte vor Ort durch das UV-Licht stimuliert in die proteolytisch aktive Form umgesetzt werden und dort zu einer starken Schädigung des Elastins beitragen. Für die durch SSR reprimierte Elastase Genexpression muss noch nach Erklärungen gesucht werden. Die parallelen UV-Antworten der Elastin und Elastase mRNA lassen jedoch auf einen gemeinsamen

---

Regulator schließen. Weitere Untersuchungen sollten insbesondere auf Proteinebene erfolgen.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit zur Expression humaner Hautalterungsmarker wurde erstmals der solare UV-Einfluss auf die individuelle MMP-1, TIMP-1, Elastin und Elastase Genexpression *in vivo* mit Hilfe einer quantitativen Methode, der sensitiven TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR, untersucht.

Nach der UV-Bestrahlung konnten große Donorvariabilitäten für die MMP-1 Induktion beobachtet werden, die hauptsächlich durch die deutlichen Unterschiede in den unbestrahlten Kontrollbiopsien bedingt waren. Dadurch wird deutlich wie wichtig es ist, Genexpressionsuntersuchungen für individuelle Probanden durchzuführen. Für die Unterschiede in der basalen MMP-1 mRNA Expression ergab sich eine signifikante Assoziation mit dem Rauchen. Damit konnte zum ersten Mal ein Effekt des Rauchens auf die MMP-1 mRNA Induktion in menschlicher Haut *in vivo* als mögliche molekulare Grundlage für die frühzeitige Hautalterung aufgezeigt werden.

Eine Bestrahlung mit 2 MED SSR *in vivo* resultierte bei allen Probanden in einer maximalen MMP-1 und TIMP-1 mRNA Induktion nach 24 h. Durch die hier durchgeführten Untersuchungen konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass für eine Erhöhung der MMP-1 und TIMP-1 Genexpression (24 h) in humaner Haut *in vivo* erythemale SSR-Dosen ( $\geq 1$  MED) notwendig sind. Ab UV-Dosen von  $\geq 2$  MED wurde eine Sättigung, also keine weitere Erhöhung der Genexpression beobachtet. Erstmals nachgewiesen sind in dieser Arbeit auch die hohen mRNA Induktionen von bis zu mehreren tausendfach für MMP-1 bzw. von bis zu 16-fach für TIMP-1 nach SSR-Bestrahlung. Der Vergleich der MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression nach UV-Exposition weist auf eine fehlende Korrelation hin. Diese gestörte Balance zwischen UV-induziertem MMP-1 und TIMP-1 könnte wie beim Rauchen an dem zunehmenden Abbau des dermalen Kollagens und damit am Photoaging beteiligt sein.

Die MMP-1 mRNA Expression wurde sowohl in der Dermis als auch in der Epidermis durch SSR-Bestrahlung *in vivo* erhöht. Im Gegensatz dazu wurde eine Induktion der TIMP-1 mRNA durch UV-Exposition ausschließlich in der Dermis, aber nicht in der Epidermis verzeichnet.

Im Allgemeinen zeigten vergleichbare erythemale Dosen von UVA, UVB und SSR einen vergleichbaren Effekt auf die MMP-1 und TIMP-1 mRNA Expression *in vivo*. Damit scheint das UVB und nicht das UVA die Hauptursache für den Photoaging-Prozess darzustellen.

In einer repetitiven *in vivo* SSR-Bestrahlungsstudie konnte nach einer zweiwöchigen Bestrahlung mit einer suberythemalen SSR-Dosis ein deutlicher Hinweis auf einen „Hardening“-Effekt für die MMP-1 Genexpression beobachtet werden. Für die TIMP-1 mRNA galt dies nur eingeschränkt.

Bei einer parallel durchgeführten *in vitro* Studie zeigte sich nach der UVA-Bestrahlung von Fibroblasten der 24 h Zeitpunkt als das MMP-1 mRNA Expressionsmaximum, entsprechend der *in vivo* Situation. Ebenso konnte eine UVA-dosisabhängige MMP-1 mRNA Expression (24 h) *in vitro* gemessen werden. Dagegen konnten generell die hohen Induktionen der *in vivo* MMP-1 Genexpression von mehreren tausendfach sowie die großen Donorvariabilitäten aufgrund der hohen MMP-1 Ausgangslevel der unbestrahlten HDF-Proben nicht ermittelt werden. Eine maximale MMP-1 Proteinexpression *in vitro* in der Höhe der maximalem mRNA Induktion wurde erst 96 h nach der UVA-Bestrahlung von Fibroblasten ermittelt, wobei 1 % des MMP-1 Proteins durch TIMP-1 komplexiert, also inaktiviert, war. Die TIMP-1 Gen- und Proteinexpression blieb von der UV-Exposition *in vitro* relativ unbeeinflusst.

Eine Vorinkubation von Fibroblasten mit dem Antioxidans  $\alpha$ -Tocopherol senkte die MMP-1 Induktion nach UVA-Bestrahlung um über 60 % *in vitro*. Ebenso verhinderte das  $\alpha$ -Tocopherol eine UV bedingte Zytotoxizität. Eine Inkubation von HDF-Zellen mit 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einer Induktion der MMP-1 Genexpression (24 h) und zu einer Reprimierung des TIMP-1 mRNA Levels.

Sowohl für das Elastin als auch für die Elastase ergab sich mit zunehmender Zeit der Biopsieentnahme und mit zunehmender Bestrahlungsdosis nach 24 h eine verstärkt reprimierte Genexpression.

Durch die in dieser Arbeit etablierten TaqMan<sup>®</sup> RT-PCR Systeme stehen nun quantitative Methoden für die *in vivo* Testung von Lichtschutzprodukten und Wirkstoffen gegen Hautalterung zur Verfügung. Dabei sollten die erzielten Ergebnisse als Grundlage für die Entwicklung neuer Lichtschutzkonzepte dienen.

## 7 Literatur

- ABI PRISM<sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2** (1997) PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.
- Anderson, D.** (1996) Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.* **350**, 103-108.
- Azzi, A., I. Breyer, M. Feher, R. Ricciarelli, A. Stocker, S. Zimmer und J. M. Zingg** (2001) Nonantioxidant functions of  $\alpha$ -tocopherol in smooth muscle cells. *J. Nutr.* **131**, 378S-381S.
- Barrett, A. J., N. D. Rawlings und J. F. Woessner** (1998) In: Handbook of proteolytic enzymes. Academic Press, London.
- Bella, J., M. Eaton, B. Brodsky und H. M. Berman** (1994) Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution. *Science* **266**, 75-81.
- Bergemann, J., H. Mielke, G. Stanke und U. Hoppe** (1998) Studies on effective protection against UVA-induced fibroblast collagenase expression – Quantification with the Lumi-Imager<sup>™</sup> Workstation. *Biochemica Information* **3**, 22-25.
- Bernstein, E. F., Y. Q. Chen, K. Tamai, K. J. Shepley, K. S. Resnik, H. Zhang, R. Tuan, A. Mauviel und J. Uitto** (1994) Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 182-186.
- Bernstein, E. F., Y. Q. Chen, J. B. Kopp, L. Fisher, D. B. Brown, P. J. Hahn, F. A. Robey, J. Lakkakorpi und J. Uitto** (1996) Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **34**, 209-218.
- Bhawan, J., W. Andersen, J. Lee, R. Labadie und G. Solares** (1995) Photoaging versus intrinsic aging: a morphologic assessment of facial skin. *J. Cutan. Pathol.* **22**, 154-159.

- Bidder, M., A. P. Loewy, T. Latifi, E. P. Newberry, G. Ferguson, D. M. Willis und D. A. Towler** (2000) Ets domain transcription factor PE1 suppresses human interstitial collagenase promoter activity by antagonizing protein-DNA interactions at a critical AP1 element. *Biochemistry* **39**, 8917-8928.
- Birkedal-Hansen, H.** (1995) Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Current Opinion Cell Biol.* **7**, 728-735.
- Blattner, C., K. Bender, P. Herrlich und H. J. Rahmsdorf** (1998) Photoproducts in transcriptionally active DNA induce signal transduction to the delayed U.V.-responsive genes for collagenase and metallothionein. *Oncogene* **16**, 2827-2834.
- Bode, W., F. X. Gomis-Rüth und W. Stöcker** (1993) Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett.* **331**, 134-140.
- Borenfreund, E. und J. A. Puerner** (1985) Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Tox. Letters* **24**, 119-124.
- Braverman, I. M.** (1986) Elastic fiber and microvasculature abnormalities in aging skin. *Dermatol. Clin.* **4**, 391-405.
- Brenneisen, P., J. Oh, M. Wlaschek, J. Wenk, K. Briviba, C. Hommel, G. Herrmann, H. Sies und K. Scharffetter-Kochanek** (1996) Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* **64**, 649-657.
- Brenneisen, P., K. Briviba, M. Wlaschek, J. Wenk und K. Scharffetter-Kochanek** (1997) Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 515-524.
- Bustin, S. A.** (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169-193.

- Chen, V. L., R. Fleischmajer, E. Schwartz, M. Palaia und R. Timpl** (1986) Immunohistochemistry of elastotic material in sun-damaged skin. *J. Invest. Dermatol.* **87**, 334-337.
- Christiano, A. M. und J. Uitto** (1994) Molecular pathology of the elastic fibres. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 53S-57S.
- Chung, L., K. Shimokawa, D. Dinakarandian, F. Grams, G. B. Fields und H. Nagase** (2000) Identification of the <sup>183</sup>RWTNNFREY<sup>191</sup> region as a critical segment of matrix metalloproteinase 1 for the expression of collagenolytic activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 29610-29617.
- Commission Internationale de l'Eclairage** (1987) Vocabulaire International de l'Eclairage (CIE Publication No. 17.4). Bureau Central de la Commission Electrotechnique Internationale, 4. Auflage; Genf, 3.
- Demple, B. und L. Harrison** (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Ann. Rev. Biochem.* **63**, 915-948.
- Enk, C. D., S. Mahanty, A. Blauvelt und S. I. Katz** (1996) UVB induces IL-12 transcription in human keratinocytes *in vivo* and *in vitro*. *Photochem. Photobiol.* **63**, 854-859.
- Ernster, V. L., D. Grady, R. Miike, D. Black, J. Selby und K. Kerlikowske** (1995) Facial wrinkling in men and women by smoking status. *Am. J. Public Health* **85**, 78-82.
- Fachnormausschuß Lichttechnik** (1976) DIN 5031, Teil 7.
- Fisher, G. J., S. C. Datta, H. S. Talwar, Z. Q. Wang, J. Varani, S. Kang und J. J. Voorhees** (1996) Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* **379**, 335-339.
- Fisher, G. J., Z. Q. Wang, S. C. Datta, J. Varani, S. Kang und J. J. Voorhees** (1997) Pathophysiology of premature skin ageing induced by ultraviolet light. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1419-1428.

- Fisher, G. J. und J. J. Vorhees** (1998) Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo*. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 61-68.
- Förster, V. T.** (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physics (Leipzig)* **2**, 55-75.
- Frances, C. und L. Robert** (1984) Elastin and elastic fibers in normal and pathologic skin. *Intern. J. Dermatol.* **23**, 166–179.
- Freeman, S. E., R. W. Gange, J. C. Sutherland and B. M. Sutherland** (1987) Pyrimidine dimer formation in human skin. *Photochem. Photobiol.* **46**, 207-212.
- Gaire, M., Z. Magbanua, S. McDonnel, L. McNeil, D. H. Lovett und L. M. Matrisian** (1994) Structure and expression of the human gene for the matrix metalloproteinase matrilysin. *J. Biol. Chem.* **269**, 2032-2040.
- Gates, D. M.** (1965) Heat transfer in plants. *Sci. Am.* **213**, 76-84.
- Gibson, U. E. M., C. A. Heid und P. M. Williams** (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**, 995-1001.
- Gilchrest, B. A.** (1989) Skin aging and photoaging: an overview. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1**, 610-613.
- Gilchrest, B. A. und M. Yaar** (1992) Ageing and photoageing of the skin: observations at the cellular and molecular level. *Br. J. Dermatol.* **127**, 25-30.
- Gilchrest, B. A. und M. Yaar** (1998) Aging versus photoaging: postulated mechanisms and effectors. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 47-51.
- Gilchrest, B. A. und M. S. Eller** (1999) DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* **4**, 35-40.
- Gomez, D. E., D. F. Alonso, H. Yoshiji und U. P. Thorgeirsson** (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* **74**, 111-122.

- Gomis-Rüth, F. X., K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G. P. Bourenkov, H. Bartunik und W. Bode** (1997) Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* **389**, 77-81.
- Goukassian, D. A., M. S. Eller, M. Yaar und B. A. Gilchrest** (1999) Thymidine dinucleotide mimics the effect of solar simulated radiation on p53 and p53-regulated proteins. *J. Invest. Dermatol.* **112**, 25-31.
- Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen und Y. E. Shi** (1996) Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J. Biol. Chem.* **271**, 30375-30380.
- Hadshiew, I. M., M. S. Eller und B. A. Gilchrest** (2000) Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. *Am. J. Contact. Dermat.* **11**, 19-25.
- Harley, C. B., A. B. Futcher und C. W. Greider** (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
- Hasty, K. A., T. F. Pourmotabbed, G. I. Goldberg, J. P. Thompson, D. G. Spinella, R. M. Stevens und C. L. Mainardi** (1990) Human neutrophil collagenase. A distinct gene product with homology to other matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **265**, 11421-11424.
- Haustein, U. F. und Anderegg** (2000) Vorzeitige Hautalterung durch Tabakrauchen. *Hautarzt* **51**, 807-808.
- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak und P. M. Williams** (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986-994.
- Herrmann, G., M. Wlaschek, T. S. Lange, K. Prenzel, G. Goerz und K. Scharffetter-Kochanek** (1993) UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp. Dermatol.* **2**, 92-97.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson und D. H. Gelfand** (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7276-7280.

- Jung, E. G.** (1995) In: Dermatologie. MLP Duale Reihe, 3. Auflage, Stuttgart, 19-32.
- Kadunce, D. P., R. Burr, R. Gress, R. Kanner, J. L. Lyon und J. J. Zone** (1991) Cigarette smoking: risk factor for premature facial wrinkling. *Ann. Intern. Med.* **114**, 840-844.
- Kähäri, V. M. und U. Saarialho-Kere** (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp. Dermatol.* **6**, 199-213.
- Karin, M., Z. Liu und E. Zandi** (1997) AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 240-246.
- Kawaguchi, Y., H. Tanaka, T. Okada, H. Konishi, M. Takahashi, M. Ito und J. Asai** (1997) Effect of reactive oxygen species on the elastin mRNA expression in cultured human fibroblasts. *Free Radical Biol. Med.* **23**, 162-165.
- Kazama, T., E. Yaoita, M. Ito und Y. Sato** (1988) Charge-selective permeability for dermo-epidermal junction: tracer studies with cationic and anionic ferritins. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 560-565.
- Kerr, L. D., D. B. Miller und L. M. Matrisian** (1990) TGF-beta 1 inhibition of transin/stromelysin gene expression is mediated through a Fos binding sequence. *Cell* **61**, 267-278.
- Kindl, G. und W. Raab** (1993) In: Licht und Haut. Govi-Verlag, 3. Auflage, Frankfurt am Main, 51-69.
- Kirsner, R. S.** (2001) Matrix metalloproteinases in normal and impaired wound healing: a potential role of nanocrystalline silver. *HMP Communications* **13**, 4-12.
- Kligman, L. H. und A. M. Kligman** (1986) The nature of photoaging: Its prevention and repair. *Photodermatology* **3**, 215-227.
- Klotz, L. O., N. J. Holbrook und H. Sies** (2001) UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events. *Curr. Probl. Dermatol.* **29**, 95-113.
- Koch, H., K. P. Wittern und J. Bergemann** (2001) In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 892-897.

- Krutmann, J., E. Bohnert und E. G. Jung** (1994) Evidence that DNA damage is a mediate in ultraviolet B radiation-induced inhibition of human gene expression: ultraviolet B radiation effects on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 428-432.
- Lahmann, C., A. R. Young, K. P. Wittern und J. Bergemann** (2001 a) Induction of mRNA for matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in human skin *in vivo* by solar simulated radiation. *Photochem. Photobiol.* **73**, 657-663.
- Lahmann, C., J. Bergemann, G. Harrison und A. R. Young** (2001 b) Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet* **357**, 935-936.
- Lakowicz, J. R.** (1983) Energy Transfer. In: Principles of Fluorescent Spectroscopy. Plenum Press, New York, USA, 303-339.
- Lee, K. S., S. J. Kim, Y. W. Ryoo und B. C. Kim** (1998) All-*trans*-retinoic acid down-regulates elastin promoter activity elevated by ultraviolet B irradiation in cultured skin fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* **17**, 182-189.
- Lee, L. G., C. R. Connell und W. Bloch** (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3761-3766.
- Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti und K. Deetz** (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**, 357-362.
- Longo, M. C., M. S. Berninger und J. L. Hartley** (1990) Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* **93**, 125-128.
- Mariéthoz, E., M. J. Richard, L. L. Polla, S. E. Kreps, J. Dall'Ava und B. S. Polla** (1998) Oxidant/antioxidant imbalance in skin aging: environmental and adaptive factors. *Rev. Environ. Health* **13**, 147-168.

- Mattei, M. G., N. Roeckel, B. R. Olsen und S. S. Apte** (1997) Genes of the membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene family, MMP14, MMP15, and MMP16, localize to human chromosomes 14, 15, and 8, respectively. *Genomics* **40**, 168-169.
- Mauviel, A.** (1993) Cytokine regulation of metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Biochem.* **53**, 288-295.
- Mera, S. L., C. R. Lovell, R. R. Jones und J. D. Davies** (1987) Elastic fibres in normal and sun-damaged skin: an immunohistochemical study. *Br. J. Dermatol.* **117**, 21–27.
- MMP-1 ELISA Protokoll** (1999) Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA.
- MMP-1/TIMP-1 Complex ELISA Protokoll** (2000) Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA.
- Montagna, W., S. Kirchner und K. S. Carlisle** (1989) Histology of sun-damaged skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 907–918.
- Morimoto, Y., T. Tsuda, H. Nakamura, H. Hori, H. Yamato, N. Nagata, T. Higashi, M. Kido und I. Tanaka** (1997) Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, and extracellular matrix mRNA following exposure to mineral fibers and cigarette smoke *in vivo*. *Environ. Health Perspect.* **105**, 1247-1251.
- Nagase, H. und J. F. Woessner, Jr.** (1999) Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494.
- Oehlmann, R.** (1997) Primer Express™ Manual Vers. 2.0. PE Applied Biosystems, Weiterstadt.
- Pasquali-Ronchetti, I. und M. Baccarani-Contrì** (1997) Elastic fiber during development and aging. *Microsc. Res. Tech.* **38**, 428–435.
- Peak, M. J. und G. P. Peak** (1989) Solar ultraviolet induced damage to DNA. *Photodermatol.* **6**, 1-15.

- Pei, D. und S. J. Weiss** (1995) Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Science* **375**, 244-247.
- Pendas, A. M., T. Matilla, X. Estevill und C. Lopéz-Otin** (1995) The human collagenase-3 (CLG3) gene is located on chromosome 11q22.3 clustered to other members of the MMP gene family. *Genomics* **26**, 615-618.
- Pendas, A. M., V. Knäuper, X. S. Puente, E. Llano, M. G. Mattei, S. Apte, G. Murphy und C. Lopez-Otin** (1997) Identification and characterization of a novel human matrix metalloproteinase with unique structural characteristics, chromosomal location, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* **272**, 4281-4286.
- Petersen, M. J., C. Hansen und S. Craig** (1992) Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 440-444.
- Ricciarelli, R., P. Maroni, N. Özer, J. M. Zingg und A. Azzi** (1999) Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by  $\alpha$ -tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic. Biol. Med.* **27**, 729-737.
- Rosenstein, B. S. und D. L. Mitchell** (1987) Action spectra for the induction of pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts and cyclobutane pyrimidine dimers in normal human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* **45**, 775-780.
- Rychlik, W., W. J. Spencer und R. E. Rhoads** (1990) Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **18**, 6409-6412.
- Saarialho-Kere, U. K., E. C. Crouch und W. C. Parks** (1995) The matrix metalloproteinase matrilysin is constitutively expressed in adult human exocrine epithelium. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 190-196.
- Saiki, R. K., S. J. Scharf, F. A. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich und N. Arnheim** (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.

- Salo, T., J. G. Lyons, F. Rahemtulla, H. Birkedal-Hansen und H. Larjava** (1991) Transforming growth factor-beta 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **266**, 11436-11441.
- Sancar, A. und M. S. Tang** (1993) Nucleotide excision repair. *Photochem. Photobiol.* **57**, 905-921.
- Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto und M. Seiki** (1994) A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* **370**, 61-65.
- Scharffetter, K., M. Wlaschek, A. Hogg, K. Bolsen, A. Schothorst, G. Goerz, T. Krieg und G. Plewig** (1991) UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts *in vitro* and *in vivo*. *Arch. Dermatol. Res.* **283**, 506-511.
- Schild, T. A.** (1999) Einführung in die Real-Time TaqMan™ PCR-Technologie Vers. 2.1. PE Applied Biosystems, Weiterstadt.
- Shuster, S. und M. M. Black** (1975) The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br. J. Dermatol.* **93**, 639-643.
- Sies, H. und W. Stahl** (1995) Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* **62**, 1315S-1321S.
- Stähle-Bäckdahl, M. und W. C. Parks** (1993) 92 kDa gelatinase is actively expressed by eosinophils and secreted by neutrophils in invasive squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **142**, 1-6.
- Starcher, B. und M. Conrad** (1995) A role for neutrophil elastase in solar elastosis. *Ciba Found. Symp.* **192**, 338-347.
- Steffensen, B., U. M. Wallon und C. M. Overall** (1995) Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. *J. Biol. Chem.* **270**, 11555-11566.

- Stöcker, W., F. Grams, U. Baumann, P. Reinemer, F. X. Gomis-Rüth, D. B. McKay und W. Bode** (1995) The metzincins – topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. *Protein Sci.* **4**, 823-840.
- Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant und G. I. Goldberg** (1995) Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J. Biol. Chem.* **270**, 5331-5338.
- Suzuki, K., J. J. Enghild, T. Morodomi, G. Salvesen und H. Nagase** (1990) Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* **29**, 10261-10270.
- Takahashi, H., T. Nukiwa, K. Yoshimura, C. D. Quick, D. J. States, M. D. Holmes, J. Whang-Peng, T. Knutsen und R. G. Crystal** (1988) Structure of the human neutrophil elastase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 14739–14747.
- Talwar, H. S., C. E. M. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton und J. J. Voorhees** (1995) Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J. Invest. Dermatol.* **105**, 285-290.
- TaqMan<sup>®</sup> Cytokine Gene Expression Plate I Protocol** (1997) PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA.
- TIMP-1 ELISA Protokoll** (1999) Oncogene Research Products, Cambridge, MA, USA.
- Tschesche H. und M. Farr** (1998) Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren. *Bioforum* **12**, 767-772.
- Tyrell, R. M.** (1995) Ultraviolet radiation and free radical damage to skin. *Biochem. Soc. Symp.* **61**, 47-53.
- Uitto, J., M. J. Fazio und D. R. Olsen** (1989) Molecular mechanisms of cutaneous aging: Age associated connective tissue alterations in the dermis. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 614-622.

- Uitto, J., S. Hsu-Wong, S. D. Katchman, M. M. Bashir und J. Rosenbloom** (1995) Skin elastic fibres: regulation of human elastin promoter activity in transgenic mice. *Ciba Found. Symp.* **192**, 237–253.
- Uitto, J. und E. F. Bernstein** (1998) Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **3**, 41–44.
- Urbach, F.** (1952) In: Biological effects of ultraviolet radiation. Pergamon Press, Oxford, 683.
- Van Wart, H. E. und H. Birkedal-Hansen** (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 5578–5582.
- Wilkinson, D. I. und J. T. Walsh** (1974) Effect of various methods of epidermal-dermal separation on the distribution of <sup>14</sup>C-acetate-labeled polyunsaturated fatty acids in skin compartments. *J. Invest. Dermatol.* **62**, 517–521.
- Willenbrock, F. und G. Murphy** (1994) Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **150**, 5165–5170.
- Yamauchi, M., P. Prisanh, Z. Haque und D. T. Woodley** (1991) Collagen cross-linking in sun-exposed and unexposed sites of aged human skin. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 938–941.
- Yin L., A. Morita und T. Tsuji** (2000) Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch. Dermatol. Res.* **292**, 188–194.
- Young, A. R.** (1990) Cumulative effects of ultraviolet radiation on the skin: cancer and photoaging. *Semin. Dermatol.* **9**, 25–31.
- Zhang, X., B. S. Rosenstein, Y. Wang, M. Lebwohl, D. M. Mitchell und H. Wie** (1997) Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem. Photobiol.* **65**, 119–124.

## 8 Anhang

### 8.1 Sequenzen der TaqMan® RT-PCR Systeme

#### 8.1.1 GAPDH TaqMan® RT-PCR System

|      |   |                                    |          |
|------|---|------------------------------------|----------|
|      | <b><i>Forward Primer</i></b>  | <b><u>Sonde (5')</u></b>           |          |
| 3781 | ccatgttcgt cat <b><i>gggtgtg aaccatgaga</i></b> agtatgacaa cag <b><u>cctcaag atcatcag</u></b> <sup>GT</sup> |                                    | Exon 6   |
| 3841 | GAGGAAGGCA GGGCCCGTGG AGAAGCGGCC AGCCTGGCAC CCTATGGACA CGCTCCCTG  |                                    | INTRON F |
|      |   | <b><u>Sonde (3')</u></b>           |          |
| 3901 | ACTTGCGCCC CGCTCCCTCT TTCTTTGCAG <b><u>caatgcctcc</u></b> <i>tgaccacca actgcttagc</i>                       |                                    | Exon 7   |
|      |   | <b><i>gctaagcagt tgggggtgc</i></b> |          |
|      |   | <b><i>Reverse Primer</i></b>       |          |
| 3961 | accctggcc aaggtcatcc atgacaactt tggatcgtg gaaggactca tgGTATGAGA   |                                    | INTRON G |

Abbildung 8.1: *Lokalisation des GAPDH TaqMan® RT-PCR Systems (Accession Number: J04038)*

Exons: kleine Buchstaben

INTRONS: GROSSE BUCHSTABEN

***Primer: fette kursive Buchstaben***

**Sonde: fette unterstrichene Buchstaben**

## 8.1.2 MMP-1 TaqMan® RT-PCR System

**Reverse Primer**

9061 ttggggtttg tggg**ccgatg ggctggacag** gat~~ttt~~ggga acgtcCTAAG GAAAATAAAA Exon 5  
 aaccccaaac acccggctac ccgacctgtc cta**aaacct tgcag**  
**Sonde (3')**

9121 TACCTGGAGT TAGTTTTGCC TAGTATTAGA AACTACATA AACAAATGAAG ACAGCTTCTT INTRON 5

9181 CAAGGATATC GCTAATGGCT GTTTTATTG AAATACATAT AAAGACCACC AGGCCCTTGT

9241 CCGTAATGTT TTTCCCCATA CTCACc~~at~~at atggctt~~g~~ga tgccatcaat gtcac~~c~~tga Exon 6  
**gtata taccgaacct acggtagtta cagtaggact**  
**Sonde (5')** **Forward Primer (3')**

9301 gctagctgaa catcaccact gaaggtgtag ctagggtaca tcaaagcccc gatatcagta  
**cgatcga**ctt gtagtgg~~t~~ga cttccacatc gatcccatgt agtttcgggg ctatagtc~~at~~  
**Forward Primer (5')**

Abbildung 8.2: **Lokalisation des MMP-1 TaqMan® RT-PCR Systems (Accession Number: U78045)**

Exons: kleine Buchstaben

INTRONS: GROSSE BUCHSTABEN

**Primer: fette kursive Buchstaben**

**Sonde: fette unterstrichene Buchstaben**

### 8.1.3 TIMP-1 TaqMan® RT-PCR System

|       |   |          |
|-------|---|----------|
|       | <b>Reverse Primer</b>   |          |
| 2761  | cccagcaggc ctgcacctgt gtcccacccc <b>accacagac ggccttc</b> gc aattccgacc<br>gggtcgtccg gacgtggaca caggggtggg tgggtgtctg ccggaagac <b>g ttaagctgg</b><br><b>Sonde (3')</b>        | Exon 2   |
| 2821  | tcgGTGAGTC CTCACCCAC TCAGCCACA CACTCTGCCT TGGTTCCCT TTCAGTCCAG<br><b>agc</b>  | INTRON 2 |
| ----- |   |          |
| 61    | AGtcatcagg gccaaagtctg tggggacacc agaagtcaac cagaccacct tataccagcg<br><b>agtagtcc cggttcaagc acccctgtg</b> tcttcagttg gtctggtgga atatggtcgc<br><b>Sonde (5') Forward Primer</b> | Exon 3   |

Abbildung 8.3: **Lokalisation des TIMP-1 TaqMan® RT-PCR Systems**

Der obere Teil der Abbildung (Exon 2) ist von der Sequenz mit der Accession Number Y09720 abgeleitet, der untere Abschnitt (Exon 3) von der Sequenz mit der Accession Number D11139.

Exons: kleine Buchstaben

INTRONS: GROSSE BUCHSTABEN

**Primer: fette kursive Buchstaben**

**Sonde: fette unterstrichene Buchstaben**

### 8.1.4 Elastin TaqMan® RT-PCR System

**Reverse Primer**

6181 TCCCACAGga gttggaccct ttgg**gggacc gcaacctgga** gtcccactgg ggtatcccat INTRON 11  
 ct caacctggga aaccccctgg cgttggacct cagggtgacc ccatagggta Exon 12

6241 caaggccccc aagctgcctg GTAAGTCAGA GGGACGGTTC AAGATGCACC ACTCGGCCGG INTRON 12  
 gttccggggg **ttcgacggac**  
**Sonde (3')**

-----

7141 CCTGAGTTTG CTCTGTCCTC TCTCCAGgtg gctatggact gccctacacc acagggaaac Exon 13  
**cac cgatacctga** **cgggatgtgg tgtccctttg**  
**Sonde (5') Forward Primer (3')**

7201 tgcctatgG TGAGTGAGAC CCTTCTAGAC TGTGGGCTTC CAGCTCTTTC CCTCTCCAGG INTRON 13  
 acgggatac  
**Forward Primer (5')**

Abbildung 8.4: **Lokalisation des Elastin TaqMan® RT-PCR Systems (Accession Number: U93037)**

Exons: kleine Buchstaben

INTRONS: GROSSE BUCHSTABEN

**Primer: fette kursive Buchstaben**

**Sonde: fette unterstrichene Buchstaben**

### 8.1.5 Elastase TaqMan® RT-PCR System

**Reverse Primer**

2221 gcgggagccc acccggcagg tgttcgccgt gcagcgcata ***ttcgaaaacg gctacgacc*** Exon 3  
 cgccctcggg tgggccgtcc acaagcgga cgtcgcgtag aagcttttgc cgatgctggg

2281 cgtaaacttg ctcaacgaca tcgtgattct ccagGTGCCG CCGGGCGGGC GGGGGCGAGG INTRON 3  
 gcatttgaac gagttgctgt ag**cactaaga ggtc**  
**Sonde (3')**

-----

4441 ACTGCCCGT GTGACGCGCT GACGATCTGT CCCACCGCC ACAGctcaac gggtcggcca Exon 4  
**gagttg cccagcc**ggg  
**Sonde (5')**

4501 ccatcaacgc caacgtgcag gtggcccagc tgccggctca gggacgccgc ctgggcaacg  
***gtagttggtg gttgcacgtc*** caccgggtcg acggccgagt cctgcggcg gaccctgtgc  
**Forward Primer**

Abbildung 8.5: **Lokalisation des Elastase TaqMan® RT-PCR Systems (Accession Number: Y00477)**

Exons: kleine Buchstaben

INTRONS: GROSSE BUCHSTABEN

**Primer: fette kursive Buchstaben**

**Sonde: fette unterstrichene Buchstaben**

## 8.2 Leistungsspektren der verwendeten UV-Lampen

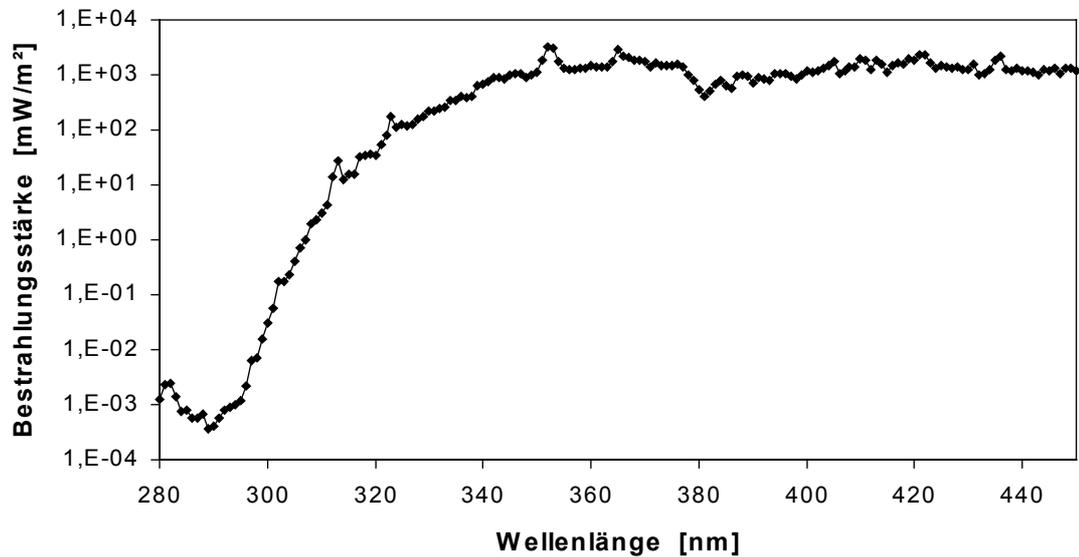


Abbildung 8.6: Emissionsspektrum der UVASPOT 400 Strahlungsquelle (UVA in vitro)

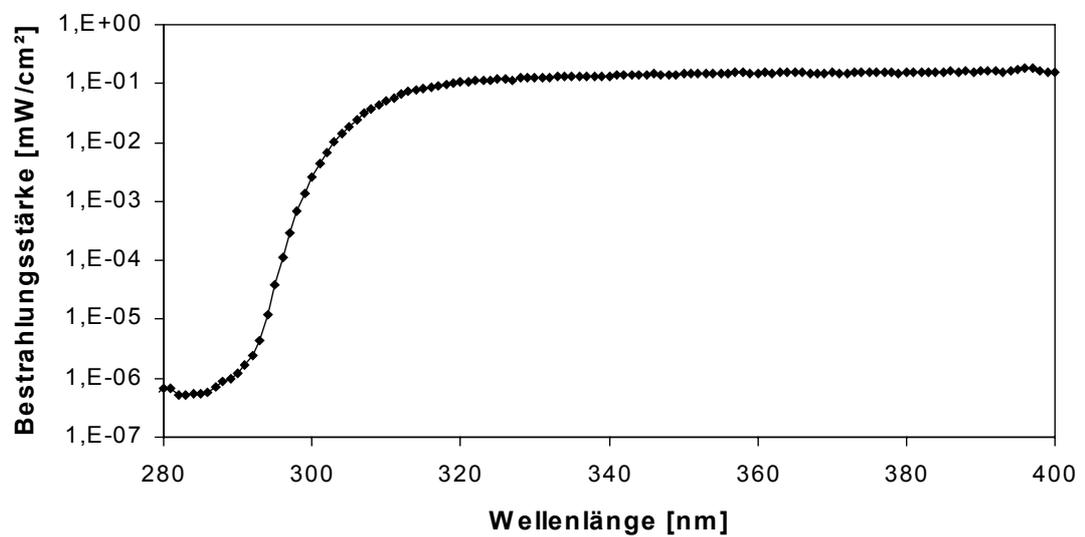


Abbildung 8.7: Emissionsspektrum des Oriol Solar Simulators, Modell 81292 (SSR in vivo)

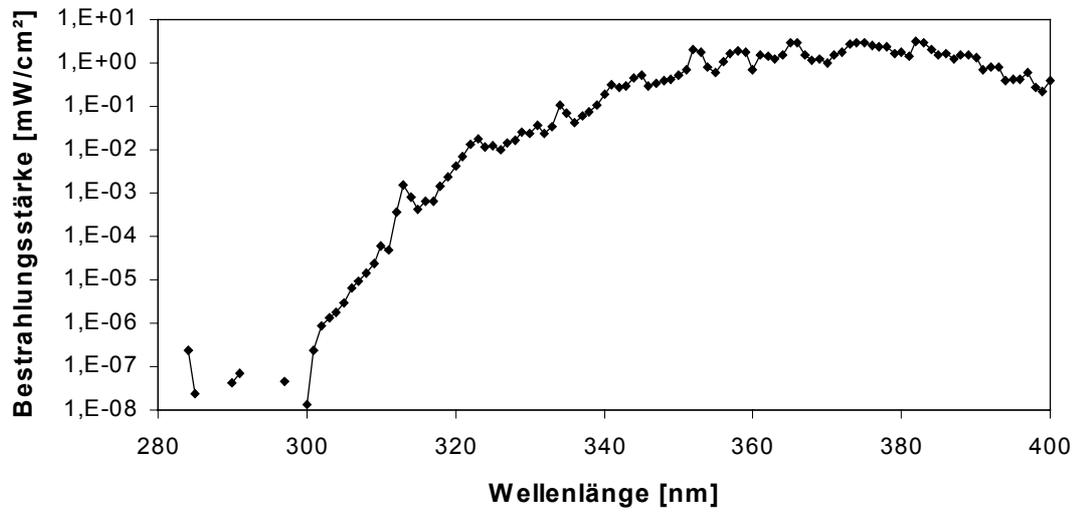


Abbildung 8.8: Emissionsspektrum der UVASUN 2000 Strahlungsquelle (UVA in vivo)

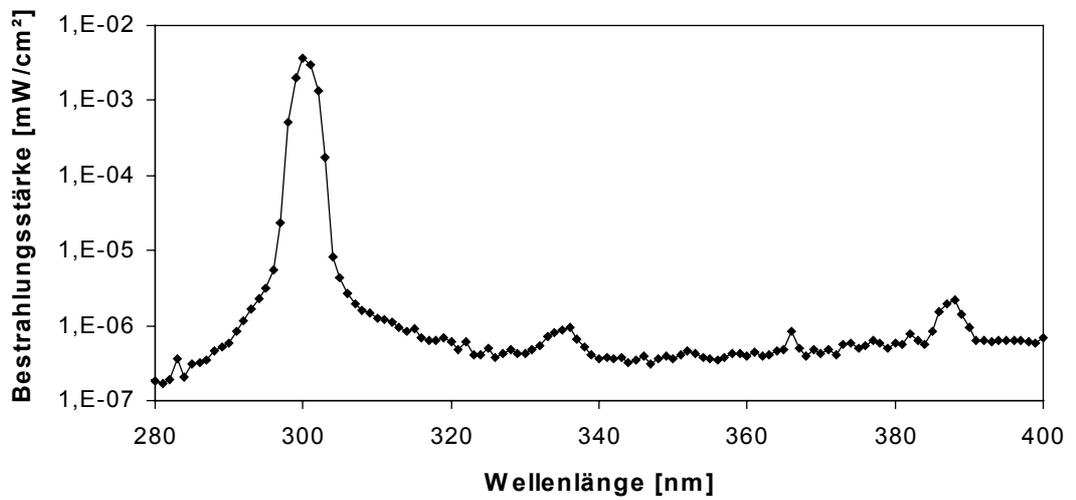


Abbildung 8.9: Emissionsspektrum des Oriol Monochromators, Modell 66021 & 77200 (UVB in vivo)

**Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:**

**Lahmann, C., A. R. Young, K. P. Wittern und J. Bergemann** (2001) Induction of mRNA for matrix metalloproteinase 1 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 in human skin *in vivo* by solar simulated radiation. *Photochem. Photobiol.* **73**, 657-663.

**Lahmann, C., J. Bergemann, G. Harrison und A. R. Young** (2001) Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers. *Lancet* **357**, 935-936.

## **Danksagung**

Hiermit möchte ich der Beiersdorf AG Hamburg, insbesondere Herrn Dr. K.-P. Wittern, Herrn Dr. H. Wenck, Herrn Dr. F. Stäb und Herrn Prof. Dr. U. Hoppe, für die Möglichkeit danken, meine Promotionsarbeit am Paul Gerson Unna Forschungszentrum durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Bergemann, Herrn Dr. F. Stäb und Herrn Prof. W. Schäfer für die interessante Themenstellung, die intensive Betreuung vor Ort sowie die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. K. Harbers des Heinrich-Pette-Instituts (Hamburg) möchte ich mich für die Bereitschaft bedanken, das Korreferat zu übernehmen.

My very special thanks to Prof. Dr. A. R. Young (King's College London, UK) for all the fruitful discussions, motivating words and the support on the telephone or by e-mail.

Frau M.-C. Leneveu-Duchemin und Herrn R. Hargens danke ich für die Unterstützung bei der Statistik.

Bei Herrn Dr. S. Gallinat möchte ich mich für das Korrekturlesen der Dissertation bedanken. Ebenso gilt mein großer Dank allen weiteren Mitgliedern des Labors Molekularbiologie (Maresa Eckhardt, Kirsten Venzke, Heiko Mielke und Frau Dr. Ute Breitenbach) für die Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Bei allen Mitarbeitern des Forschungsbereichs sowie den Doktoranden der Forschung und Entwicklung der Beiersdorf AG Hamburg möchte ich mich ganz herzlich für das nette Arbeitsklima bedanken.

Und natürlich danke ich meinen Freunden und vor allem Peter für alles, die Geduld und Hilfe, die Überlebenspakete und Apfelstückchen, ...

## **Lebenslauf**

|                     |  |
|---------------------|--|
| 24.12.1969          | geboren in Neumünster  |
| 08. 1976 – 07. 1980 | Grund- und Hauptschule Boostedt  |
| 08. 1980 – 05. 1989 | Holstenschule Neumünster, Abschluss: Abitur  |
| 09. 1989 – 05.1995  | Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Abschluss: Diplom   |
| 05. 1994 – 05. 1995 | Molekularbiologische Diplomarbeit am Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  |
| 12. 1995 – 01. 1998 | Aufenthalt in Neuseeland   |
| 06. 1996 – 11. 1997 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin im molekularbiologischen Labor des Departments of Entomology and Animal Ecology der Lincoln University, Neuseeland |
| 11. 1998 – 02. 2002 | Dissertation in der Abteilung Molekularbiologie des PGU-Forschungszentrums der Beiersdorf AG in Hamburg  |

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Christine Lahmann, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Hamburg, den 15.02.2002

---

(Christine Lahmann)