

**Die UVB-abhängige Induktion des Vaskulären Endothelialen  
Wachstumsfaktors (VEGF) wird in epidermalen Zellen autokrin durch  
den Transformierenden Wachstumsfaktor alpha (TGF $\alpha$ ) reguliert:  
Bedeutung für die UVB-induzierte Angiogenese**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von  
Ralf Blaudschun  
aus Vechta

Marburg/Lahn 2000

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: **24.04.2000**

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. K. Scharffetter-Kochanek

Tag der mündlichen Prüfung am: **26.04.2000**

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	Seite
<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2. Einleitung</b> .....	2
2.1 <i>Umfassende Auswirkungen des Ozonlochs auf den menschlichen Organismus</i> .....	2
2.1.1 Funktion und Entstehung von Ozon in der Atmosphäre.....	2
2.1.2 Ursachen der anthropogenen Ozonzerstörung .....	4
2.1.3 Der Einfluß der Atmosphäre auf die solare UV-Belastung in Höhe der Erdoberfläche .....	5
2.2 <i>Auswirkungen von UVB-Strahlung auf den menschlichen Organismus</i> .....	8
2.2.1 Wirkungen von UVB-Strahlung auf Haut und Bindegewebe .....	12
2.2.1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut.....	12
2.2.1.2 Wirkungen von UVB-Strahlung auf die menschliche Haut .....	15
2.2.2 Wirkungen von UVB-Strahlung auf die Entwicklung von Hauttumoren .....	18
2.2.2.1 Direkte Effekte von UVB-Strahlung auf die Entstehung von Hauttumoren.....	21
2.2.2.2 Indirekte Auswirkungen von UVB-Strahlung auf die Entstehung von Hauttumoren.....	26
2.3 <i>Zielsetzung</i> .....	29
<b>3. Material</b> .....	30
3.1 Geräte.....	30
3.2 Zellkulturmedien und Zusätze.....	30
3.3 Verbrauchsmaterialien .....	31
3.4 Chemikalien und Reagenzien.....	31
3.5 Antikörper .....	32
3.6 Zytokine .....	32

---

3.7	Enzyme.....	32
3.8	DNA-Isolierung.....	32
3.9	Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) .....	33
3.10	Lösungen, Medien, Puffer .....	33
3.11	Primer .....	34
3.12	Bakterienstämme .....	34
3.13	Vektoren .....	35
3.14	Zellstämme und Zelllinien.....	35
3.15	Mausstämme.....	35
3.16	Biopsien von humanen Plattenepithelkarzinomen und von UVB- bestrahlter Kontrollhaut .....	36
<b>4.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>37</b>
4.1	<b><i>Präparation und Analyse von DNA</i></b> .....	<b>37</b>
4.1.1	Alkohol-Fällung von DNA .....	37
4.1.2	Aufreinigung von DNA über eine Chloroform/Phenol- Extraktion .....	37
4.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
4.1.3.1	Photometrische Bestimmung von DNA- und RNA- Konzentrationen .....	38
4.1.3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA über Intensitätsvergleiche von DNA-Banden in Agarosegelen.....	38
4.1.4	Restriktionsanalysen von DNA .....	39
4.1.5	DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	39
4.1.6	PCR-abhängige <i>in vitro</i> Mutagenese .....	41
4.1.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	44
4.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
4.1.8.1	Phenol-Extraktion.....	46
4.1.8.2	Isolierung über 'QUIAEX-DNA-Gel-Extraction-Kit' .....	46
4.1.8.3	Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	47
4.1.9	Klonierung von DNA.....	47
4.1.9.1	Dephosphorylierung der Vektor-DNA .....	47

---

4.1.9.2	Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase .....	48
4.2	<b>Techniken zur Arbeit mit Escherichia coli</b> .....	49
4.2.1	Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien .....	49
4.2.2	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien .....	49
4.2.3	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	50
4.2.3.1	Präparation von Plasmid-DNA für analytische Zwecke .....	50
4.2.3.2	Präparation von Plasmid-DNA für präparative Zwecke .....	50
4.3	<b>Techniken und Methoden zur Arbeit mit humanen Zellen</b> .....	52
4.3.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	52
4.3.2	Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen.....	53
4.3.3	Vitalitätsbestimmung von Zellen.....	54
4.3.4	Mykoplasmentest .....	55
4.3.5	UVB-Bestrahlung von Zellen .....	56
4.3.5.1	Monochromatische UVB-Bestrahlung .....	56
4.3.5.2	Bestrahlung von Zellen mit dem Gesamt-UVB-Spektrum .....	57
4.3.5.3	Repetitive UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen .....	58
4.3.6	Induktion der VEGF <sub>165</sub> -Expression durch ROS-generierende Systeme.....	58
4.3.6.1	Intrazelluläre Generierung von Superoxidanionen (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ).....	58
4.3.6.2	Extrazelluläre Generierung von Superoxidanionen (O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ) und Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	59
4.3.7	Neutralisation der UVB-induzierten VEGF <sub>165</sub> -Expression durch Antikörper gegen TGFα .....	59
4.3.8	Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen .....	60
4.3.9	RNA-Präparation aus HaCaT-Zellen.....	62
4.3.9.1	Isolierung von RNA aus Zellkulturen .....	62
4.3.9.2	RNase Protection Assay .....	62
4.3.10	Quantifizierung von Gesamtprotein.....	63
4.3.10.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	63
4.3.10.2	Proteinbestimmung nach Lowry .....	63
4.3.11	Quantitativer Nachweis von VEGF <sub>165</sub> -, TGFα- und EGF-Proteinen .....	64

4.3.12	Analyse der UVB-induzierten Phosphorylierung des EGF-Rezeptors .....	65
4.3.12.1	Präparation von Zelllysaten.....	65
4.3.12.2	Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors .....	65
4.3.12.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen.....	66
4.3.12.4	Elektrotransfer von Proteinen.....	68
4.3.12.5	Immunodetektion des phosphorylierten EGF-Rezeptors .....	68
4.4	<b>Analyse der VEGF-Regulation in muriner und humaner Haut</b> .....	70
4.4.1	UVB-Bestrahlung haarloser Skh-1-Mäuse und humaner Haut .....	70
4.4.1.1	Bestrahlung von Skh-1-Mäusen mit Einzeldosen des gesamten UVB-Spektrums .....	70
4.4.1.2	UVB-Bestrahlung von humaner Haut zur Analyse der VEGF-Expression .....	71
4.4.1.3	Repetitive UVB-Bestrahlung von Maushaut zur Untersuchung der UVB-induzierten Angiogenese.....	71
4.4.2	Isolierung von Gesamtprotein aus muriner Epidermis .....	72
4.4.3	Immunohistologische Untersuchung von UVB-bestrahlter muriner und humaner Haut und Plattenepithelkarzinomen .....	72
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	76
5.1	VEGF wird in Plattenepithelkarzinomen aus sonnenexponierten anatomischen Arealen und in normaler Epidermis nach UVB-Bestrahlung exprimiert.....	77
5.2	UVB bewirkt eine zeitabhängige Induktion der mRNA-Expression verschiedener VEGF-Isoformen in HaCaT-Zellen .....	79
5.3	Die Expression von VEGF <sub>165</sub> ist auf Proteinebene nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen im Vergleich zu sekundären Keratinozyten verstärkt .....	83
5.4	Repetitive UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen führt zu einem kumulativen Anstieg der VEGF <sub>165</sub> -Expression.....	85
5.5	Die UVB-Wellenlängen von 285 bis 295 nm sind bei der VEGF <sub>165</sub> -Induktion wirksamer als der Bereich ab 305 nm.....	86

---

5.6	Die UVB-bedingte VEGF <sub>165</sub> -Induktion wird durch eine Gruppe von SP-1/AP-2-Bindungsstellen (-1133 bis -1107) im humanen VEGF-Promotor vermittelt .....	89
5.7	Die UVB-induzierte VEGF-Promotoraktivität und VEGF <sub>165</sub> -Expression wird durch Mithramycin verringert .....	92
5.8	Eine Deletion der SP-1/AP-2-Gruppe (-1133 bis -1107) im VEGF-Promotor verhindert die Promotoraktivierung durch UVB-Bestrahlung .....	95
5.9	Die UVB-bedingte Induktion der VEGF <sub>165</sub> -Synthese in HaCaT-Zellen ist nicht auf den direkten Einfluß reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen .....	98
5.10	Die UVB-Induktion von VEGF <sub>165</sub> erfolgt über lösliche Faktoren .....	110
5.11	TGF $\alpha$ vermittelt autokrin die Induktion von VEGF <sub>165</sub> nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen und Keratinozyten .....	113
5.12	Die UVB-Induktion von VEGF <sub>165</sub> wird durch Phosphorylierung des EGF-Rezeptors initiiert .....	115
5.13	Die UVB-induzierte Synthese von VEGF besitzt auch <i>in vivo</i> für die Angiogenese der Haut von zentraler Bedeutung .....	120
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>124</b>
6.1	UVB induziert VEGF <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	127
6.2	Die UVB-Induktion von VEGF wird autokrin durch TGF $\alpha$ vermittelt .....	130
6.3	Die UVB-Induktion von TGF $\alpha$ und VEGF ist Folge einer UVB-bedingten Phosphorylierung des EGF-Rezeptors .....	137
6.4	VEGF ist bei der Induktion angiogenetischer Prozesse in der Haut nach UVB-Bestrahlung von zentraler Bedeutung .....	139
<b>7.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>143</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>VI</b>

# 1. Zusammenfassung

Ein Zusammenhang zwischen chronischer Sonnenexposition der Haut und vermehrter Bildung von Gefäßen bei der Photoalterung und Photokarzinogenese der Haut mit vorzeitiger Alterung und Ausbildung nicht-melanozytärer und melanozytärer Tumoren der Haut kann als wissenschaftlich gesichert angesehen werden. Teleangiektasien, die durch eine Zunahme und Vergrößerung kutaner Blutgefäße gekennzeichnet sind, und die Entwicklung stark vaskularisierter Hauttumoren sind charakteristische Endpunkte einer chronisch sonnenexponierten und sonnengeschädigten Haut. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der UV-induzierten pathophysiologischen Angiogenese sind weitgehend unbekannt. In der Tumorprogression sind Angiogenesefaktoren wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, ein multifunktionales Zytokin mit mitogener Aktivität für Endothelzellen, von zentraler Bedeutung, da Tumorwachstum und -metastasierung von der Ausbildung eines tumorversorgenden Blutgefäßsystems abhängig sind. In der vorliegenden Arbeit sollte mit molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden untersucht werden, ob und in welcher Form solare UVB-Strahlung als schädigende Komponente des Sonnenlichts auf der Erdoberfläche die Regulation von VEGF beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, daß UVB-Bestrahlung den Angiogenesefaktor VEGF in epidermalen Zellen auf Proteinebene mit biphasischer Expression nach 4 bzw. 24 h maximal induziert. In Untersuchungen der UVB-induzierten VEGF-Promotoraktivität wurde durch transiente Transfektionen von HaCaT-Zellen mit Deletionskonstrukten des humanen VEGF-Promotors und in Experimenten unter Verwendung neutralisierender Antikörper der transformierende Wachstumsfaktor alpha ( $TGF\alpha$ ) als Mediator der sekundären VEGF-Expression nach UVB-Bestrahlung identifiziert. Die primäre Induktion von VEGF und die Synthese von  $TGF\alpha$  sind abhängig von der UVB-Aktivierung des EGF-Rezeptors (EGF-R) und konnten durch den EGF-R-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035 signifikant inhibiert werden. Die UVB-abhängige VEGF-Expression wurde *in vivo* in menschlicher Haut immunohistologisch bestätigt. Durch die signifikante Verminderung der UVB-abhängig gesteigerten Angiogenese in der Epidermis repetitiv bestrahlter haarloser Mäuse konnte nach intraperitonealer Injektion neutralisierender Antikörper gegen VEGF die kausale Bedeutung von VEGF *in vivo* im Mausmodell belegt werden.

Zusammengefaßt konnten in dieser Arbeit *in vitro* und *in vivo* die Bedeutung von VEGF für angiogenetische Prozesse nach UVB-Exposition herausgearbeitet und wesentliche Wege seiner Signaltransduktion identifiziert werden.

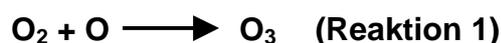
## 2. Einleitung

### 2.1 Umfassende Auswirkungen des Ozonlochs auf den menschlichen Organismus

#### 2.1.1 Funktion und Entstehung von Ozon in der Atmosphäre

Die stratosphärische Zerstörung von Ozon ist in den vergangenen Jahren mit Auftreten des „Ozonlochs“ bekannt geworden. Dieses „Ozonloch“ ist mit einer Größe von ca. 22 Millionen Quadratkilometern bisher auf die antarktischen Gebiete der Erde beschränkt. Weniger bekannt ist, daß es auch über weiten Bereichen der Erde zu einer Verminderung der Ozonschicht kommt. Die Depletion von Ozon findet in der Stratosphäre statt, die sich über einen Bereich von 15 bis 50 km Höhe erstreckt. Die untere Grenze variiert in Abhängigkeit von der geographischen Lage und der Jahreszeit zwischen 12 und 18 km über der Erde. Innerhalb der Stratosphäre befindet sich zwischen 16 und 30 km Höhe eine Schicht von Ozonmolekülen, die durch natürliche Prozesse gebildet werden. Das Ozonmolekül entsteht in der Stratosphäre durch eine chemische Anlagerung eines einzelnen Sauerstoffatoms an den Luftsauerstoff (Reaktion 1).

Dieser Prozeß der Ozonbildung wird durch die folgende chemische Formel beschrieben:



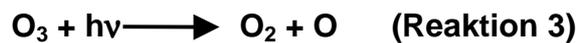
Der Luftsauerstoff ( $\text{O}_2$ ) gelangt durch die photosynthetische Aktivität von Pflanzen und Bakterien in die Atmosphäre und stellt neben molekularem Stickstoff den zweithäufigsten Bestandteil der Atmosphäre (21 %) dar. Die zur Ozonbildung in der Stratosphäre erforderlichen Sauerstoffatome ( $\text{O}$ ) müssen unter Einwirkung von solarer UV-Strahlung erzeugt werden (Reaktion 2).

Dieser Prozeß, welcher als Photodissoziation oder auch Photolyse von Sauerstoff bezeichnet wird, läßt sich durch die folgende Formel darstellen:



Die Wellenlänge der UV-Strahlung muß dazu kleiner als 242,4 nm sein, damit die Strahlung genügend Energie besitzt, um den molekularen Sauerstoff zu spalten.

Das durch die Reaktionen (1) und (2) erzeugte Ozon ist in der Lage, Licht mit Wellenlängen kleiner als 1100 nm zu absorbieren. Insbesondere ist es fähig, in der Stratosphäre auch die solare UV-Strahlung mit Wellenlängen zwischen 170 und 325 nm zu absorbieren. Infolge der dadurch aufgenommenen Energie wird das Ozonmolekül wieder zerstört (Reaktion 3):

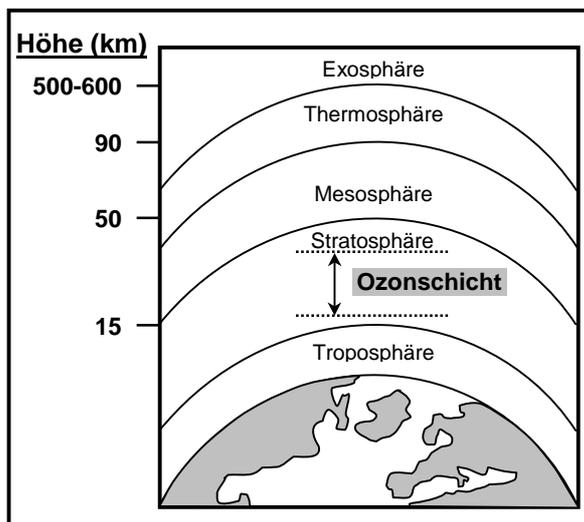


Dieser natürliche Abbauprozess des Ozons ist die Ursache für die Abschirmung der Erdoberfläche vor der gefährlichen solaren UV-Strahlung mit Wellenlängen von weniger als 320 nm. Dabei wird Ozon aber erst deutlich wirksam bei Wellenlängen von unter 290 nm, so daß zwischen 290 und 320 nm noch UV-Strahlung der Sonne die Erdoberfläche erreichen kann. Zusätzlich zum UV-bedingten Ozonabbau kommt es zu einer Zersetzung von Ozon durch in der Atmosphäre natürlich vorkommende Katalysatoren wie NO und HO<sup>•</sup>. Synthese und Abbau von Ozon stehen demzufolge in einem sensiblen Gleichgewicht.

In den vergangenen Jahrzehnten ist dieses Gleichgewicht durch die von Menschen bedingte Freisetzung künstlicher Katalysatoren wie ClO und BrO (Chlor- bzw. Brommonoxid) empfindlich gestört worden, was weltweit eine systematische Verminderung der Ozonschicht (Farman et al., 1985; SORG, 1990) und eine dadurch bedingte Zunahme der UVB-Strahlung auf der Erdoberfläche zur Folge hat.

## 2.1.2 Ursachen der anthropogenen Ozonzerstörung

Bei der Erdatmosphäre handelt es sich um eine Gashölle, die durch die Erdanziehung zusammengehalten wird. Die atmosphärische Luft ist ein Gasgemisch, das im Trockenzustand zu etwa 78 % aus Stickstoff ( $N_2$ ), zu 21 % aus Sauerstoff ( $O_2$ ), zu 0,9 % aus Argon (Ar) und



**Abb. 1 Aufbau der Atmosphäre**

zu 0,03 % aus Kohlendioxid ( $CO_2$ ) besteht.

Daneben sind noch Spuren der übrigen Edelgase sowie einige andere chemische Stoffe in der Atmosphäre vertreten. Die Atmosphäre wird nach ihren chemischen und elektrischen Eigenschaften, nach der Temperaturverteilung und nach ihrer Zusammensetzung in verschiedene Schichten untergliedert (Abb. 1). Als die der Erde am nächsten gelegene Schicht ist die Troposphäre für das Wetter von großer Bedeutung. In einem mehr oder weniger fließenden Übergang

folgen Stratosphäre, Mesosphäre, Thermosphäre und Exosphäre. Ein Großteil des atmosphärischen Ozons konzentriert sich innerhalb der Stratosphäre in einer Schicht mit einer maximalen Ozondichte in einer Höhe von 20 bis 25 km. Die Ozonschicht endet unterhalb von etwa 10 bis 15 km Höhe über der Erde. Auf dem Weg zur Erdoberfläche werden die Photonen der Sonnenstrahlung mit zunehmender Dichte des atmosphärischen Sauerstoffs ( $O_2$ ) mehr und mehr absorbiert, wobei mit dem frei werdenden atomaren Sauerstoff (O) vermehrt Ozon nach Reaktion 1 erzeugt wird. In etwa 10 bis 15 km Höhe ist der größte Teil der Photonen absorbiert, so daß die Photolyse des Sauerstoffs und damit die Ozonbildung zum Erliegen kommt.

Das sensible Gleichgewicht von Ozonbildung und -abbau wurde jedoch tiefgreifend durch bestimmte Verhaltensweisen des Menschen gestört. Es wurden große Mengen an künstlichen Katalysatoren in die Stratosphäre gebracht, so daß die Ozonschicht weltweit deutlich dünner geworden ist. In den vergangenen Jahren hat die Ozonschicht im globalen Mittel bereits einige Prozent ihres Ozongehaltes verloren. Die Folge ist ein Anstieg der bodennahen UV-Belastung, die jedoch regional unterschiedliche Ausmaße annehmen kann. Global gesehen gilt dabei bislang in Annäherung: Eine Abnahme der Ozonschicht um 1 % bewirkt eine 1,3 bis 1,5%ige Erhöhung an UV-Strahlung auf der Erdoberfläche (Coldiron, 1992).

Wie bereits im vorherigen Abschnitt erwähnt, wurde das empfindliche Gleichgewicht von UV-bedingter Ozonsynthese und dem durch natürliche Katalysatoren ( $\text{HO}^\bullet$  und  $\text{NO}$ ) bedingten Ozonabbau durch künstliche Katalysatoren nachhaltig gestört. Ausgangsprodukte dieser künstlich erzeugten Katalysatoren und damit verantwortlich für die Ozonzerstörung sind bestimmte Abbauprodukte der sogenannten Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffe (FCKWs) und der Halone, nämlich Chlor (Cl), Brom (Br) und Jod (J) (Molina und Rowland, 1974; Coldiron, 1992).

Aufgrund ihrer Stabilität und Ungiftigkeit wurden und werden diese Substanzen als Treib- und Kühlmittel in Spraydosen, Feuerlöschern, Kühlaggregaten und bei der Herstellung von Schaumstoffen eingesetzt. Gerade ihre Stabilität führt jedoch dazu, daß sie nach ihrer Freisetzung in die Atmosphäre nicht zerstört werden oder zumindest sehr langlebig sind. Dadurch sind im Laufe einiger Jahre ein Aufsteigen der Fluor-Chlor-Kohlenwasserstoffe bis in die Stratosphäre und eine weltweite gleichmäßige Verteilung möglich, wobei die FCKWs auch in die Bereiche der Ozonschicht gelangen (Coldiron, 1992).

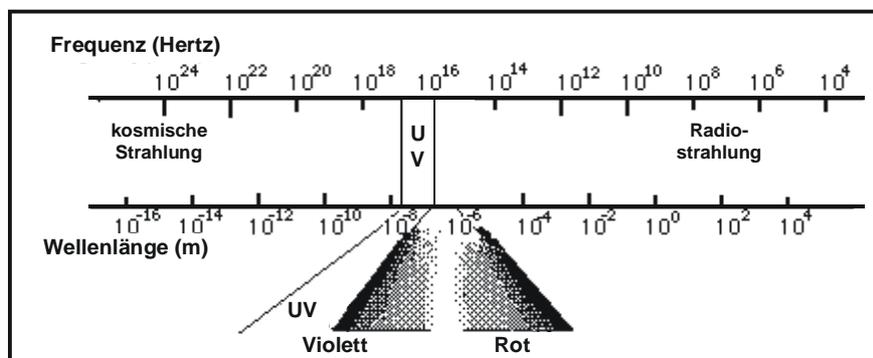
Durch die solare UV-Strahlung kommt es zur Spaltung (Photolyse) der FCKWs, wodurch u.a. die Atome Chlor (Cl) und Brom (Br) freigesetzt werden. Diese Atome reagieren aufgrund ihrer chemischen Natur mit freien Sauerstoffatomen (O) zu  $\text{ClO}$ - und  $\text{BrO}$ -Molekülen und verursachen in Folgereaktionen über die Bildung von Halogen-Radikalen als künstliche Katalysatoren die Spaltung von Ozonmolekülen.

### **2.1.3 Der Einfluß der Atmosphäre auf die solare UV-Belastung in Höhe der Erdoberfläche**

Die Ozonschicht in der Stratosphäre entsteht wie zuvor beschrieben als Folge der Absorption solarer UV-Strahlung durch molekularen Sauerstoff, wobei vorhandenes Ozon ebenfalls einen starken Absorber der UV-Strahlung darstellt. Ozon und die Prozesse der stratosphärischen Ozonbildung führen also dazu, daß ein Großteil der solaren Strahlung ausgefiltert wird, bevor sie die Erdoberfläche erreichen kann.

Die anthropogene Zerstörung des stratosphärischen Ozons zieht daher unmittelbar und unvermeidbar eine Intensitätszunahme der erdnahen UV-Strahlung nach sich. Die Folgen dieser verstärkten UV-Belastung auf den Menschen und seine biologische Umwelt sollen im folgenden näher beleuchtet werden.

Bei der UV-Strahlung (200 - 400 nm) handelt es sich wie auch beim sichtbaren Licht (400 - 750 nm) um elektromagnetische Strahlung, wobei beide Wellenlängenbereiche nur einen Teil des solaren Spektrums darstellen (Abb. 2).

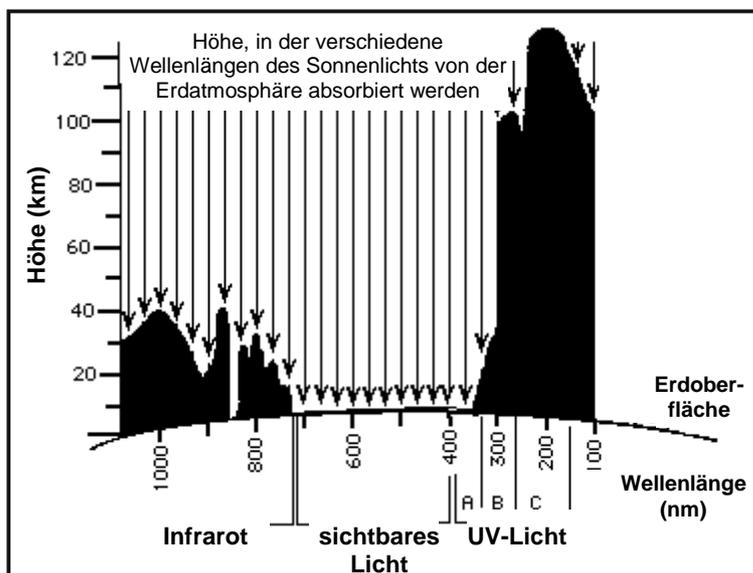


**Abb. 2 Einteilung und Klassifizierung des solaren Spektrums**

Der Mensch kann elektromagnetische Strahlung teilweise bewußt wahrnehmen. Teile der Infrarotstrahlung ( $\lambda > 780$  nm) werden von der Haut als Wärme empfunden. Im Wellenlängenbereich von 400 - 750 nm ist elektromagnetische Strahlung als ‚sichtbares Licht‘ mit dem menschlichen Auge wahrnehmbar. Die ultraviolette Strahlung schließt sich unterhalb von 400 nm an das sichtbare Spektrum an und läßt sich in verschiedene UV-Bereiche unterteilen: UVA (320 - 400 nm), UVB (280 - 320 nm) und UVC (100-280 nm). Der Mensch ist jedoch nicht in der Lage, UV-Strahlung direkt und bewußt wahrzunehmen. Dies bedeutet nicht, daß die UV-Strahlung keinerlei Wirkung auf den menschlichen Organismus hat. Im Gegenteil: Mit abnehmender Wellenlänge verursacht die zunehmende Energie der UV-Strahlung weitreichende Veränderungen und z. T. irreversible Schädigungen in Grenzorganen wie z. B. Augen oder Haut.

In bezug auf die biologische Wirksamkeit kommt der UVB-Strahlung aus medizinischer Sicht die größte Bedeutung zu. Die energiereichere UVC-Strahlung kann die Atmosphäre nicht durchdringen. Daher birgt die UVB-Strahlung das stärkste gesundheitsgefährdenste Potential in sich (de Gruijl, 1996; de Gruijl und Van der Leun, 1994; Ziegler et al., 1994; Forbes, 1981). Bislang wird ein Großteil der UVB-Strahlung von der Ozonschicht gefiltert, so daß beispielsweise der Anteil von UVB-Strahlung auf der Erde bei 0,5 % mit einer Grenzwellenlänge von etwa 295 nm (Zölzer und Kiefer, 1989) liegt. In Abb. 3 ist die Intensitätsabschwächung der auf die Erde einfallenden Sonnenstrahlung für die Erdatmosphäre mit einer intakten Ozonschicht dargestellt. Die solare Strahlung dringt abhängig von der Wellenlänge unterschiedlich tief in die Atmosphäre ein. Dargestellt ist die

wellenlängenabhängige Eindringtiefe der solaren Strahlung in die Erdatmosphäre. Die Abbildung zeigt für die verschiedenen Wellenlängen die Höhe über dem Erdboden, bis zu der die Strahlung jeweils absorbiert wird.



**Abb. 3    Absorption solarer Strahlung durch die Erdatmosphäre**

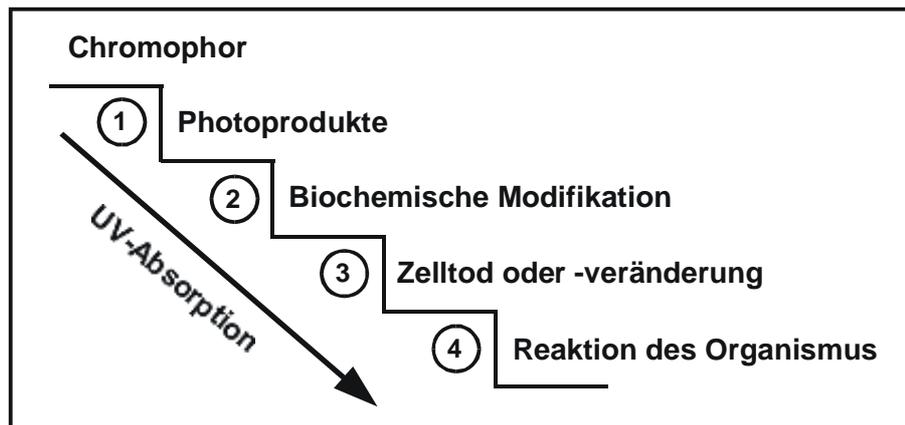
Die Erdatmosphäre hat entscheidenden Einfluß auf die Intensität der UV-Strahlung am Erdboden. Durch vielfältige Prozesse in der Atmosphäre, wie z. B. der ozonbedingten UV-Absorption oder aber der Strahlungsabsorption durch Wolken oder Luftverschmutzung, kommt es zur Intensitätsabnahme der solaren UV-Strahlung auf ihrem Weg durch die Atmosphäre. Dies führt in vielen Wellenlängenbereichen zu einer vollständigen Blockade der Strahlung. Wie weiterhin aus Abb. 3 zu erkennen ist, erreichen im wesentlichen nur sichtbares Licht (400 - 750 nm) und UVA-Strahlung die Erdoberfläche. Für die Abschirmung des UVB-Strahlung ist die Ozonschicht verantwortlich, während UVC-Strahlung (100 - 280 nm) hauptsächlich durch den atmosphärischen Sauerstoff bei der Erzeugung des Ozons und teilweise auch durch Ozon selbst absorbiert wird und somit nicht zur Erdoberfläche gelangt. Über einen Wellenlängenbereich von etwa 200 bis zu 325 nm ist Ozon der wesentliche UV-Filter der Erde. Strahlung mit noch größerer Energie ( $\lambda < 100$  nm) wird hauptsächlich durch den Stickstoff ( $N_2$ ) der Luft und durch atomaren Sauerstoff in höheren Schichten der Atmosphäre herausgefiltert. Während molekularer Sauerstoff, atomarer Sauerstoff und molekularer Stickstoff ( $N_2$ ) in großen Mengen in der Atmosphäre vorhanden sind -  $O_2$  und  $N_2$  sind Hauptbestandteile der Atmosphäre - ist Ozon nur als Spurengas vertreten. Dennoch ist die Ozonschicht in der Lage, den gesamten, potentiell gesundheitsgefährdenden Anteil der

UV-Strahlung abzublocken. Die Ozonschicht vermindert die Gesamtintensität der solaren UVB- und UVC-Strahlung so weit, daß am Erdboden nur noch der  $2 \times 10^{-35}$ ste Teil ankommt. Ozon ist dabei für UVB-Strahlung ein derart wirksamer Schutzschild, daß bereits in den ersten 3% der Ozonschicht 90% des einfallenden UVB absorbiert wird. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch, daß diese Werte lediglich für eine intakte, unveränderte Ozonschicht zutreffen. Geringste Verringerungen der Ozonmenge können sich unmittelbar und massiv auf die Intensität der UVB-Strahlung am Erdboden und damit auf die Gesundheit von Menschen, Tieren und Pflanzen auswirken.

## **2.2 Auswirkungen von UVB-Strahlung auf den menschlichen Organismus**

Betrachtet man den Einfluß solarer und artifizieller UV-Strahlung auf den menschlichen Organismus, ist eine Abwägung positiver und negativer Aspekte der UV-Strahlung unabdingbar. Dabei verursacht der UV-Bestandteil der solaren Strahlung Schäden an der Haut wie zum Beispiel photoallergische oder phototoxische Reaktionen, UV-bedingte Hautalterung (Kligman und Kligman, 1986; Leyden, 1990; Scharffetter-Kochanek et al., 1997) oder Hautkrebs (Soffen und Blum, 1961; Rowe et al., 1992; Brash et al., 1991, 1996; Scharffetter-Kochanek et al., 1997). Auf der anderen Seite sind eine Reihe lebensnotwendiger Vorgänge bekannt, die vom Sonnenlicht oder speziell von der UV-Strahlung abhängig sind. Dazu gehören u. a. die Synthese des Vitamins D<sub>3</sub> in der Haut (Webb und Holick, 1988), immunmodulierende Wirkungen (De Fabo und Noonan, 1983), Therapie von Hautkrankheiten (Picot et al., 1992; Paul et al., 1993) sowie die Regulation des zirkadianen Rhythmus (Van der Leun und Van Weelden, 1986). Eine zentrale Stellung nimmt bei den positiven Auswirkungen der UV-Strahlung die Entdeckung ein, daß der UVB-Anteil der solaren Strahlung für die Synthese des Vitamin D<sub>3</sub> in der Haut unerlässlich ist (etwa 90 bis 95 % des Vitamin D-Bedarfs). Dieses Vitamin, bzw. seine Stoffwechselprodukte, ist bei einer Reihe von Regulationsmechanismen im menschlichen Organismus direkt oder indirekt beteiligt. Ausgangspunkt der Synthese ist das Provitamin D<sub>3</sub> (7-Dehydrocholesterol) in der Haut, das durch die Einwirkung des Sonnenlichtes zu Vitamin D<sub>3</sub> und schließlich in der Leber und Niere über das 25-Hydroxy-Vitamin (Calcidiol) zur aktiven Form des 1,25-Dihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> (Calcitriol) umgebildet wird.

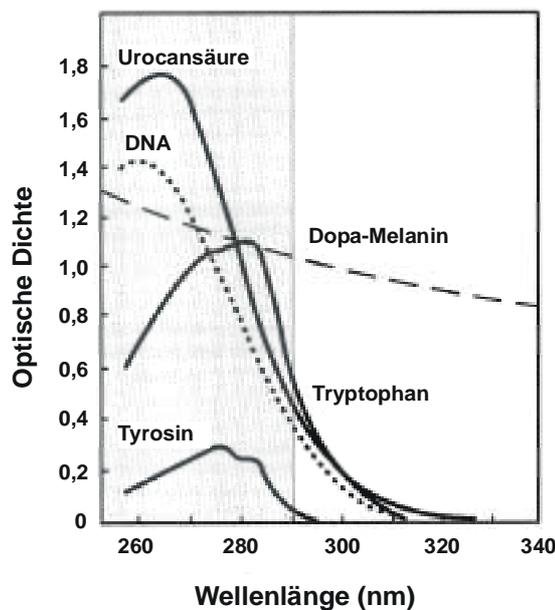
Bei einer Abwägung zwischen Nutzen und Risiko von UVB-Strahlung sollten diese Aspekte gerade bei der therapeutischen oder auch kosmetischen Anwendung der UVB-Strahlung berücksichtigt werden. Beim Menschen sind im wesentlichen drei unterschiedliche Organe von solarer oder auch artifizieller UVB-Strahlung betroffen: Das Auge, das Immunsystem und die Haut. Trotz unterschiedlichen Aufbaus ist allen gemeinsam das Vorhandensein von Molekülen, welche die Energie der solaren Strahlung absorbieren können.



**Abb. 4** Mögliche Auswirkungen der Absorption von UV-Strahlung

Derartige Chromophore sind in den Geweben bzw. Zellen dieser Organe vorhanden und in der Lage, in einer wellenlängenabhängigen Effizienz Lichtenergie zu absorbieren, was zu verschiedenen biologischen Effekten führen kann (Abb. 4). Durch die Absorption der Energie elektromagnetischer Strahlung werden Chromophore in einen energiereichen, sogenannten „angeregten Zustand“ überführt. Als Folge der Energieabsorption kommt es zu einer chemischen Veränderung (photochemische Reaktion) dieser Moleküle. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß die absorbierte Energie an andere Moleküle weitergegeben wird (sekundärer Energietransfer), oder daß die Energie als Licht (Fluoreszenz) oder Wärme abgegeben wird. Solche photochemischen Reaktionen von Chromophoren und die Reaktionen der Moleküle, an welche Energie von dem angeregten Chromophore weitergegeben wird, stellen den ersten Schritt einer Kette von Ereignissen dar, die letztendlich zu einer spezifischen, biologischen Antwort auf UV-Strahlung führt.

Die wellenlängenabhängige Absorption von Lichtenergie wird Absorptionsspektrum genannt, welches jeweils charakteristisch für verschiedene Klassen von Molekülen ist. In der Abb. 5 sind die Absorptionsspektren fünf verschiedener Chromophore dargestellt, welche in Haut und Auge vertreten sind und eine zentrale Rolle in der biologischen Wirksamkeit von UVB-Strahlung auf den menschlichen und auch tierischen Organismus einnehmen.



**Abb. 5 UV-Absorptionsspektren von verschiedenen Chromophoren des menschlichen Organismus**

(modifiziert nach Longstreth et al., 1998)

Diese Chromophore entsprechen DNA, Aminosäuren wie Tyrosin und Tryptophan, welche hauptsächlich verantwortlich sind für die UV-Absorption von Proteinen, trans-Urocansäure, ein Molekül, das in großen Mengen in den äußeren epidermalen Schichten der Haut vorkommt und Melanin, dem Pigment der Melanozyten. Als Folge der Energieabsorption kann es zu thermischen, mechanischen oder zu photochemischen Schäden in den betroffenen Zellen und Geweben kommen (Scharffetter-Kochanek und Schwarz, 1996). Dabei kommt es zu direkten phototoxischen Effekten durch Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und photosensibilisierenden Reaktionen. Die dabei durch primäre Effekte (Energieabsorption durch Chromophore) oder sekundäre Effekte (Energietransfer) auftretenden Schäden betreffen Nucleinsäuren (RNA und DNA), Proteine, Lipide (Lipidperoxidation) und Membranen (Urbach und Gange, 1986; Häder und Tevini, 1987; Moan und Peak, 1989; Smith, 1989; Zölzer und Kiefer, 1989; Kiefer, 1990; Kiefer et al., 1990; Salmon, 1990; Sage, 1993; Hightower et al., 1994). Die Energiezufuhr führt in Nucleinsäuren zu Protein-Nucleinsäure-Quervernetzungen, zu unplanmäßiger DNA-Synthese (Plaza et al., 1991), Einzelstrang-

brüchen (Peak et al., 1987; Matsumoto et al., 1991), Cyclobutan- und Pyrimidin-Dimeren (Peak et al., 1987; Mitchel und Nairn, 1989; Peak et al., 1989; Cleaver et al., 1991; Mitchel et al., 1991; Cadet et al., 1992). Bei Proteinen kommt es nach UV-Bestrahlung zu Schäden an stark UV-absorbierenden Aminosäuren wie Tryptophan, Cystin und Tyrosin (Creed, 1984a, b, c; Grossweiner, 1984; Bandyopadhyay et al., 1992; Sen et al., 1992). Zudem führt eine UV-Bestrahlung auf Proteinebene zur Bildung photosensibilisierender Moleküle (N-formyl-Kynurenin), zu Quervernetzungen („crosslinks“), zur Veränderungen der Tertiärstruktur ( $\beta$ -Faltblatt) und veränderter räumlicher Anordnung innerhalb der dreidimensionalen Proteinstruktur (Andley, 1987). Diese molekularen Schäden verursachen Störungen des Nucleinsäure-Stoffwechsels (Replikation, Transkription), Störungen innerhalb von Strukturproteinen (Linsen-Kristalline; Bermann, 1991) und Störungen der Enzymaktivität (Lactat-Dehydrogenase, Schmidt et al., 1992; Katalase und ATPasenreaktion, Cejkova und Lojda, 1994) mit entsprechenden Entzündungsreaktionen (Hruza und Pentland, 1993) und der Aktivierung UV-spezifischer Gene (UV-response genes) (Mai et al., 1989; Fornace, 1992).

Bei einer intakten Ozonschicht sind, wie bereits erwähnt, Anteile des solaren Spektrums mit einer Wellenlänge unter 290 nm auf der Erdoberfläche nicht vertreten, spielen also eine untergeordnete Rolle. Wie in Abb. 5 deutlich wird, zeigen alle dargestellten Moleküle mit Ausnahme von Melanin einen starken Abfall der Absorptionseigenschaften im Bereich des terrestrischen UVB-Spektrums (290 - 320nm) mit einer minimalen Absorption im UVA-Bereich ( $\lambda > 320$  nm). Eine Depletion der Ozonschicht führt unabdingbar zu einer Zunahme der UVB-Strahlung auf der Erde. Weltweite Messungen haben ergeben, daß es seit 1978 zu einem 3 %igen Abbau der Ozonschicht im globalen Mittel und seit 1983 jahreszeitlich bedingt zu einem bis zu 50 %igen Abbau der Ozonschicht über der Antarktis gekommen ist (Coldiron, 1992). Berechnungen amerikanischer Behörden (EPA; Environmental Protection Agency) über die zukünftige Entwicklung der Ozonproblematik haben ergeben, daß es unter den gegebenen Umständen zu einem weiteren 8 %igen Abbau der Ozonschicht pro Jahrzehnt kommen wird (Coldiron, 1992).

In den kommenden Jahren wird es dementsprechend zu einer verstärkten UVB-Belastung auf der Erdoberfläche kommen mit entsprechender Schädigung von Nahrungsketten, Pflanzen und des menschlichen Organismus. Wiederholte UV-Bestrahlung kann eine vorzeitige Alterung der Haut verursachen. Dabei spielen Veränderungen des Bindegewebe durch UV-Strahlung eine große Rolle. Weiterhin hat UV-Strahlung wesentlichen Einfluß auf das Immunsystem der Haut und des gesamten Organismus. Die Unterdrückung des Immunsystems durch UVB-Strahlung ist nicht nur für die verminderte Abwehr von

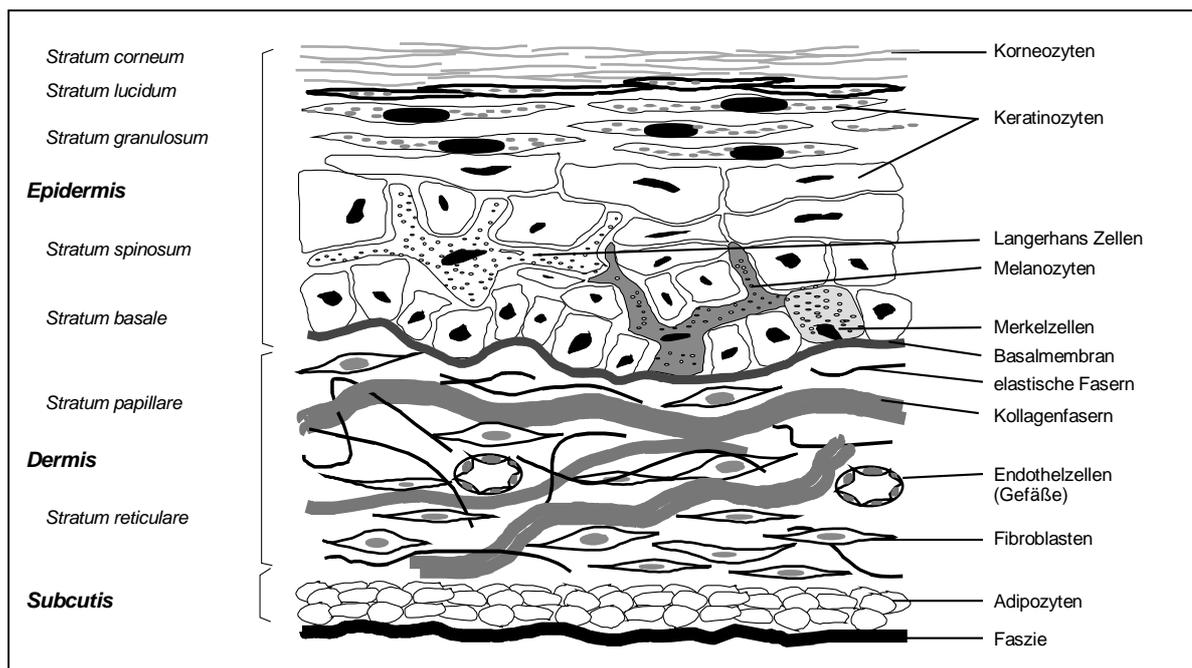
Infektionen sondern auch für die Entstehung von Hauttumoren von Bedeutung. UVB-Strahlung verursacht zudem die Kataraktbildung, eine Linsentrübung des Auges.

Die folgenden Abschnitte sollen eine Übersicht über die Wirkungen von UVB-Strahlung auf den menschlichen Organismus geben. Im Speziellen sollen die Auswirkungen einer erhöhten UVB-Strahlung auf die Haut unter dem Aspekt der vorzeitigen Alterung und der Entwicklung von Hauttumoren erläutert werden.

## 2.2.1 Wirkungen von UVB-Strahlung auf Haut und Bindegewebe

### 2.2.1.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Haut

Bevor in diesem Kapitel auf den Einfluß der UVB-Strahlung auf Bindegewebe und Haut eingegangen wird, soll zur Erlangung eines besseren Überblicks kurz auf den Aufbau der menschlichen Haut eingegangen werden (Abb. 6).



**Abb. 6** Aufbau der menschlichen Haut

Die Haut stellt mit bis zu 2 m<sup>2</sup> Oberfläche das größte Organ des Menschen dar. Sie dient als schützende Barriere gegenüber physikalischen, chemischen oder mikrobiellen Einwirkungen und übernimmt wichtige Funktionen im Stoffwechsel. Um ihren vielfältigen Funktionen nachzukommen, besitzt die menschliche Haut eine komplexe Struktur, wobei sie sich von außen nach innen in Oberhaut (Epidermis), Lederhaut (Corium oder Dermis) und Unterhaut

(Tela subcutanea oder Subcutis) gliedert (Abb. 6). Epidermis und Dermis stellen die Haut im eigentlichen Sinne dar und werden auch als Cutis bezeichnet. Die Epidermis setzt sich aus fünf verschiedenen Schichten zusammen, diese sind Hornschicht (Stratum corneum), Glanzschicht (Stratum lucidum), Körnerzellschicht (Stratum granulosum), Stachelzellschicht (Stratum spinosum) und Basalschicht (Stratum basale). Stratum spinosum und Stratum basale werden auch als Stratum germinativum (Regenerationsschicht) bezeichnet, da hier durch mitotische Teilungen fortwährend neue Zellen entstehen. Diese Zellen wandern in die oberen drei Zellschichten (Verhornungsschicht) ein, wo sie eine Umstrukturierung der in ihnen enthaltenen Keratinfilamente erfahren und zu kernlosen Korneozyten (Hornzellen) differenzieren, um schließlich ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel zu bilden. Die äußeren Bereiche des Stratum corneum schilfern regelmäßig ab (Desquamatio insensibilis), so daß sich die Epidermis innerhalb von etwa 27 Tagen vollständig erneuert. Zusätzlich enthält die Epidermis die melaninbildenden Zellen des Pigmentsystems (Melanozyten), dendritische Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen) und Sinneszellen, die möglicherweise als Mechanorezeptoren fungieren können (Merkel-Zellen). Die Epidermis wird durch die Basalmembran, die aus Lamina lucida externa, Lamina densa und Lamina lucida interna besteht, von der Dermis getrennt. Die Basalmembran bildet durch ihren speziellen Aufbau aus verschiedenen Glykoproteinen wie beispielsweise Laminin, Kollagen Typ IV oder Entaktin einen selektiven molekularen Filter, den verschiedene Tumor- oder Entzündungszellen passieren können.

Auch in der Dermis lassen sich verschiedene Schichten differenzieren, dies sind Papillarschicht (Stratum papillare) und Geflechschicht (Stratum reticulare). Über die bindegewebigen Papillen des Stratum papillare ist die Dermis fest mit der Epidermis verzahnt. In diesem Bereich liegen auch Kapillarschlingen, die die Versorgung der Epidermis sicherstellen, initiale Lymphgefäße, freie, bis in die Epidermis verzweigende Nervenendigungen, Wärme- und Kälterezeptoren sowie Tastsinnorgane wie beispielsweise Vater-Pacini-Lamellenkörperchen oder Meissner-Tastkörperchen. Als freie Bindegewebszellen werden, neben Fibroblasten und Mastzellen, die Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten) gefunden. Den Raum zwischen zellulären und faserigen Elementen (Interstitium) füllt eine gallertige Flüssigkeit aus, die sogenannte Interzellulärschicht. Faserige Elemente und Interzellulärschicht bilden gemeinsam die extrazelluläre Matrix, in der sich Zellen bewegen und miteinander interagieren können. Das Stratum reticulare enthält weniger Zellen, ihre Kollagenfasern bilden jedoch ein

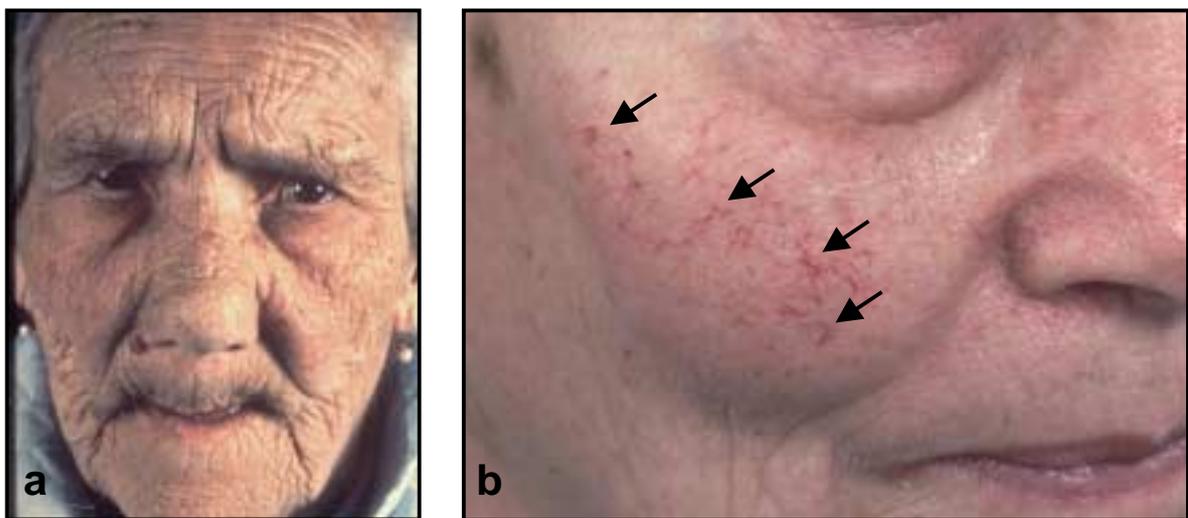
dichtes Netzwerk, das überwiegend parallel zur Körperoberfläche ausgerichtet ist und in dessen Maschen sich Fasern des elastischen Bindegewebes verzweigen. Als eigenständige Strukturen der Haut sind Haarfollikel, Talg-, Schweiß- und Duftdrüsen in die Dermis eingebettet.

Das Bindegewebe der Haut ist in komplexer Weise aus Strukturproteinen und Bindegewebszellen (Fibroblasten) aufgebaut, wobei die Fibroblasten für die Synthese und den Abbau dieser Strukturproteine verantwortlich sind. Zu ihnen werden verschiedene multifunktionale Glykoproteine, Proteoglykane und Faserproteine wie Elastin und unterschiedliche Kollagene gezählt (Ross, 1975; Scharffetter-Kochanek und Schwarz, 1996; Kielty und Shuttleworth, 1997). Gerade den Kollagenen kommt in der Haut eine besondere, strukturelle und funktionelle Bedeutung zu. Beispielsweise verbindet ein sehr langes, stäbchenförmiges Kollagen vom Typ VII die Epidermis mit der Dermis und ist selber mit anderen Strukturproteinen der Basalmembranzzone wie Kollagen Typ IV, Laminin, Nidogen und Kalinin in molekular noch nicht bekannter Weise vernetzt. Kollagen Typ I ist mit einem Anteil von über 80 % mengenmäßig das wesentliche Strukturprotein der Dermis und ist insbesondere für deren Reißfestigkeit und Stabilität verantwortlich (van der Rest und Garrone, 1991; Fleischmajer et al., 1990).

Der Abbau einzelner Bindegewebsproteine wird in kontrollierter Weise durch Enzyme, die zur Familie der Matrix-Metalloproteinasen gehören, reguliert. Die Aktivität dieser Matrix-Metalloproteinasen wird wiederum von Fibroblasten synthetisierten Inhibitoren (TIMP, tissue inhibitor of metalloproteinases) kontrolliert (Docherty et al., 1992; Matrisian, 1992; Kahari und Saarialho-Kere, 1997; Kugler, 1999). Letztendlich garantiert ein ausgeglichenes Verhältnis der Synthese von Strukturproteinen auf der einen Seite und der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren auf der anderen Seite die Funktion des Bindegewebes der Haut. Dieses sensible Gleichgewicht wird jedoch durch UV-Strahlung entscheidend gestört (Stein et al., 1989; Scharffetter et al., 1991; Scharffetter-Kochanek et al., 1992, 1997; Petersen et al., 1992; Herrmann et al., 1993; Wlaschek et al., 1993, 1994, 1995, 1997; Koivukangas et al., 1994; Wenk et al., 1999). Darüber hinaus führt eine chronische UVB-Exposition vermutlich über eine gestörte Zell-Matrix-Interaktion und durch ein Ungleichgewicht zwischen Matrix-Synthese und Matrix-Abbau zu erheblichen Störungen in Prozessen wie der Wundheilung und zur Begünstigung von Tumorinvasion und Metastasierung.

### 2.2.1.2 Wirkung von UVB-Strahlung auf die menschliche Haut

Chronische UV-Exposition gilt als wesentliche Ursache der frühzeitigen Alterung der Haut (Oikarinen et al., 1985; Kligman und Gebre, 1991; Kligman, 1991; Scharffetter-Kochanek et al., 1992, 1997; Young et al., 1992; West, 1994). Neben einer berufsbedingten chronischen Sonnenexposition, beispielsweise bei Landarbeitern, trägt das heutige Freizeitverhalten der Menschen durch das fehlgeleitete Gesundheits- und Schönheitsideal einer ganzjährig gebräunten Haut wesentlich zur hohen UV-Belastung der Haut bei. Die Abb. 7 verdeutlicht die Konsequenzen einer chronischen UV-Exposition für die Haut.



**Abb. 7 Auswirkungen einer chronischen UV-Exposition auf die Haut**

Eine chronische UV-Belastung der menschlichen Haut manifestiert sich in klinischer Hinsicht in einer verstärkten Ausbildung von Falten, in einem Verlust an Rückstellkraft und kutaner Elastizität (a), sowie einer Zunahme und Erweiterung kutaner Blutgefäße (Teleangiektasien, ↑) (b).

Klinisch gesehen ist eine durch chronische UV-Exposition geschädigte Haut durch mehrere charakteristische Eigenschaften gekennzeichnet: (1) Durch eine vorzeitige Photoalterung der Haut. Diese manifestiert sich in einer starken Faltenbildung (Abb. 7a) und einer verminderten Rückstellkraft und Elastizität der Haut. Zusätzlich sind ein vermehrtes Auftreten supramolekular fehlorganisierter elastischer Fasern und ein gesteigerter Abbau von dermalen Kollagenfasern in der Dermis zu beobachten, was in einer leichten Verletzbarkeit der Haut, einer Blasenbildung und verzögerten Wundheilung resultiert (Gilchrest, 1989, 1990; Oikarinen 1990; Kligman et al., 1993). (2) Durch ein verstärktes Auftreten von Teleangiektasien, einer Zunahme und Erweiterung kutaner Blutgefäße (Soffen und Blum, 1961) (Abb. 7b). (3) Durch die erhöhte Inzidenz häufig stark vaskularisierter Hauttumore (Soffen und Blum, 1961; Raab, 1990). Darüber hinaus gibt es experimentelle Hinweise, daß

UV-geschädigtes Bindegewebe eine Invasion und Metastasierung von Hauttumoren fördert (Singh et al., 1995; Scharffetter-Kochanek und Schwarz, 1996; Luca et al., 1997). Die UV-induzierte Schädigung von Bindegewebe und Haut stellt somit nicht nur ein kosmetisches sondern auch ein ernstzunehmendes medizinisches Problem dar, das durch die Ozondepletion und den dadurch bedingten Anstieg der UVB-Belastung auf der Erdoberfläche noch verschärft wird.

Die chronisch UV-geschädigte Haut stellt den Endzustand einer sich über viele Jahre erstreckenden UV-Einwirkung dar. Der akuten UV-Schädigung (z. B. Sonnenbrände) folgen mit jahrzehntelanger Latenz die schweren Bindegewebsschädigungen der Dermis.

Als molekulare Grundlage der Photoalterung der Haut werden Schädigungen des dermalen Bindegewebes angesehen. So liegt z. B. das für die Elastizität und Rückstellkraft der Haut wichtige Elastinmolekül in der chronisch UVB-geschädigten Haut in seiner supramolekularen Organisation verändert und als elastisches Material vermehrt vor (Kligman et al., 1982; Oikarinen et al., 1985; Uitto et al., 1986; Chatterjee et al., 1990; Kligman et al., 1993; Schwartz et al., 1995; Starcher et al., 1999). Auch Proteoglykane und Glykosaminoglykane kommen in der UV-geschädigten Haut vermehrt vor (Bissett et al., 1987, 1989; Margelin et al., 1993). Diese Biopolymere erfüllen neben strukturellen Aufgaben wie Filtration und Bindung von freiem Wasser auch verschiedene funktionelle Aufgaben, wie beispielsweise spezifische Interaktionen mit Wachstumsfaktoren (Hardingham und Fosang, 1992). Der Fibronectin-Gehalt der Dermis (Boyer et al., 1992) und auch die interstitiellen Kollagene, die mit mehr als 80 % den größten Anteil der dermalen Proteine ausmachen, sind ebenfalls deutlich verringert (Oikarinen et al., 1985; Trautinger et al., 1989, 1991; Kligman, 1992; Kligman et al., 1993). Wahrscheinlich trägt die UV-bedingte Verminderung der Kollagenfibrillen entscheidend zur veränderten Funktion der UV-geschädigten Dermis bei.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß verschiedene Matrix-Metalloproteinasen (MMP) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UV-Spektren (UVA, UVB, UVC) auf mRNA- und Proteinebene induziert werden (Stein et al., 1989; Scharffetter et al., 1991; Petersen et al., 1992; Scharffetter-Kochanek et al., 1992a; Herrmann et al., 1993). TIMP-3 wird als Inhibitor der Matrix-Metalloproteinasen-1 und -3 in seiner Syntheserate von den verschiedenen UV-Modalitäten nicht beeinflusst. Dieses Ungleichgewicht zwischen MMPs und ihrem Inhibitor ist vermutlich Ursache des verminderten Kollagengehaltes in der chronisch UV-geschädigten Haut sowie Ursache der Störung der makromolekularen Organisation verschiedener dermaler Strukturen.

Wie bei der UV-induzierten Immunsuppression wird dem Wachstumsfaktor  $\text{TNF}\alpha$  auch bei der Photoalterung der Haut eine zentrale Rolle zugesprochen.  $\text{TNF}\alpha$  wird nach UVB-Bestrahlung von Keratinozyten der Epidermis synthetisiert und freigesetzt und kann vermutlich nach Diffusion in die Dermis den Bindegewebsstoffwechsel von Fibroblasten modulieren (Oxholm et al., 1988; Scharffetter et al., 1989; Scharffetter-Kochanek et al., 1992a).

Zusätzlich zu indirekten Schädigungen von Strukturproteinen durch UVB-induzierte Matrix-Metalloproteinasen, konnten Monboisse und Borel (1992) *in vitro* zeigen, daß Kollagen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in kleine Peptide fragmentiert werden kann. Zudem wird die Biosynthese von Kollagen und Glykosaminoglykanen durch reaktive Sauerstoffspezies gestört (Tanaka et al., 1993). Entsprechend wird die Kollagen-Synthese durch Paraquat, ein Superoxidanionen-generierendes System, inhibiert (Darr et al., 1993). Weiterhin gibt es zahlreiche Hinweise, daß ROS an der UVB-Alterung der Haut zentral beteiligt sind (Black, 1987; Dalle-Carbonare und Pathak, 1989; Bissett et al., 1990; Pathak et al., 1990; Pathak und Dalle-Carbonare, 1992; Shindo et al., 1993, Darr und Fridovich, 1994). Reaktive Sauerstoffspezies werden bei der stufenweisen Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser gebildet und umfassen aktivierte Sauerstoffverbindungen mit radikalischen (Superoxidanionen- und Hydroxyl-Radikal) oder nicht radikalischen Eigenschaften (Singulett-Sauerstoff und Wasserstoffperoxid). UV-Strahlung ist in der Lage, diese Sauerstoffspezies in der Haut direkt zu erzeugen oder ihre Bildung zu verursachen (Taira et al., 1992; Masaki et al., 1995). Bisher ist der molekulare Zusammenhang zwischen UVB-induzierter ROS-Generierung und der Induktion verschiedener Matrix-Metalloproteinasen noch nicht vollständig aufgeklärt worden. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, daß *in vitro* eine  $(\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+})$ -abhängige Erzeugung von Hydroxylradikalen im Rahmen der Fenton-Reaktion mit nachfolgender Bildung von Lipidperoxiden eine zentrale Rolle bei der UVB-abhängigen Induktion der interstitiellen Kollagenase (MMP-1) spielt (Brenneisen et al., 1998). Die Verwendung des Eisenchelators Desferrioxamin (DFO) führte in verschiedenen Versuchsansätzen zu einer signifikanten Verringerung der UVB-induzierten MMP-1-Expression in human dermalen Fibroblasten. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß reaktive Sauerstoffspezies die Expression und Sekretion von Zytokinen stimulieren, welche an der Induktion von Matrix-Metalloproteinasen beteiligt sein können (Chaudhri und Clark 1989; Wendel et al., 1991; DeForge et al., 1993; Wlaschek et al., 1995).

In Hinsicht auf eine voranschreitende globale Ozondepletion und den damit verbundenen Anstieg der UVB-Intensität auf der Erdoberfläche bedarf es für eine Risikoabschätzung der

UVB-induzierten Schädigung des dermalen Bindegewebes sicherlich noch einer weiteren Klärung wesentlicher zellbiologischer Zusammenhänge. Unklar sind beispielsweise immer noch die primären molekularen Signaltransduktionswege, die zu den tiefgreifenden strukturellen und funktionellen Änderungen in der Dermis führen. Eine Weiterentwicklung von vorhandenen *in vitro*- (Zellkultur, Dermisäquivalent, Hautäquivalent) und *in vivo*-Modellen (haarlose Maus, Ratte, Meerschweinchen) sollte es jedoch erlauben, Wirkmechanismen zu identifizieren und eine Risikoabschätzung chronischer UVB-Strahlung vorzunehmen. Ein wichtiger Aspekt wird dabei eine Analyse der wesentlichen Unterschiede und Übereinstimmungen von akuter und chronischer UV-Bestrahlung sein. Im Gegensatz zum MMP-vermittelten Bindegewebsabbau sind die molekularen Grundlagen der UV-induzierten Ausbildung von Blutgefäßen noch unklar. Es ist von vorrangiger Bedeutung, die vorhandenen Modelle in einen klaren Bezug zur UV-induzierten vorzeitigen Hautalterung und zum vermehrten Auftreten stark erweiterter Blutgefäße (Teleangiectasien) in chronisch UV-geschädigter Haut zu setzen, da beide Prozesse eng mit der Entwicklung UV-induzierter Hauttumoren verbunden sind (Soffen und Blum, 1961; Raab 1990; Scharffetter-Kochanek und Schwarz, 1996).

### **2.2.2 Wirkungen von UVB-Strahlung auf die Entwicklung von Hauttumoren**

Chronisch auf die Haut einwirkende UV-Strahlung ist für die Entstehung von Hautkrebs verantwortlich. Zahlreiche epidemiologische Studien belegen die Karzinogenität von UVB-Strahlung für den menschlichen Organismus. Dabei konnte eine Korrelation der Inzidenz von Hauttumoren mit der Intensität der UV-Exposition nachgewiesen werden (Vitaliano und Urbach, 1980; Jung, 1992). Bei den Auswirkungen von UV-Strahlung auf die Entwicklung von Hauttumoren ist zwischen drei verschiedenen Arten von Hautkrebs zu unterscheiden. Basaliome (BCC) und Plattenepithelkarzinome (SCC) werden im Gegensatz zu kutanen Melanomen (CM) als nicht-melanozytäre Hautkrebsarten (NMSC) bezeichnet. Basaliome und Plattenepithelkarzinome entwickeln sich beide im Rahmen einer neoplastischen Transformation von Keratinozyten, den Hauptvertretern epidermaler Zellen der Haut, während Melanome aus der neoplastischen Transformation von Melanozyten, den pigmentbildenden Zellen der Epidermis der Haut, hervorgehen.

Für die Entstehung von Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen gilt eine direkte Abhängigkeit zur verstärkten UV-Exposition als gesichert. BCC und SCC sind zumeist an

lichtexponierten Stellen lokalisiert und treten häufig bei Personen auf, die ihre Arbeit im Freien verrichten. Der Pigmentierungsgrad der Haut spielt bei der Entstehung nicht-melanozytärer Hautkrebsarten eine entscheidende Rolle. NMSCs sind weit häufiger bei hellhäutigen als bei dunkelhäutigen Europäern und noch seltener bei Afrikanern und Asiaten vertreten. Zudem hat die geographisch bedingte Strahlungsintensität der Sonne einen entscheidenden Einfluß auf die Ausbildung von NMSCs, da bei hellhäutigen Menschen in äquatornahen Gegenden BCC und SCC häufiger vorkommen (Vitaliano und Urbach, 1980; Jung, 1992; Scharffetter-Kochanek und Schwarz, 1996). Zudem ist das Risiko von NMSC bei langandauernden therapeutischen UV-Bestrahlungen deutlich erhöht (Jung, 1992). Weiterhin konnte in diesen Studien gezeigt werden, daß die kumulative Gesamtdosis einer UVB-Bestrahlung eng mit der Inzidenz bestimmter Hauttumoren assoziiert ist.

Für das maligne Melanom kann ebenfalls eine Korrelation mit der Einwirkung von UV-Strahlung als gesichert angesehen werden. Kutane Melanome unterscheiden sich jedoch in bezug auf ihre Entstehung und der biologischen Reaktion auf UVB-Strahlung in der Hinsicht von nicht-melanozytären Hautkrebsarten, daß weniger die kumulative Gesamtdosis einer UV-Exposition, sondern vielmehr kurzzeitige intensive UVB-Expositionen im frühen Alter für das Auftreten malignen Melanomen bedeutsam sind (Elwood et al., 1985b; Sorber et al., 1987; Elwood et al., 1997; Autier und Doré, 1998). Die molekularen Mechanismen zur Induktion von malignen Melanomen durch UV-Strahlung sind jedoch größtenteils noch unklar. Es wird vermutet, daß in der komplexen Pathogenese UV-induzierter Melanomen sowohl UVB- als auch UVA-induzierte Veränderungen auf zellulärer und molekularer Ebene wirksam sind (Longstreth, 1998).

Zusammengefaßt liegen die für die Photokarzinogenese hauptsächlich verantwortlichen Wellenlängen im Bereich des UVB-Spektrums bei 280 bis 320 nm. Allerdings stellt auch die langwelligere UVA-Strahlung einen signifikanten pathogenetischen Faktor in der Photokarzinogenese dar (Drobetsky et al., 1995; Scharffetter-Kochanek und Schwarz, 1996; Tada-Oikawa et al., 1998). UVC-Strahlung spielt auf der Erdoberfläche eine untergeordnete Rolle, da die UVC-Strahlung zwar von der Sonne emittiert, jedoch durch die Ozonschicht der Stratosphäre ausreichend gefiltert wird (vgl. Kapitel 2.1.3, Abb. 3).

Eines der Hauptziele der Erforschung der humanen Photokarzinogenese ist die Identifizierung und Charakterisierung der biologisch wirksamen Komponenten der solaren UV-Strahlung bei der Entwicklung von Hauttumoren.

Zu Beginn dieses Jahrhunderts erschienen erste Berichte, daß UVB-Strahlung im Mausmodell Hautkrebs erzeugt (Rusch und Baumann, 1939; Blum, 1959). Auch *in vitro* konnte die Mutagenität der UVB-Strahlung nachgewiesen werden, da sich aus UVB-bestrahlten Keratinozytenkulturen, welche normalerweise nur eine begrenzte Lebensdauer besitzen, Zellklone entwickelten, die nicht nur *in vitro* unbegrenzt proliferierten, sondern auch nach Injektion dieser Zellen in die Haut von Versuchstieren Tumoren ausbildeten (Blum, 1959). Nach der Veröffentlichung dieser Ergebnisse wurden in den folgenden Jahren unter großem Aufwand die direkten und indirekten Effekte der UVB-Strahlung auf die verschiedenen Stufen der Photokarzinogenese untersucht. Dabei kann die Photokarzinogenese in drei Entwicklungsstufen untergliedert werden: Initiation, Promotion und Progression. Die Tumorinitiation beruht auf der direkten Wirkung der UVB-Strahlung auf die DNA und nachfolgender mutagener Schädigung in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, welche die betroffenen Zellen resistent gegenüber Signalen einer terminalen Differenzierung werden lassen. Die UVB-induzierte Tumorpromotion führt durch direkte und indirekte Schädigungen zur klonalen Expansion initiiert Tumorzellen. Letztendlich trägt die UVB-Strahlung auch zur Tumorprogression bei, indem sie Prozesse des Tumorwachstum, der Tumorinvasion und der Metastasierung begünstigt. Die UVB-Strahlung wird demzufolge als vollständiges Karzinogen angesehen, da sie in allen Phasen der Tumorentwicklung die Ausbildung von Hautkrebs fördern kann.

Im Rahmen der Karzinogenese und vollständigen Ausprägung von Hauttumoren sind mehrerer Mutationen erforderlich, welche gemeinsam zu einem deregulierten Wachstumsverhalten und einem „Ausbrechen“ der Tumorzellen aus ihrem Zellverband führen. Um diesen komplexen und noch bei weitem nicht vollständig aufgeklärten Prozeß näher zu charakterisieren, sollen die folgenden Kapitel einen Überblick über den direkten und indirekten Einfluß der UVB-Strahlung auf die verschiedenen Stadien der Photokarzinogenese geben.

### 2.2.2.1 Direkte Effekte von UVB-Strahlung auf die Entstehung von Hauttumoren

Als Hauptursache der Initiation der Photokarzinogenese werden mutagene Schädigungen von Nucleinsäuren (DNA/ RNA) durch UVB-Strahlung angesehen. Die Basen der Nucleinsäuren sind die Chromophore, welche die Energie der UVB-Strahlung aufnehmen und chemisch modifiziert werden. Die häufigsten Produkte dieser Energieabsorption sind Folge von

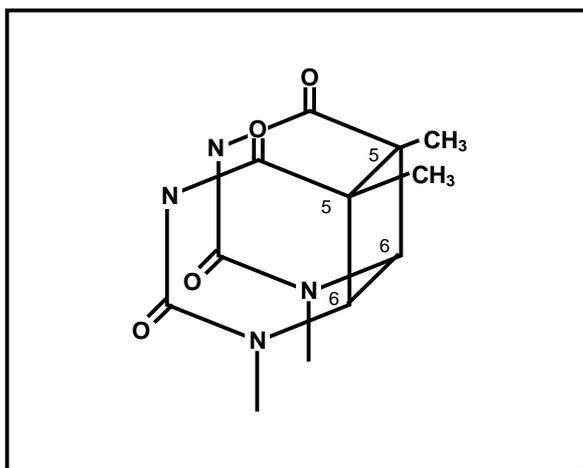


Abb. 8 Thymin-Dimer, der häufigste DNA-Schaden nach UVB-Bestrahlung

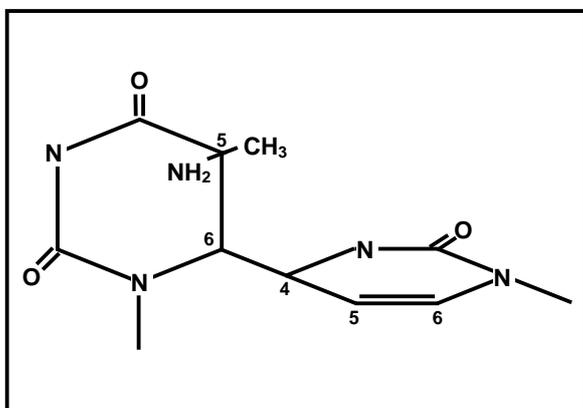


Abb. 9 Das TC(6-4)-Photoprodukt entsteht nach UVB-Bestrahlung von DNA

Reaktionen zwischen benachbarten Pyrimidinen, bevorzugt zwischen benachbarten Thyminresten. Bei dem charakteristischen Reaktionsprodukt handelt es sich um ein sogenanntes Thymin-Dimer, welches kovalent über einen Cyclobutan-Ring verbunden ist (Abb. 8). Etwa 85 % aller UV-vermittelter DNA-Schäden sind Thymin-Dimere und gehören zum Typ der Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere. Seltener, etwa zu 10 %, tritt das sogenannte TC(6-4)-Produkt, ein (6-4) Pyrimidin-Pyrimidon-Photoprodukt, auf (Abb. 9) (D'Errico et al., 1996). Dem TC(6-4)-Photoprodukt kommt im Vergleich zum Thymin-Dimer das größere mutagene Potential bei der Entstehung von Tumoren zu (Brash et al., 1996). Beiden UV-induzierten Mutationen gemeinsam ist die Brückenbildung zwischen und innerhalb von DNA-Strängen, was häufig eine C→T- oder eine CC→TT-Transition zur Folge hat. Betroffene DNA-

Abschnitte können ohne eine Korrektur bei der Replikation der DNA nicht mehr korrekt abgelesen werden. Bei dieser UVB-Schädigung der DNA kommt es zur Aktivierung eines bestimmten, zelleigenen Reparatursystem, der Nucleotid-Exzisionsreparatur, bei der ein Zusammenwirken mehrerer Enzyme notwendig wird. Ist die Anzahl der Schäden nicht groß, können beide Schadensarten hundertprozentig und fehlerfrei repariert werden. Oftmals werden jedoch bei intensiver oder chronischer UVB-Expositionen komplexe DNA-Schäden hervorgerufen, die die Kapazität der Exzisionsreparatur überfordern. Die Zellen verfügen

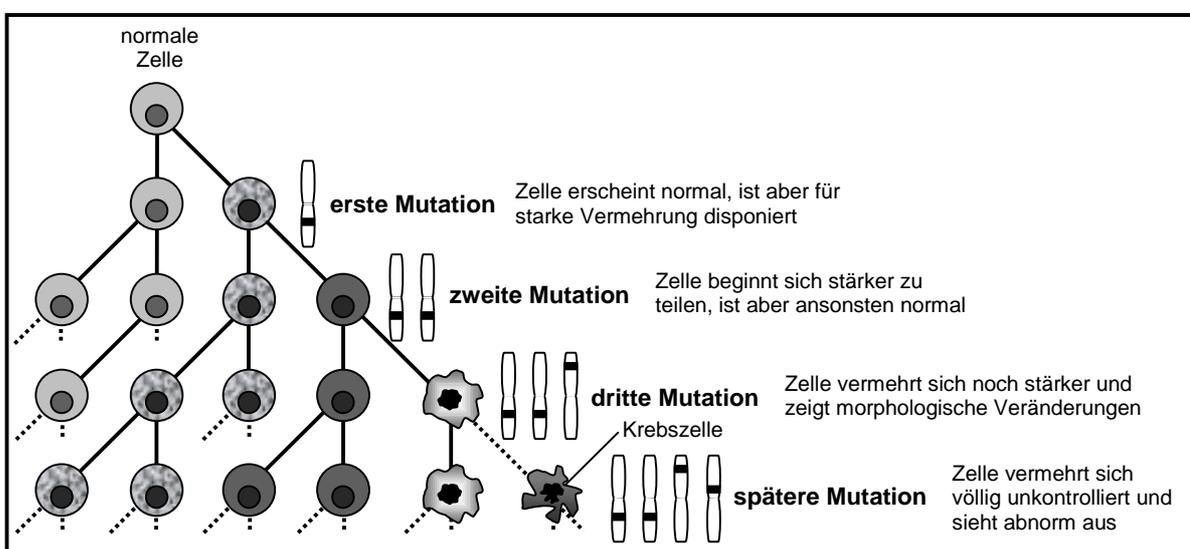
noch über weitere, wenn auch weniger effektive Reparaturmechanismen. Dazu gehören auch DNA-Reparaturmechanismen mit einer homologen oder illegitimen Rekombination zwischen geschädigten und ungeschädigten DNA-Strängen. Diese Reparatursysteme kommen im Wesentlichen nach der Replikation von schadhafter DNA zum Einsatz. Außerdem hilft sich die Zelle mit der auch als „mutagene Reparatur“ (error prone repair) bezeichneten Reparatur durch Schadensübergehung, die Mutationen hervorruft, und mit der Reparatur von durch DNA-Polymerasen verursachten Fehlpaarungen von Nukleotid-Basen, die nicht dem normalen komplementären DNA-Code entsprechen. Das Überleben der Zelle nach UVB-induzierter DNA-Schädigung hängt somit weitgehend von einem subtilen Zusammenspiel mehrerer Reparatursysteme ab. Außerdem bestimmen diese Systeme, ob die Zellen mit genetischen Veränderungen (Mutationen oder Rekombinationen) weiterleben und diese fehlerhaften Informationen an Tochterzellen weitergeben.

Liegen mutierte DNA-Sequenzen in aktiven DNA-Abschnitten und zusätzlich noch in Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen, Genen, welche das Zellwachstum positiv oder negativ beeinflussen können, kann unter Umständen eine maligne Transformation der betroffenen Zelle die Folge sein (Ananthaswamy et al., 1990). So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß mehr als die Hälfte von untersuchten Plattenepithelkarzinomen (SCC) an UV-exponierten Hautarealen einen charakteristischen Basenaustausch (C→T) im Tumorsuppressorgen *p53* aufweisen. Dieses Basenaustauschmuster wurde nicht in *p53*-Mutationen von Malignomen innerer Organe gefunden, was die Existenz UV-spezifischer DNA-Mutationen nahelegt (Brash et al., 1991). Das *p53*-Tumorsuppressorgen nimmt als „Wächter des Genoms“ noch weitere essentielle Aufgaben wahr. In einer zentralen Schlüsselposition kann *p53* in den Zellzyklus eingreifen und trägt entscheidend dazu bei, ob eine stark geschädigte Zelle über den Weg des programmierten Zelltodes entsorgt wird (Apoptose), oder ob weniger geschädigte Zellen Zeit zur Reparatur und die Erlaubnis zu weiterem Wachstum und zur Zellteilung erhalten. Da UVB-Strahlung auch das *p53*-Gen mutieren kann, wirkt UVB-Strahlung in doppelter Weise kanzerogen, indem es DNA-Schäden verursacht und gleichzeitig den zelleigenen Schutzmechanismus - in diesem Falle *p53* - schädigt.

Die Transformation einer normalen Zelle zu einer malignen Krebszelle ereignet sich aufgrund einer Vielzahl von Mutationen. Zur Akkumulation mehrerer wirksamer Mutationen ist eine Zeitspanne von mehreren Jahren bis Jahrzehnten notwendig, bis die betroffenen Zellen die charakteristischen Eigenschaften von Tumorzellen erworben haben. Dazu gehören

unkontrollierte Zellteilung, Invasion und Metastasierung in entfernt liegende Organe. Aus den Untersuchungen zur Entstehung von Tumoren wurde das Modell der klonalen Evolution entwickelt, nach dem eine Krebszelle auf eine Ursprungszelle zurückzuführen ist, in deren Nachkommenschaft sich im Laufe vieler Generationen Mutationen sukzessiv angehäuft haben (Abb. 10).

Das Auftreten mehrerer Mutationen in einer Zelle ist notwendig, um diese entarten zu lassen. Eine besondere Rolle in der Tumorpromotion spielen zwei verschiedenen Klassen von Genen, deren Mutation für die Zelle fatale Folgen haben kann: Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene.



**Abb. 10 Anhäufung genetischer Defekte bei der Entstehung von Krebs**

Eine Krebszelle geht nach der Theorie der klonalen Evolution auf eine Ursprungszelle zurück, in deren Nachkommenschaft (Klon) sich Mutationen sukzessiv angehäuft haben. Tritt in einer Zelle beispielsweise durch einen UVB-induzierten DNA-Schaden eine krebsfördernde Mutation auf, gibt sie diese bei der Teilung an ihre Tochterzellen und an alle weiteren davon abstammenden Zellgenerationen weiter. Ein solcher genetischer Defekt kann auch ererbt sein, so daß er von Anfang an in allen Zellen des Körpers vorhanden ist. Irgendwann ereignet sich in einer solchen vorgeschädigten Zelle eine weitere Mutation, was sich im Laufe weiterer Teilungen noch mehrfach wiederholen kann. Schließlich haben sich in einer Zelle so viele Mutationen angesammelt, daß sie die Schwelle von noch gutartigen zu einer bösartigen Krebszelle überschreitet. In diesem Schema ist dieser langwierige Prozeß zur Vereinfachung auf nur wenige Zellgenerationen verkürzt. (modifiziert nach Cavenee und White 1995; Sci Am 272(3): 72-79)

Im folgenden sollen Vertreter dieser beiden Gruppen und die Folge ihrer Deaktivierung kurz vorgestellt werden. Auf die essentielle Rolle des Tumorsuppressorgens *p53* als „Wächter des Genoms“ ist im vorherigen Kapitel bereits eingegangen worden. Mutationen im *p53*-Gen treten in ungefähr 50 % aller Krebsformen beim Menschen auf (Greenblatt et al., 1994), wobei in UV-induzierten Plattenepithelkarzinomen der Anteil an *p53*-Mutationen bei über 90 % liegt (Brash et al., 1991, 1996). Das *p53*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des

Chromosoms 17 und besteht aus 11 Exons, welche sich über einen Bereich von 20 kbp erstrecken. Dieses Gen kodiert für ein nukleäres Phosphoprotein, das in der zellulären Proliferationskontrolle (Vogelstein und Kinzler, 1992), in der Überwachung zellulärer DNA-Schäden (Ziegler et al., 1994) und in der Steuerung der Apoptose (Fisher, 1994), dem regulierten Zelltod involviert ist. Das p53-Genprodukt ist ein sequenzspezifisches DNA-bindendes Protein, das als transkriptioneller Aktivator und Repressor fungiert. Eine UV-Exposition resultiert über posttranslationale Mechanismen in einer erhöhten p53-Proteinexpression. Dieser Anstieg an p53-Protein bewirkt einen Wachstumsarrest von Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus, was eine Reparatur von DNA-Schäden vor der DNA-Replikation erlaubt. Neben dieser Funktion nimmt p53 auch eine Schlüsselrolle in der Steuerung der Apoptose ein. Je nach Ausmaß der UV-induzierten Schäden kommt es zu einem Stop der Zellproliferation oder alternativ zu einem geregelten Zelltod (Kamb, 1994). Durch diesen Mechanismus, der sich unter strikter Kontrolle von p53 befindet, soll die Entstehung entarteter Zellen mit einer Anhäufung genomischer Mutationen verhindert werden. Bei einer Inaktivierung dieser essentiellen Funktionen von p53 könnte eine rechtzeitige Behebung möglicher DNA-Schäden vor der Replikation nicht mehr gewährleistet werden, was die Entstehung ausgedehnter DNA-Mutationen und dadurch die Transformationen von Zellen begünstigt. Zudem ist bei einem Ausfall von p53 eine Eliminierung stark geschädigter Zellen durch Apoptose nicht mehr möglich, was ebenfalls die Vermehrung von potentiellen Tumorzellen fördert.

Der unzureichenden Tumorsuppression durch eine Inaktivierung von p53 steht eine übermäßige Wachstumsstimulierung durch Onkogene gegenüber. Onkogene gehen mutationsbedingt aus Proto-Onkogenen hervor und können direkten Einfluß auf die Regulation des Zellzyklus nehmen. Viele Proto-Onkogene sind Bestandteile von Signaltransduktionskaskaden, welche wachstumsfördernde Signale von der Zelloberfläche in den Zellkern weitergeben. Wenn durch Mutation in einem Proto-Onkogen ein wichtiges Signalübertragungssystem permanent aktiviert ist, so daß dieses auch ein wachstumsstimulierendes Signal übermittelt, wenn gar keines gegeben wurde, beginnt sich die entsprechende Zelle der Proliferationskontrolle zu entziehen. Genprodukte solcher Proto-Onkogene können an unterschiedlicher Stelle von Signaltransduktionskaskaden stehen: An der Position eines signalempfangenden Rezeptors, eines signalweiterleitenden Proteins oder eines auf DNA-Ebene wirkenden Transkriptionsfaktors. Ist ein Glied dieser Kette

mutationsbedingt dauerhaft aktiviert, kann dies eine stetige und unkontrollierte Zellproliferation zur Folge haben.

Ein Beispiel für signalweiterleitende Proto-Onkogene sind die Vertreter der *ras*-Genfamilie. Diese Genfamilie besteht aus drei Proto-Onkogenen (*H-ras*, *K-ras* und *N-ras*). Die drei möglichen Transkripte entstehen durch alternatives Spleißen eines Gens, das auf dem Chromosom 11 lokalisiert ist. Die RAS-Proteine mit einer Größe von 170 bis 189 Aminosäuren haben ähnliche Struktur und Funktionen und sind an der Plasmamembran der Zelle lokalisiert. Nach Aktivierung von Zelloberflächen-Rezeptoren sind RAS-Proteine wichtige Mediatoren der Signaltransduktion von der Zelloberfläche in den Zellkern. Nach Rezeptor-vermitteltem Auftreten eines Poliferationssignales werden RAS-Proteine durch die Aufnahme von GTP aktiviert, wodurch es zu einer Konformationsänderung von RAS kommt. Das aktivierte RAS-Protein kann nachgeschaltete Proteinkinasen anregen und geht, vermittelt durch eine eigene GTPase-Aktivität, nach der Hydrolyse von GTP zu GDP wieder in den inaktiven Zustand über.

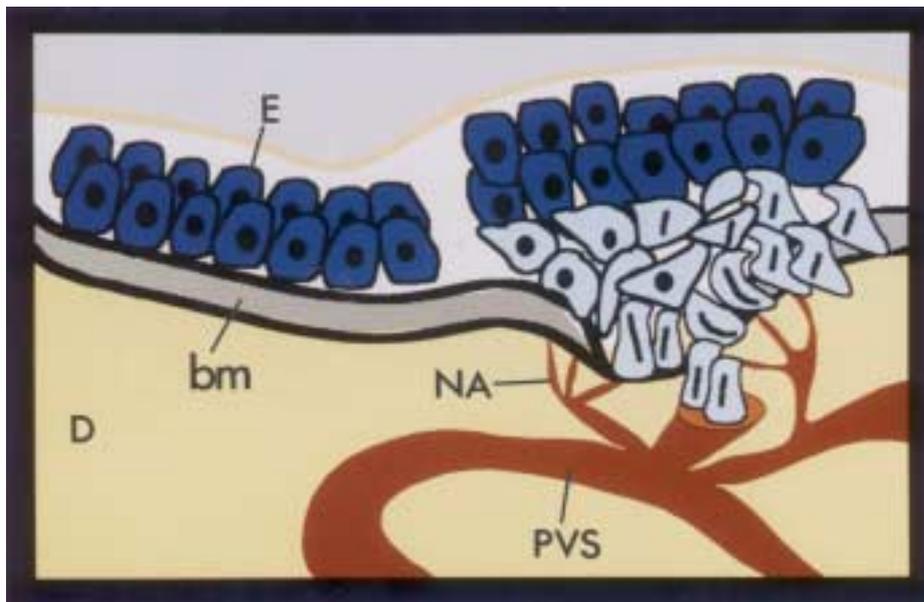
Durch eine Mutation im *ras*-Proto-Onkogen und der Entstehung von *ras*-Onkogenen wird eine geordnete Signalkaskade im Zytoplasma von Zellen gestört. Häufig treten Mutationen in Codons des *ras*-Proto-Onkogen auf, welche an der Bindung von GTP beteiligt sind, wodurch eine Spaltung von GTP nach der Signalübertragung verhindert oder stark verzögert wird. Die Proteine mutierter *ras*-Gene geben demzufolge unablässig Proliferationssignale weiter, auch wenn keine Aktivierung entsprechender Rezeptoren stattgefunden hat. Mutationen von *ras*-Proto-Onkogen kommen bei etwa einem Viertel aller Tumoren des Menschen vor, unter anderem bei Karzinomen von Haut, Dickdarm, Bauchspeicheldrüse und Lunge. Beispielsweise treten in 30 bis 60 % aller Hauttumoren wie schon beim *p53*-Gen beschrieben UV-spezifische C→T- oder CC→TT-Transitionen in *ras*-Proto-Onkogen auf (Daya-Grosjean et al., 1993).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß UVB-Strahlung durch die Mutation von DNA-Sequenzen einen direkten Einfluß auf die Entwicklung von Hauttumoren nehmen kann, indem durch UVB-spezifische Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen die Entstehung und die Proliferation von Tumorzellen begünstigt wird.

### 2.2.2.2 Indirekte Auswirkungen von UVB-Strahlung auf die Entstehung von Hauttumoren

Neben der direkten UVB-bedingten DNA-Schädigung kann UVB-Strahlung durch eine Veränderung der zelleigenen Genexpression auch indirekt Wachstum, Invasion und Metastasierung von Tumoren beeinflussen.

Dabei spielt die Versorgung der Tumorzellen mit Sauerstoff und Nährstoffen eine zentrale Rolle beim Wachstum und der Ausbreitung von Tumoren. Ohne einen Anschluß an das körpereigene Blutgefäßsystem ist das Wachstum eines Tumors auf nur wenige Kubikmillimeter begrenzt (Marmé, 1996). Zudem begünstigt die Neovaskularisierung eines Tumors die Invasion von Tumorzellen in die Blutgefäße mit nachfolgender Ausbreitung der Krebszellen in entfernt liegende Organe (Abb. 11).

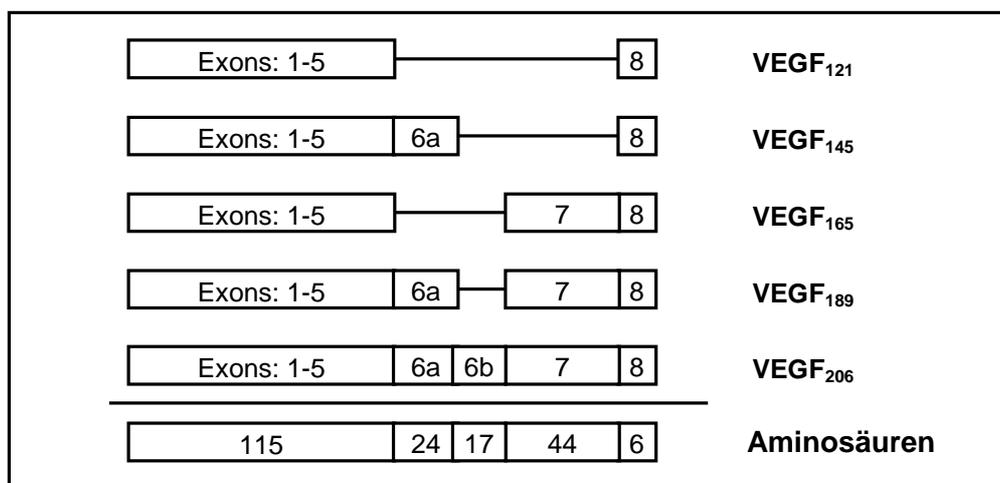


**Abb. 11 Die Progression von Hautkrebs ist abhängig von einer ausreichenden Vaskularisierung des wachsenden Tumors**

Die linke Seite der Abbildung zeigt einen normalen Hautaufbau der Epidermis (E), Basalmembran (bm, basal membrane) und der Dermis (D), wohingegen auf der rechten Seite Tumorzellen nach Initiation und Promotion der Tumorentwicklung sich nicht mehr in einem geordneten Zellverband befinden. Ausgehend vom präexistierenden Blutgefäßsystem (PVS, preexisting vascular system) ist es bereits zu einer Neovaskularisierung (NA) und zum Anschluß des Tumors an das Blutgefäßsystem gekommen. Die Neovaskularisierung versorgt den wachsenden Tumor nicht nur mit Sauerstoff und Nährstoffen sondern ermöglicht auch die Invasion von Tumorzellen in das Blutgefäßsystem und die Ausbildung von Metastasen.

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, daß die Induktion der Angiogenese dem Wachstum und der Ausbreitung maligner Tumore vorausgeht (Liotta et al., 1974; Christofori und Hanahan, 1994; Hanahan und Folkman, 1996; Larcher et al., 1996; Skobe et al., 1997). Dementsprechend erlaubt die Anzahl von Blutgefäßen, die einen Tumor infiltrieren, eine Prognose für die Benignität beziehungsweise Malignität eines Tumors (Weidner et al., 1992, 1993). Neben verschiedenen anderen Wachstumsfaktoren der Angiogenese, wie Angiogenin, aFGF und bFGF, TGF $\alpha$  und TGF $\beta$  und TNF $\alpha$  (Folkman, 1972, 1984; Hayek et al., 1987; Blood und Zetter, 1990; Marmé, 1996), zählt der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF, vascular endothelial growth factor) zu den wichtigsten Mediatoren der physiologischen und der pathophysiologischen Angiogenese (Klagsbrun und Soker, 1993; Detmar, 1996; Brown et al., 1997).

Bei dem Wachstumsfaktor VEGF handelt es sich um ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 35-45 kDa. VEGF wurde ursprünglich in Tumorzellen von Meerschweinchen identifiziert (Dvorak et al., 1979b; Senger et al., 1983) und ist in verschiedenen Spezies wie Meerschweinchen, Maus, Ratte, Rind und Mensch hochkonserviert (Keck et al., 1989; Leung et al., 1989; Conn et al., 1990a; Berse et al., 1992; Claffey et al., 1992). Bislang sind mindestens fünf verschiedene VEGF-Transkripte in menschlichen Zellen identifiziert worden, welche für Polypeptide einer Länge von 206, 189, 165, 145 und 121 Aminosäuren kodieren (Leung et al., 1989; Claffey et al., 1995; Poltorak et al., 1997). Die verschiedenen VEGF-Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen eines einzelnen Gens (Tischer et al. 1991; Park et al., 1993) (Abb. 12).



**Abb. 12 VEGF-Spleißvarianten im humanen Organismus**

Bei den Isoformen VEGF<sub>121-165</sub> handelt es sich um lösliche Varianten des VEGF-Familie, während VEGF<sub>189</sub> und VEGF<sub>206</sub> zell- bzw. matrixassoziierte Proteine darstellen (Brown et al., 1997; Poltorak et al., 1997), wobei die Isoform VEGF<sub>165</sub> sowohl in löslicher Form als auch zell- oder matrixassoziiert vorkommt und die prädominante Spleißform im menschlichen Organismus repräsentiert (Houck et al., 1992). Die biologische Aktivität der VEGF-Spleißformen ist trotz unterschiedlicher Struktur jedoch identisch: alle Isoformen führen zur Hyperpermeabilität von Blutgefäßen (Dvorak et al., 1979b; Senger et al., 1983), besitzen eine starke mitogene Aktivität für Endothelzellen (Ferrara und Henzel, 1989; Conn et al., 1992) und führen zur Angiogenese *in vitro* (Pepper et al., 1992) und *in vivo* (Connolly et al., 1989a; Leung et al., 1989; Phillips et al., 1995).

Die VEGF-Isoformen üben ihre biologische Aktivität durch Bindung an die membranständigen VEGF-Rezeptoren Flt-1 (de Vries et al., 1992) und KDR (Terman et al., 1992a, b) aus, die beide zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen zählen. Der Flt-1-Rezeptor wird von endothelialen und nicht-endothelialen Zellen exprimiert, während der KDR-Rezeptor ausschließlich auf Endothelzellen vorkommt (Quinn et al., 1993; Millauer et al., 1994; Pogulis et al., 1996). VEGF und VEGF-Rezeptoren werden bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Vorgängen vermehrt exprimiert wie beispielsweise bei der Wundheilung (Brown et al., 1992), Psoriasis (Detmar et al., 1994) und einigen blasenbildenden Erkrankungen (Brown et al., 1995). Auch in Tumoren mehrerer Tierspezies und in Tumoren des Menschen werden VEGF und VEGF-Rezeptoren konstitutiv überexprimiert (Senger et al., 1983, 1986, 1990; Connolly et al., 1989b; Brown et al., 1992; Gitay-Goren et al., 1993; Charnock-Jones et al., 1994; Cohen et al., 1995; Dvorak et al., 1995).

Eine Blockade der VEGF-Funktion auf Ebene der Rezeptoren oder von VEGF führte *in vivo* in der murinen Cornea nach Zytokin-vermittelter Aktivierung der VEGF-Synthese zu einer verminderten Angiogenese (Seghezzi et al., 1998) und in verschiedenen Tiermodellen zu einer Unterdrückung von Tumorwachstum und -invasion (Kim et al., 1993; Millauer et al., 1993, 1994; Cheng et al., 1996).

Chronisch UV-geschädigte Haut zeichnet sich u.a. durch eine vermehrte Ausbildung stark erweiterter kutaner Blutgefäße aus (Soffen und Blum, 1961; vgl. Kapitel 2.2.1.2). In verschiedenen Arbeiten konnte *in vitro* eine UVB-induzierte Synthese des Angiogenesefaktors VEGF in epidermalen Zellen demonstriert werden (Brauchle et al., 1996; Viac et al., 1997; Longuet-Perret et al., 1998). Die Beteiligung von VEGF an der UVB-

induzierten Angiogenese und die molekularen Grundlagen der UVB-induzierten VEGF-Expression sind bisher noch nicht untersucht worden.

### 2.3 Zielsetzung

Ziel der dieser Arbeit war es, die Regulation des Wachstumsfaktors VEGF in der UVB-induzierten Angiogenese in epidermalen Zellen und im Tiermodell zu charakterisieren. UVB-Strahlung ist in der Lage, neben anderen angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktoren VEGF in der Haut von Versuchsmäusen zu induzieren. Ebenso führt eine UVB-Exposition von epidermalen Zellen und anderen Zelllinien auch *in vitro* zu einer Freisetzung des Angiogenesefaktors VEGF. In keiner der Arbeiten ist bisher ein detaillierte molekularbiologischer Mechanismus der UVB-abhängigen Regulation der VEGF-Expression oder eine kausale Beteiligung der UVB-Strahlung an einer Angiogenese *in vivo* beschrieben worden.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation der UVB-induzierten Expression des Hauptangiogenesefaktors VEGF *in vitro* in humanen sekundären Keratinozyten und in der spontan immortalisierten epidermalen HaCaT-Zelllinie auf RNA- und Proteinebene untersucht werden. Eine Analyse der VEGF-Promotoraktivität nach UVB-Bestrahlung sollte durch die Verwendung von Promotordeletionskonstrukten zur transienten Transfektion von HaCaT-Zellen der Identifikation UVB-sensitiver Sequenzen im Promotor des humanen VEGF-Genes dienen. Weiterhin sollte der Frage nachgegangen werden, ob die UVB-induzierte VEGF-Expression direkt durch die UVB-abhängige Generierung reaktiver Sauerstoffspezies oder indirekt über parakrine oder autokrine Mechanismen vermittelt wird. Zur Klärung der *in vivo*-Relevanz der erzielten *in vitro*-Daten sollte Rolle von VEGF in der UVB-induzierten Angiogenese im Mausmodell untersucht werden.

Zusammenfassend sollten die Untersuchungen zur Risikoabschätzung einer zukünftig gesteigerten UVB-Belastung des Menschen beitragen und der Formulierung neuer protektiver und therapeutischer Strategien zum besseren Verständnis und zur Kontrolle von UVB-induzierten Hautschäden und UVB-vermittelter Tumorprogression dienen.

### 3. Material

#### 3.1 Geräte

Brutschrank (CO <sub>2</sub> -Auto-Zero)	Heraeus, Düsseldorf
ELISA-Reader (Microplate Reader LP 400)	Diagnostics Pasteur, Freiburg
Feinwaage (BP 210 S)	Sartorius, Göttingen
Fotoapparat (F-601M)	Nikon, Düsseldorf
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Faust-Gruppe, Köln
Gekühlte Ultrazentrifuge (Sorvall RC-5B)	DuPont, Wilmington, DE, USA
Gelelektrophoreseapparaturen:	
DNA/RNA (GNA-200)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteine (Protean <sup>®</sup> II xi cell)	Bio-Rad, München
Lichtmikroskop (Diaphot-TMD)	Nikon, Düsseldorf
Luminometer (Typ 2010)	ALL, San Diego, CA, USA
Magnetrührer (IKAMAG)	Janke und Kunkel, Staufen
Mikrozentrifuge (Centrifuge 5417 C)	Eppendorf, Hamburg
Mischrad (Rotator SB1)	Fisher Scientific, Heidelberg
PCR-Thermocycler (PTC-200)	MJ Research Inc., Watertown, Ma, USA
pH-Meter (pH 537)	WTW, Weilheim
Phasenkontrastmikroskop (Diaphot-TMD)	Nikon, Badhoevedorp, Niederlande
Photometer (Ultraspec 3000)	Pharmacia Biotech, Freiburg
Schüttler (IKA-Vibrax, VXR)	Janke und Kunkel, Staufen
Spektroradiometer	Optronics, Orlando, FL, USA
Sterile Werkbank (Hera safe)	Heraeus, Düsseldorf
Thermoinkubator und Schüttler (Certomat U)	Braun Biotech, Melsungen
Thermomixer für 1,5 ml-Reaktionsgefäße (5436)	Eppendorf, Hamburg
Transferapparatur für Proteine (Semi-Dry-Blotter „Pegasus“)	Phase, Lübeck
Ultraschallgerät (MSE100W, Modell 7100)	Colora Meßtechnik, Lorch
UV-Transilluminatoren	Bachofer, Reutlingen
Vortex (IKA, VF 2)	Janke und Kunkel, Staufen
Waage (SPO 63)	Scaltec, Heiligenstadt
Wasserbad	Julabo Labortechnik, Seelbach
Xenon-Hochdruck-UV-Lampe (inkl. Monochromator; Dermolum UMW)	Müller, Moosinning
Zentrifuge (Minifuge 2)	Heraeus, Düsseldorf

#### 3.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Penicillin	Sigma, Deisenhofen
Streptomycin	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Gibco BRL, Berlin
KGM-2 (Keratinocyten-Medium)	Clonetics, Walkersville, MD, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Seromed, Berlin
L-Glutamin	Seromed, Berlin

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Einfrierröhrchen	Corning Costar, Bodenheim
Einmalspritze (1 ml)	Braun, Melsungen
Einmalspritze (20 ml)	Amefa, Kriftel/Taunus
Falcon Plastikgefäß (15 und 50 ml)	Becton Dickinson, Düsseldorf
Filmmaterial	Kodak, Bochum
Kanülen (0,4 x 19 mm)	Becton Dickinson, Düsseldorf
Objektträger	Knittel Gläser, Bad Ems
Plastik-Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Plastikküvetten (67742)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen (Ø 3,5, 6 und 10 cm)	Greiner Labortechnik, Solingen
Zellschaber	Nalge Nunc, Wiesbaden

### 3.4 Chemikalien und Reagenzien

Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Agarose (SiaKem <sup>®</sup> LE)	FMC Bio Products, Rockland, Maine, USA
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
Bactotrypton	Difco, Detroit, MI, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiaminoessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Ethanol (absolut)	Roth, Karlsruhe
Formamid	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI, USA
IPTG	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Lactalbuminhydrolysat	Sigma, Deisenhofen
LipofectAMINE <sup>®</sup>	Life Technology, Eggenstein
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Serva, Heidelberg
PD 153035	Calbiochem, Bad Soden
Protein A-Agarose	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
SDS	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Trizol <sup>®</sup>	Life Technologies, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	Stratagene, La Jolla, CA, USA

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Bio-Rad (München), Life Technologies GmbH (Karlsruhe), ICN (Eschwege), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Sigma (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen.

### 3.5 Antikörper

Zur Neutralisierung von Wachstumsfaktoren und für immunohistochemische Detektionsmethoden wurden folgende Antikörper verwendet:

<u>Spezies</u>	<u>Antikörper</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Maus	anti-hEGF-R (528)	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
Maus	anti-Phosphotyrosin (PY99)	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
Kaninchen	anti-Maus-HRP (Peroxidase-gekoppelt)	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
Kaninchen	anti-hVEGF <sub>121, 165, 189</sub> (A-20)	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
Maus	anti-Kaninchen-IgG	Dako Diagnostics, Hamburg
Kaninchen	anti-Maus-IgG	Dako Diagnostics, Hamburg
Maus	anti-hTGF $\alpha$	Calbiochem, Bad Soden
Maus	anti-h/mVEGF (#577B11)	Texas Biotech., Houston, TX, USA
Kaninchen	nicht-immunspezifisches IgG	Sigma, Deisenhofen
Kaninchen	anti-Faktor VIII RAG	Dako Diagnostics, Hamburg

### 3.6 Zytokine

Epidermal Growth Factor (EGF)

Calbiochem, Bad Soden

### 3.7 Enzyme

Alkalische Phosphatase (isoliert aus Kälberdarm)

Roche, Mannheim

Taq-DNA-Polymerase

Pharmacia Biotech, Freiburg

Restriktionsendonukleasen

AGS, Heidelberg

Roche, Mannheim

T4-DNA-Ligase

Roche, Mannheim

Trypsin/EDTA

Biochrom, Berlin

### 3.8 DNA-Isolierung

Qiaex DNA-Extraktions Kit

Qiagen, Hilden

Qiagen Plasmid-Midi-, Maxi-Kit

Qiagen, Hilden

### 3.9 Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

hEGF-ELISA	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
hTGF $\alpha$ -ELISA	Calbiochem, Bad Soden
hTNF $\alpha$ -ELISA	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
mVEGF <sub>164</sub> -ELISA	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
hVEGF <sub>165</sub> -ELISA	R & D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

### 3.10 Lösungen, Medien, Puffer

AP (Alkalische Phosphatase)-Puffer	10 mM	EDTA
	0,5 mM	HCl, pH 8,0
Blaumarker	0,1 M	EDTA
	1% (w/v)	Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml	Ethidiumbromid in TE (1x)
LB-Medium	10 g	Bactotrypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
LB-Agar	1 l	LB-Medium
	15 g	Bacto-Agar
LB-Amp-Medium	1 l	LB-Medium
	1 ml	Ampicillinlösung (10 mg/ml)
LB-Amp-Agar	1 l	LB-Agar
	1 ml	Ampicillinlösung (10 mg/ml)
Ligase-Puffer (10x)	200 mM	Tris/HCl, pH 8,0
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	100 mM	DDT
	6 mM	ATP
PBS <sup>+/+</sup>	8000 mg	NaCl
	200 mg	KCl
	1150 mg	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	200 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	100 mg	MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O
	100 mg	CaCl <sub>2</sub>
		mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen, pH 7,4

PBS	8000 mg NaCl
	200 mg KCl
	1150 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	200 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen, pH 7,4
SSC (20x)	0,01% (w/v) Gelatine
	3 M NaCl
	0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat x 2H <sub>2</sub> O
TBE (10x)	0,9 M Tris/HCl, pH 8,0
	0,9 M Borsäure
	20 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0
	1 mM EDTA

### 3.11 Primer

Die aufgeführten Primer entstammen Sequenzen aus dem Promotor des humanen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF)-Gens und wurden von der Firma Eurogentech (Köln) synthetisiert.

Primer a1 : 5'- ATTCTCGAGACCCCCATTCTATTCAGAAGATGA - 3'  
 Primer a2 : 5'- AATTCTCGAGATGGGTAATTTTCAGGCTGTGAAC - 3'  
 Primer b : 5'- CGGGACCGGACAGGCGAGCCTCAG - 3'  
 Primer c : 5'- CCTGTCCGGTCCCGGCGGGGC - 3'  
 Primer d : 5'- ATAAGCTTAAGAAGAGGGATAAAACCCGGATC - 3'

### 3.12 Bakterienstämme

*E. coli* (DH5 $\alpha$ ) Life Technologies, Karlsruhe

Genotyp: F<sup>-</sup>  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *deoR*  
*recA1 endA1 hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>, m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA supE44*  $\lambda$ <sup>-</sup>  
*thi-1 gyrA96 relA1*

*E. coli* (TOP 10 F<sup>'</sup>) Clontech, Heidelberg

Genotyp: F<sup>'</sup>(lacI<sup>q</sup>, Tn10 (Tet<sup>R</sup>)) *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 *deoR recA1*  
*araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7679 *galU galK rpsL*(Str<sup>R</sup>)  
*endA1 nupG*

E. coli (XL1 blue)

Stratagene, La Jolla, CA, USA

Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44*  
*relA1 lac[F' proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>)]*

### 3.13 Vektoren

pCMV-βGal

Clontech, Heidelberg

pGL-2

Promega, Heidelberg

pGL-P

Promega, Heidelberg

pTAdv

Clontech, Heidelberg

### 3.14 Zellstämme und Zelllinien

Sekundäre Keratinozyten

Die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Keratinozyten entstammen Explantaten der folgenden Spender:

Spender	Geschlecht	Alter	Ort der Explantat-entnahme
1	m	61	Schläfe
2	w	42	Bauch
3	w	72	Kopf (Capillitium)

HaCaT-Zellen

beschrieben in: Boukamp et al., 1988, 1997;  
 Fusenig und Boukamp, 1998

### 3.15 Mausstämme

Skh-1 (haarloser Mausstamm)

Charles River, Sulzfeld

### 3.16 Biopsien von humanen Plattenepithelkarzinomen und von UVB-bestrahlter Kontrollhaut

Gewebsschnitte aus Plattenepithelkarzinomen zur Analyse der VEGF-Expression stammen aus Geweben, die *in toto* exzidiert und zur immunohistologischen klinischen Untersuchung verwendet worden sind. Ebenso wurden die Gewebsschnitte zur *in vivo* Bestimmung der UVB-induzierten VEGF-Expression von Biopsiematerial angefertigt, welches Patienten zur klinischen Untersuchung nach UVB-Bestrahlung entnommen worden ist.

#### Untersuchte Plattenepithelkarzinome:

<b>Spender</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Lokalisation des Plattenepithelkarzinoms</b>
1	m	87	Gesicht
2	m	82	Schulter
3	w	60	Gesicht
4	w	76	Gesicht
5	m	90	Gesicht
6	m	90	Gesicht
7	m	60	Gesicht

#### Biopsien aus UVB-bestrahlter Normalhaut:

<b>Spender</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Lokalisation der UVB-Bestrahlung</b>
1	m	44	rechte Gesäßhälfte
2	m	58	rechte Gesäßhälfte
3	m	34	rechte Gesäßhälfte

## 4. Methoden

### 4.1 Präparation und Analyse von DNA

#### 4.1.1 Alkohol-Fällung von DNA

<u>Lösungen:</u>	3	M	Natriumacetat, pH 4,8
			Ethanol, absolut, unvergällt
			Isopropanol
	70 %	(v/v)	Ethanol
TE-Puffer	10	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	1	mM	EDTA

Zur Fällung von DNA aus wäßrigen Lösungen wurden zu dem Ansatz  $\frac{1}{10}$  Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 2,5 Vol. absoluter Ethanol gegeben. Bei sehr geringen DNA-Konzentrationen wurde dem Fällungsansatz zusätzlich Glykogen (15  $\mu\text{g/ml}$  Endkonzentration) zugefügt. Nach erfolgter Inkubation (4°C, üN) wurde die DNA für 30 min bei 20.800 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und dem gewünschten Volumen an TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

#### 4.1.2 Aufreinigung von DNA über eine Chloroform/Phenol-Extraktion

Nach der Präparation von DNA können sich Proteine bei weiteren Arbeitsschritten als störend erweisen. Zur Fällung der Proteine wurde 1 Vol. eines Gemisches aus TE-gesättigtem Phenol (pH 7,0; mit einem geringen Anteil an Hydroxychinolin als Radikalfänger) und Chloroform (1:1) dem Ansatz hinzugegeben und danach für 30 sek kräftig gemischt (vortexen). Durch Zentrifugieren dieses Fällungsansatzes lagern sich vorhandene Proteine in einer Interbande zwischen der phenolischen Unterphase und der wäßrigen, DNA enthaltenden Oberphase ab. Nach erfolgter Zentrifugation (10 min, 20.800 x g, RT) wurde die obere, wäßrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Vol. eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) versehen. Der Ansatz wurde erneut kräftig gemischt und zentrifugiert (5 min, 20.800 x g, RT). Um sicherzugehen, daß sämtliches Phenol entfernt worden ist, wurde dieser letzte Waschschrift wiederholt. Die DNA wurde aus der wäßrigen Lösung durch eine

Alkohol-Fällung isoliert und abschließend im gewünschten Volumen an TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

### 4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

#### 4.1.3.1 Photometrische Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Durch das Absorptionsverhalten von Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge ( $\lambda$ ) von 260 nm wird deren Konzentration photometrisch bestimmt. Die Absorption von DNA und RNA bei  $\lambda=260$  nm wurde mit einem Photometer (Ultraspec 3000) gemessen, und mit der Hilfe folgender Gleichung wurde die Konzentration der jeweiligen Nukleinsäure ermittelt:

DNA:	Absorption = $OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
RNA:	Absorption = $OD_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Eine Absorption bei 260 nm von 1 entspricht für dsDNA 50  $\mu\text{g/ml}$ , für ssDNA 20  $\mu\text{g/ml}$  und für RNA 37  $\mu\text{g/ml}$ . Die Konzentrationsmessung wurde mit 1:100 bis 1:500-Verdünnungen in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Flüssigkeitsvolumen von 100  $\mu\text{l}$  vorgenommen. Der Koeffizient  $OD_{260}/OD_{280}$  gibt eine Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäuren und sollte bei 1,8 bis 1,9 liegen.

#### 4.1.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA über Intensitätsvergleiche von DNA-Banden in Agarosegelen

Bei sehr geringen DNA-Konzentration ist die photometrische Bestimmung zu wenig sensitiv. Deswegen wurden geringe DNA-Konzentration über einen Intensitätsvergleich von fluoreszierenden DNA-Banden in Agarosegelen abgeschätzt. Diejenige Bande, für welche die Konzentration bestimmt werden sollte, wurde mit der Fluoreszenzintensität anderer DNA-Banden bekannter Größe und Konzentration (z.B. DNA-Längenmarker) verglichen.

#### 4.1.4 Restriktionsanalysen von DNA

Die Aktivität von Restriktionsenzymen ist definiert, daß 1 Einheit (U) des jeweiligen Enzyms 1 µg DNA in einer Stunde bei 37°C im optimalen Puffersystem vollständig schneidet. Die zu analysierende DNA wurde mit der gewünschten Restriktionsendonuklease in einem vom Hersteller angegebenen Puffer geschnitten.

Für analytische Zwecke wurden 0,2-1 µg, für präparative Zwecke 1-5 µg DNA eingesetzt. Jeder Restriktionsansatz enthielt die in Aqua dest. oder TE-Puffer (pH 8,0) gelöste DNA,  $\frac{1}{10}$  Volumen des Gesamtansatzes an Restriktionspuffer und pro 1 µg zu schneidender DNA 2-5 U Enzym. Sollte gleichzeitig zur Restriktion RNA degradiert werden, wurde 1 µl RNase (1 mg/ml) zugefügt.

Die Restriktionsansätze wurden bei Ansätzen mit nur einem Restriktionsenzym 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert, bei gleichzeitiger Restriktion mit mehreren Enzymen wurde eine Inkubation üN bei 37°C gewählt. Anschließend wurde die DNA aus dem Restriktionsansatz gefällt und im gewünschten Volumen TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

#### 4.1.5 DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

<u>Lösungen:</u>	PCR-Puffer (10x)	100	mM	Tris/HCl, pH 8,3
		500	mM	KCl
		15	mM	MgCl <sub>2</sub>
	dNTP (10x)	2	mM	dATP, dCTP, dGTP, dTTP, pH 7,5

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die selektive Anreicherung spezifischer DNA-Fragmente. Dabei nutzt man die Eigenschaften von DNA-Polymerasen aus, die einen Einzelstrang zu einem Doppelstrang aufpolymerisieren können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht.

Die zu amplifizierenden Sequenzen läßt man nach eine Denaturierung in Einzelstränge mit einem Überschuß von zwei chemisch synthetisierten Oligonukleotiden (Primern) hybridisieren. Diese stammen aus dem Randbereich der zu amplifizierenden Sequenz und sind strangspezifisch, d.h. sie sind komplementär zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge.

Für die Polymerisationsreaktion wurde eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* verwendet (Taq-Polymerase). Dieses Enzym

besitzt ein Temperaturoptimum von über 70°C und ist für kurze Zeit bei Temperaturen von bis zu 95°C stabil.

Die Reaktionsbedingungen der PCR sind von der Temperatur der einzelnen Schritte eines Zyklus, der Salzkonzentration, der Reinheit der DNA-Matrize und der Länge und der Komplementarität der verwendeten Oligonukleotide abhängig und müssen daher für jede Reaktion empirisch ermittelt werden.

Ein typischer in dieser Dissertation verwendeter PCR-Ansatz besteht aus folgenden Komponenten:

1	µl	DNA-Matrize (5-10 ng)
1	µl	25 pmol je Primer (sense und antisense)
2,5	µl	dNTP (10 x)
2,5	µl	PCR-Puffer (10 x)
0,5	µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
16,5	µl	dH <sub>2</sub> O
<hr/>		
Σ	25	µl

Der PCR-Ansatz wurde mit 20 µl Mineralöl überschichtet, um durch Kondensation bedingte Konzentrationsänderungen zu vermeiden.

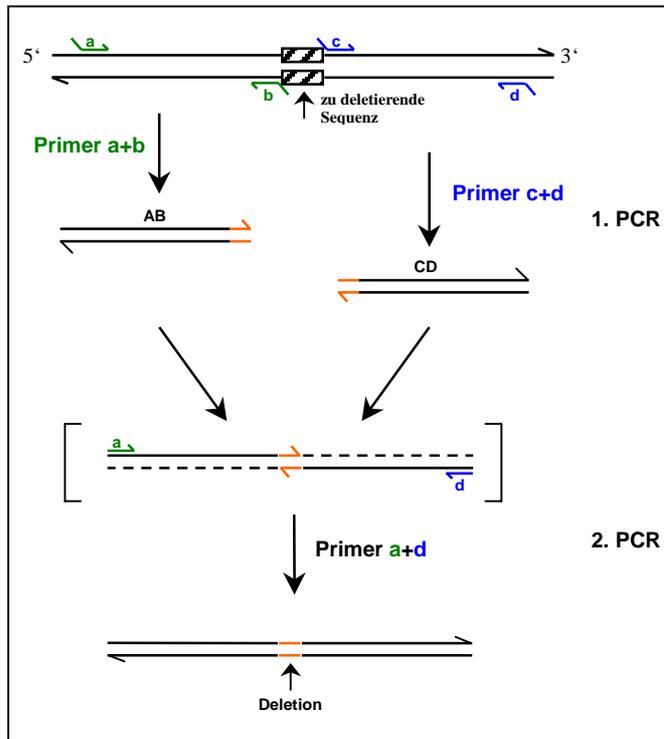
Von der Schrittabfolge war eine PCR wie folgt aufgebaut:

25-30 x		‘hot start‘	4 min bei 94°C
		Denaturierung	1 min bei 94°C
		Hybridisierung der Primer	1 min bei 63°C
		Polymerisation	2 min bei 72°C
		Abkühlung	4°C

Es wurden 25-30 Zyklen durchgeführt. Das Mineralöl wurde nach Beendigung der PCR durch kurzes Gefrieren des wässrigen PCR-Ansatzes (5 min, -20°C) und Abnehmen des bei diesen Temperaturen noch flüssigen Mineralöls entfernt.

### 4.1.6 PCR-abhängige *in vitro* Mutagenese

(Pogulis et al., 1996)



**Abb. 13** Prinzip der auf PCR basierenden *in vitro* Mutagenese  
(modifiziert nach Pogulis et al., 1996)

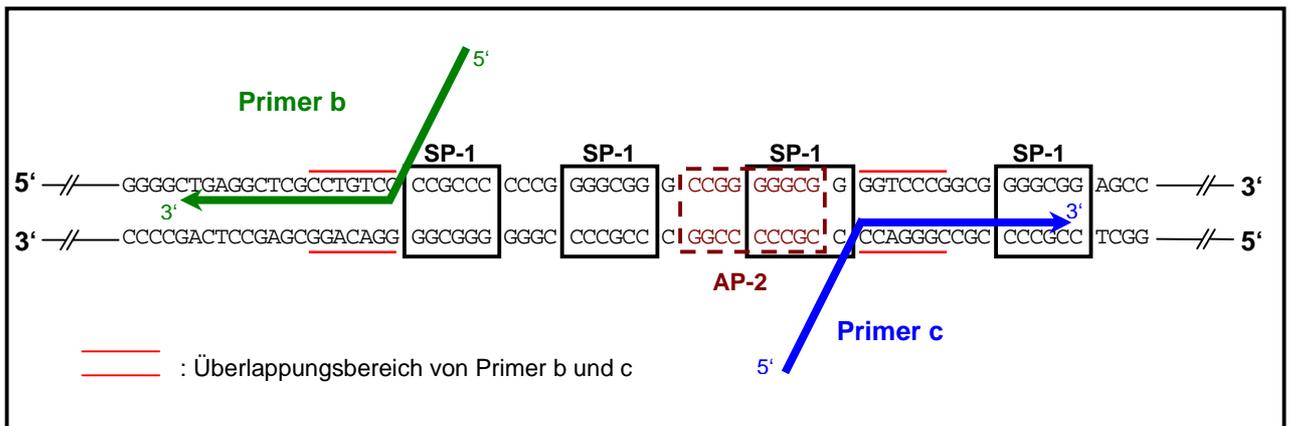
Neben der Amplifikation von DNA-Sequenzen bietet die Polymerase-Kettenreaktion vielfältige Möglichkeiten zur Einbringung von Modifikation oder Mutationen in ausgewählte DNA-Sequenzen.

Die Modifikation von DNA-Sequenzen wird durch die Verwendung synthetischer Oligonukleotid-Primer möglich, welche zwar mit ihren 3'-Enden zur DNA-Matrize komplementär sein müssen, bei denen jedoch die 5'-Enden spezifische Sequenzveränderungen, wie z.B. Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen, enthalten können. Bei der Anwendung dieser Technik sind

allerdings nur Veränderungen an den Randbereichen der zu amplifizierenden DNA-Sequenzen möglich. Durch eine sogenannte "overlap extension" (Überlappungs- und Verlängerungs-) Methode ist es jedoch auch möglich, inmitten der zu amplifizierenden DNA Modifikationen (Punktmutationen, Insertionen und Deletionen) einzufügen. Diese Methode ist zur Veranschaulichung in Abb. 13 schematisch dargestellt. Für die "overlap extension"-Methode werden Primer so gewählt, daß in einer ersten PCR zwei verschiedene PCR-Produkte mit einem überlappenden Sequenzabschnitt entstehen. Diese beiden sich überlappenden PCR-Fragmente werden dann in einer zweiten PCR miteinander verbunden.

In dieser Anwendung wurde die auf PCR basierende *in vitro* Mutagenese dazu verwendet, 27 bp in der Promotor-Region zweier VEGF-Promotor/Luciferase-Transfektionskonstrukte (VEGF.1 und VEGF.9) zu deletieren. Dieser zu mutierende Bereich umfaßte vier aufeinanderfolgenden SP-1- und eine überlappende AP-2-Transkriptionsfaktor-Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft zum Transkriptionsstart der Konstrukte. Drei von vier SP-1-

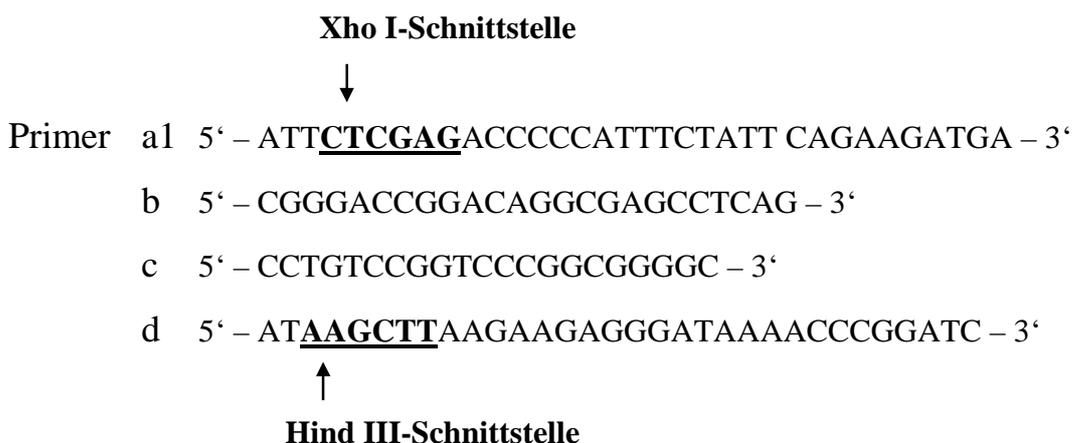
Bindungsstellen wurden mit der überlappenden AP-2-Bindungsstelle deletiert. In Abb. 14 wird das Prinzip der Deletion der SP-1/AP-2-Gruppe verdeutlicht.



**Abb. 14** Partielle Deletion einer SP-1/AP-2-Gruppierung in VEGF-Promotorkonstrukten über *in vitro* Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese erfolgte wie oben beschrieben in zwei Abschnitten, wobei die beiden in der ersten PCR entstandenen Teilprodukte in der zweiten PCR gemeinsam als DNA-Matrize fungierten.

Folgende Primer wurden zur Mutation des Promotorkonstruktes VEGF.1 verwendet:



Folgende Primer wurden zur Mutation des Promotorkonstruktes VEGF.9 verwendet:

**Xho I-Schnittstelle**



Primer a2 5' – AATTCTCGAGATGGGTAATTTTCAGGCTGTGAAC – 3'

b 5' – CGGGACCGGACAGGCGAGCCTCAG – 3'

c 5' – CCTGTCCGGTCCCGGGCGGGGC – 3'

d 5' – ATAAAGCTTAAGAAGAGGGATAAAAACCCGGATC – 3'



**Hind III-Schnittstelle**

Ein 1,7 kbp großes BamH I-Fragment aus dem humanen VEGF-Promotor diente jeweils bei der ersten PCR als DNA-Matrize.

Die PCR wurde wie auf Seite 40 beschrieben durchgeführt. Die Produkte dieser ersten PCR wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Kapitel 4.1.7) und dienten nach Isolierung aus dem Agarosegel (s. Kapitel 4.1.8) bei der folgenden PCR als DNA-Matrize.

Für die zweite PCR der *in vitro* Mutagenese, bei der die PCR-Produkte A<sub>1</sub>B bzw. A<sub>2</sub>B und CD mit gemeinsamen, überlappenden Sequenzen als DNA-Matrize dienten, wurden folgende Bedingungen gewählt:

7,5	μl	DNA-Matrize (2,5 μl A <sub>1</sub> B oder A <sub>2</sub> B; 5 μl CD; jeweils ~10 ng)
1	μl	25 pmol je Primer (a1 bzw. a2 und d) -> 2μl
2,5	μl	dNTP (10 x)
2,5	μl	PCR-Puffer (10 x)
0,5	μl	Taq-Polymerase (5 U/μl)
11,0	μl	dH <sub>2</sub> O

---

Σ 25 μl

Folgender Temperaturverlauf der PCR wurde gewählt:

PCR A<sub>1</sub>D und A<sub>2</sub>D (Zyklus 1)

Denaturierung	5	min bei 94°C
Hybridisierung*	1	min bei 46°C
Polymerisation	2	min bei 72°C

PCR A<sub>1</sub>D und A<sub>2</sub>D (Zyklen 2-30)

Denaturierung	1	min bei 94°C
Hybridisierung	1	min bei 58°C
Polymerisation	2	min bei 72°C

\* Bem.: Die Hybridisierungstemperatur wurden entsprechend der Schmelzpunkte der verwendeten Primer gewählt.

Die mutierten PCR-Produkte der zweiten PCR wurden direkt in einen PCR-Klonierungsvektor (pT-Adv, Clontech, Heidelberg) kloniert und nach erfolgter Ligation (s. Kapitel 4.1.9.2) in einen geeigneten *E. coli*-Stamm transformiert (s. Kapitel 4.2.3).

#### 4.1.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

<u>Lösungen:</u>	TBE (10 x)	0,89	M	Tris/HCl, pH 8,0
		0,89	M	Borsäure
		20	mM	EDTA
	5x Blaumarker	15,0 %	(w/v)	Ficoll
		0,25 %	(w/v)	Xylencyanol
		0,25 %	(w/v)	Bromphenolblau
	Ethidiumbromid	10 mg/ml		in H <sub>2</sub> O

Für die analytische und präparative Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Gelkammern verwendet. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurde 0,6 - 1,5 % Agarose verwendet. Die Agarose wurde bis zur vollständigen Lösung in 1x TBE-Puffer auf 100°C erhitzt.

Je nach DNA-Fragmentgröße wurden folgende Agarosekonzentrationen verwendet:

Agarose - konzentration (%)	Trennbereich (kbp)
0,3	5 – 60
0,5	1 – 30
0,7	0,8 – 12
1,0	0,5 – 10
1,2	0,4 – 7
1,5	0,2 – 3
2,0	0,05 – 2

Nach Abkühlung der Agarose auf etwa 60°C und Zusatz von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml wurde die flüssige Agarose in die Gelkammern gegossen. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TBE überschichtet. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurde diese mit  $\frac{1}{10}$  Vol. Blaumarker versetzt. Nach 10 min langer Denaturierung bei 68°C erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente bei 2-3 V/cm<sup>2</sup> Gleichspannung.

Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden zusätzlich DNA-Längenmarker aufgetragen wie beispielsweise  $\lambda$ -DNA mit Eco RI und Hind III geschnitten (Marker III, Roche, Mannheim; Fragmentgröße: 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226 bp).

#### 4.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurden die gewünschten DNA-Banden mit sterilen (DNase-freien) Skalpellklingen auf einem UV-Transilluminator ausgeschnitten und in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Isolierung der DNA aus den Agaroseblöcken erfolgte nach unterschiedlichen Methoden.

#### 4.1.8.1 Phenol-Extraktion

Die ausgeschnittenen Agarosestücke wurden in eine 1 ml-Spritze gegeben und durch eine Kanüle in ein Eppendorfgefäß gepreßt. Um ein sogenanntes 'Totvolumen' in der Kanüle zu vermeiden, wurde anschließend ein kleines Stück DNA-freie Agarose durch die Kanüle gedrückt. Die Agarose wurde dreimal für je 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 60-65°C wieder aufgetaut. Nach der Zugabe von 1 Vol. Phenol und kräftigem Mischen (vortexen), wurde der Ansatz für 5 min bei 20.800 x g und RT zentrifugiert. Die obere, wäßrige Phase, in der sich die DNA befand, wurde in ein neues Eppendorfgefäß gegeben und der Rest der Agarose-Phenol-Phase, mit 100 µl TE-Puffer reextrahiert. Nach erneutem Mischen und Zentrifugieren unter den oben aufgeführten Bedingungen wurde die obere Phase ebenfalls in das Eppendorfgefäß gegeben. Diese DNA-haltige Phase wurde nun dreimal mit 1 Vol. Chloroform extrahiert, um sämtliches Phenol zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit  $\frac{1}{10}$  Vol. 4 M LiCl und 2 Vol. absolutem Ethanol oder alternativ mit  $\frac{1}{2}$  Vol. 5 M NH<sub>4</sub>-Acetat und 2 Vol. absolutem Ethanol üN bei 4°C gefällt. Die DNA wurde danach für 30 min bei 20.800 x g und 4°C abzentrifugiert, das Pellet zweimal mit 70%igem, eiskalten Ethanol gewaschen und in 20 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

#### 4.1.8.2 Isolierung über 'QUIAEX II-DNA-Gel-Extraction-Kit'

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA für Sequenzierungs- oder PCR-Reaktionen wurde das kommerziell erhältliche DNA-Isolierungs-System der Firma QUIAEX verwendet. Die DNA wird bei dieser Isolierungsmethode dabei unter hohen Salzkonzentrationen an Partikel aus Silikagel gebunden und abschließend in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. DNA-Fragmente der Größe von 40 bp bis 50 kbp können mit dieser Extraktionsmethode isoliert werden. Die Isolierung wurde nach Angaben des Hersteller durchgeführt.

### 4.1.8.3 Elektroelution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

<u>Lösungen:</u>	LET-Puffer	20	mM	Tris/HCl, pH 7,0
		1	M	LiCl
		0,1	mM	EDTA

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel ober- und unterhalb der zu eluierenden Bande(n) mit einem sterilen Skalpell eingeschnitten und in die so entstandenen Taschen DEAE-Membranfilterstücke eingesetzt. Durch Fortsetzen der Elektrophorese ging die DNA auf die Membran über, was durch Betrachten des Membranfilters unter UV-Licht kontrolliert werden konnte. Das Membranfilterstück wurde kurz in TE-Puffer gewaschen und mit 300 µl LET-Puffer versetzt. Durch eine 60minütige Inkubation der Membranfilterstücke bei 70 °C wurde die DNA von der Membran gelöst. Die DNA wurde über die Phenol-Extraktionsmethode aufgereinigt und aus der wäßrigen Lösung durch eine Alkohol-Fällung isoliert. Abschließend wurde die DNA im gewünschten Volumen an TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

## 4.1.9 Klonierung von DNA

### 4.1.9.1 Dephosphorylierung der Vektor-DNA

<u>Lösungen:</u>	Dephosphorylierungs-	500	mM	Tris/HCl, pH 8,5
	Puffer (10x)	1	mM	EDTA
		100	mM	ZnCl <sub>2</sub>

Um nach Linearisierung eines Plasmidvektors mit geeigneten Restriktionsendonukleasen eine Religation des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Enden der Vektor-DNA mit einer aus Kälberdarm isolierten alkalischen Phosphatase (CIP) dephosphoryliert.

<u>Reaktionsansatz:</u>	50	µl	linearisierte Vektor-DNA (100 ng/ml)
	10	µl	Dephosphorylierungs-Puffer (10x)
	1	µl	CIP (1 U/µl)
	39	µl	dH <sub>2</sub> O
	<hr/>		
	Σ	100	µl

Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut 1 Einheit (U) der alkalischen Phosphatase hinzugegeben und die Dephosphorylierung mit anschließender Inkubation für 45 min bei 50°C abgeschlossen. Eine für die nachfolgende Ligation erforderliche Inaktivierung der Phosphatase wurde durch 10minütiges Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 68°C erreicht. Eine Phenol-Extraktion zur Beseitigung der alkalischen Phosphatase ist durch die Hitze-Inaktivierung nicht notwendig.

#### 4.1.9.2 Ligation von DNA-Fragmenten mittels T4-Ligase

<u>Lösungen:</u>	T4-DNA-Ligase-Puffer	500	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	(10x)	100	mM	MgCl <sub>2</sub>
		100	mM	DTT
		6	mM	ATP

Für die Ligation von DNA-Fragmenten mit komplementären "sticky ends" oder "blunt ends" wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Bei der Ligation eines Vektors mit einer Insert-DNA betrug das molare Verhältnis 1 : 3.

Ein typischer in dieser Dissertation verwendeter Ligationsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

	1	μl	Vektor-DNA (100 ng/μl)
	x	μl	Insert-DNA
	2	μl	T4-DNA-Ligase (1 U/μl)
	2	μl	T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)
	y	μl	dH <sub>2</sub> O
	<hr/>		
	Σ	20	μl

Die Ligation erfolgte üblicherweise bei 4°C oder für mindestens 6 Stunden bei 16°C. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde für eine nachfolgende Transformation von kompetenten Bakterien eingesetzt, der Rest bei -20°C aufbewahrt.

## 4.2 Techniken zur Arbeit mit *Escherichia coli*

### 4.2.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien

<u>Lösungen:</u>	LB-Medium	10	g	Bactotrypton
		5	g	Hefeextrakt
		5	g	NaCl
				mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
	LB-Agar	1	l	LB-Medium
		15	g	Bacto-Agar

Zur Anzucht der verschiedenen Bakterienstämme wurden jeweils 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft bzw. aus einem Glycerin-Stock mit einer Impföse inokuliert. Bei antibiotikaresistenten Stämmen enthielt das Medium das jeweilige Antibiotikum in einer vorgegebenen Konzentration (Ampicillin: 100 µg/ml, Tetracyclin: 50 µg/ml). Die Bakterien inkubierten auf einem Schüttler (200 Upm) üN bei 37°C. Eine kurzfristige Stammhaltung erfolgte auf LB-Agar-Platten. Bei einer Antibiotikaresistenz der Bakterien wurde das entsprechende Antibiotikum dem Agar vor dem Gießen der Agar-Platten zugesetzt. Die Bakterien wurden aus der Flüssigkultur auf Agar-Platten ausplattiert und zum Wachstum üN bei 37°C inkubiert. Eine Lagerung von Bakterienkolonien auf Agar-Platten ist bei 4°C mehrere Wochen lang möglich. Zur längerfristigen Stammhaltung wurden 0,8 ml einer 3 ml-üN-Kultur mit 0,2 ml Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei -80°C können diese Zellen mehrere Jahre aufbewahrt werden.

### 4.2.2 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

Zur Transformation rekombinanter Plasmid-DNA in kompetente Bakterien wurden je nach Versuchsansatz verschiedene *Escherichia coli*-Stämme (DH5α, TOP 10 F' oder XL1 blue) verwendet. Der Transformationsansatz wurde mit 100 µl auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (2 min bei 37°C oder alternativ 30 sek bei 42°C) und Inkubation von 2 min auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zu den Zellen gegeben und diese 1 h bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Von dieser Kultur wurden 100 µl direkt auf LB-Agar-Platten mit zusätzlichem Selektionsmarker ausplattiert, die Restkultur wurde 5 min bei 1.500 x g und RT abzentrifugiert und in 100 µl

LB-Medium aufgenommen. Dieser Ansatz wurde ebenfalls auf LB-Agar-Platten mit zugefügtem Selektionsmarker ausplattiert.

### 4.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

#### 4.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA für analytische Zwecke

<u>Lösungen:</u>	L1	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
		10 mM	EDTA
	L2	200 mM	NaOH
		1 % (w/v)	SDS
	L3	3 M	Kaliumacetat, pH 4,8

Zur Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurden mit je einer Bakterienkolonie 6 ml LB-Medium angeimpft, welches zuvor mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum versehen worden ist. Die Flüssigkultur inkubierte auf einem Schüttler üN bei 37°C. Vier ml dieser Kultur wurden bei 10.600 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 200 µl der Lösung L1 durch Vortexen resuspendiert. Durch Zugabe von 400 µl der Lösung L2 und einer 5minütigen Inkubation auf Eis lysierten die Bakterien. Anschließend wurde durch Zugabe von 300 µl der Lösung L3 bakterielle Proteine zusammen mit anhaftender chromosomaler DNA für 5 min auf Eis gefällt. Durch eine nachfolgende Zentrifugation für 10 min bei 20.800 x g und RT wurden die Proteine zusammen mit der chromosomalen DNA pelletiert und der plasmidhaltige Überstand in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA über eine Chloroform/Phenol-Extraktion isoliert (s. Kapitel 4.1.2). Die Fällung der DNA erfolgte mit 0,8 Vol. Isopropanol mit anschließender 35minütiger Zentrifugation bei RT und 20.800 x g. Die DNA wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in dem gewünschten Volumen an TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

#### 4.2.3.2 Präparation von Plasmid-DNA für präparative Zwecke

<u>Lösungen:</u>	P1	50 mM	Tris/HCl, pH 8,0
		10 mM	EDTA
		400 µg/ml	RNase A
	P2	200 mM	NaOH
		1 % (w/v)	SDS

P3	2,55	M	Kaliumacetat, pH 4,8
QBT	50	mM	MOPS, pH 7,0
	750	mM	NaCl
	15 %	(v/v)	Ethanol
	0,15 %	(w/v)	Triton X-100
QC	50	mM	MOPS, pH 7,0
	1	M	NaCl
	15 %	(v/v)	Ethanol
QF	50	mM	MOPS, pH 8,2
	1,25	M	NaCl
	15 %	(v/v)	Ethanol

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden Anionenaustauscher-Säulen (Firma Qiagen, Hilden) verwendet. Es wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µl einer frischen üN-Kultur angeimpft und üN bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Je nach Antibiotikaresistenz der Plasmide wurde ein entsprechendes Antibiotikum der Bakterienkultur zugegeben (Konzentrationsangaben s. Kapitel 4.2.1).

Nach Zentrifugation dieser üN-Kultur für 10 min bei 5.000 x g und 4°C wurde das Bakterienpellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurde das gleiche Volumen des Puffers P2 hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen folgte eine Inkubation von 5 min bei RT. Bei diesem Reaktionsschritt wurden die Bakterienzellen aufgeschlossen, die DNA wurde denaturiert und RNA wurde abgebaut. Durch die Zugabe von 4 ml Puffer P3 fielen chromosomale Bakterien-DNA und denaturierte Proteine aus und wurden nach mehrmaligem Schwenken für 30 min bei 5.000 x g und RT abzentrifugiert. Der Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und erneut unter den gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Die Anionenaustauscher-Säulen wurden vor der Beladung mit 3 ml Puffer QBT äquilibriert. Der partikelfreie Plasmid-DNA-haltige Überstand wurde danach auf die Säulen gegeben, welche anschließend zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen wurden. Während dieser Waschvorgänge blieb die Plasmid-DNA an dem Säulenmaterial gebunden und wurde mit 2 ml Puffer QF eluiert. Nach der Elution wurde die Plasmid-DNA mit 0,8 Vol. Isopropanol gefällt und für 30 min bei 20.800 x g und RT zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde die DNA bei RT getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (pH 8,0) oder Aqua dest. aufgenommen.

## 4.3 Techniken und Methoden zur Arbeit mit humanen Zellen

### 4.3.1 Allgemeine Kulturbedingungen

<u>Lösungen:</u>	PBS	8000	mg	NaCl
		200	mg	KCl
		1150	mg	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		200	mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
				mit dH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen, pH 7,4
	2 % EDTA-Lösung	6,85	mM	EDTA mit PBS auf 500 ml auffüllen
	Trypsin-Lösung	0,05 %	(v/v)	Trypsin (1,4 U/ml)
		0,02 %	(w/v)	EDTA

Die humane HaCaT-Zelllinie wurde mit Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), wenn nicht anders beschrieben, in 10 cm (Ø) beschichteten Gewebekulturschalen bei einer Temperatur von 37°C und einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % O<sub>2</sub> kultiviert. Diese Zelllinie ist aus spontan transformierten Keratinozyten hervorgegangen (Boukamp et al., 1988, 1997; Fusenig und Boukamp, 1998). Dem Wachstumsmedium dieser Zellen wurde 10 % fötales Kälberserum, Penicillin (400 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml) und Glutamin (2 mM) hinzugefügt. In dieser Zusammensetzung wurde das Medium als DMEM<sup>+/+</sup> (10 % FCS) bezeichnet.

Humane primäre Keratinozyten wurden unter früher publizierten Kultivierungsbedingungen gehalten (Breitkreutz et al., 1984). Ein konfluentes Wachstum von humanen Keratinozyten führt zu einer Differenzierung und zum Wachstumsarrest. Um die Differenzierung zu vermeiden, wurden Keratinozyten bei einer maximalen Konfluenz von 75 % passagiert und in der 2. bis 6. Passage in Experimenten verwendet während HaCaT-Zellen zwischen der 50. und 160. Passage eingesetzt wurden.

Zum Passagieren der Zellen wurde das Wachstumsmedium der Zellen abgesaugt und die Zellen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Zum Ablösen von HaCaT-Zellen und Keratinozyten wurden die Zellen mit einer 2 %igen EDTA-Lösung für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit Trypsin-Lösung für 10 min bei 37°C. Bei humanen Keratinozyten wurde diese Reaktion mit einer 10 %igen FCS/PBS-Lösung unterbrochen. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 200 x g und RT wurden die Keratinozyten vorsichtig in Wachstumsmedium (KGM-2, Clonetics, Walkersville, MD, USA)

resuspendiert und in der gewünschten Zelldichte ausgesät. Da das Wachstumsmedium von HaCaT-Zellen (DMEM<sup>+/+</sup>) mit 10 % FCS versehen ist, entfiel dieser Schritt bei ihrer Kultivierung.

### 4.3.2 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

<u>Lösungen:</u>	Einfriermedium	10 % (v/v)	DMSO im jeweiligen Kulturmedium der Zellen
	alternativ:	10 % (v/v)	DMSO in fötalem Kälberserum (FCS)

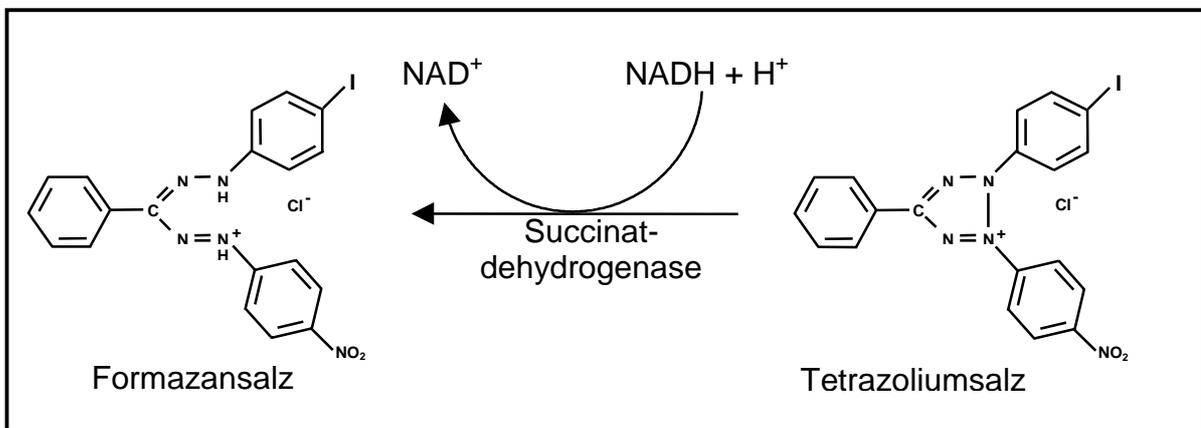
Die langfristige Lagerung von HaCaT-Zellen und Keratinozyten erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C. Um die Zellen beim Einfrieren vor der Bildung von Eiskristallen zu schützen, wird dem Einfriermedium Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt.

Die Zellen wurden wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben von der Zellkulturplatte abgelöst und 10 min bei 200 x g in einer Heraeus-Zentrifuge sedimentiert. Die Zellen wurden in einer Zelldichte von 10<sup>6</sup> Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert und in Aliquots von 1 ml in Einfrierröhrchen überführt. Um eine langsame Temperatursenkung während des Einfriervorgangs zu garantieren wurden die Einfrierröhrchen zunächst in mit Isopropanol gefüllten Einfriergefäßen üN bei -70°C gelagert und am nächsten Tag in einen Tank mit Flüssigstickstoff überführt.

Zur Reaktivierung wurde die Zellen bei 37°C im Wasserbad ‚angetaut‘. Bei diesem Schritt ist darauf zu achten, daß ein kleiner Eiskern im Einfrierröhrchen verbleibt, da der Konservierungsstoff DMSO sich bei RT als äußerst zytotoxisch erweist. Die Zellen wurden in 10 ml eiskaltem DMEM<sup>+/+</sup> mit 10 % FCS aufgenommen, in Zentrifugationsröhrchen überführt und anschließen für 10 min bei 200 x g und 4°C sedimentiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in frischem, auf 37°C vorgewärmten Kulturmedium aufgenommen und mit je 10<sup>6</sup> Zellen in 10 cm (Ø) Zellkulturschalen ausgesät.

### 4.3.3 Vitalitätsbestimmung von Zellen

Der nachfolgend beschriebene MTT-Test dient dazu, die Vitalität von Zellen in der Zellkultur insbesondere nach der Applikation bestimmter Stressoren wie Bestrahlung von Zellen oder Inkubation mit chemischen Agenzien zu bestimmen (Mosmann 1983; Hansen 1989). Grundlage dieser Analyse ist, daß das wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden, metabolisch aktiven Zellen durch eine mitochondriale Dehydrogenase in ein blaues, unlösliches Formazansalz umgewandelt wird, dessen Absorption als Maß für die Vitalität der Zellen photometrisch bestimmt werden kann.



**Abb. 15 Prinzip des MTT-Tests: Bildung von Formazansalz als Parameter für die Vitalität von Zellen.**

Zur Aufnahme des Tetrazoliumsalzes werden die Zellen mit einer 10%igen MTT-Lösung in DMEM<sup>+/+</sup> für 20-30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Aufnahme wird das Tetrazoliumsalz von einer mitochondrialen Succinatdehydrogenase chemisch modifiziert. Es werden von dem Enzym Wasserstoffionen auf das Tetrazoliumsalz übertragen, wodurch der Tetrazoliumring gespalten wird und ein blaues, unlösliches Formazansalz entsteht (s. Abb. 15). Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das MTT-haltige DMEM<sup>+/+</sup> abgesaugt und die Zellen mit DMSO solubilisiert. Das in DMSO gelöste Formazan wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 560 nm mit einer Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert. Der Nullabgleich erfolgte dabei durch Messung von reinem DMSO. Die Vitalität der Zellen bzw. die Zytotoxizität einer Behandlung wurde als Prozent der Formazan-Bildung der behandelten Zellen, verglichen mit der Formazan-Bildung unbehandelter Zellen nach folgenden Formeln bestimmt:

$$\begin{aligned} \% \text{ Vitalität} &= \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}} \times 100 \\ \% \text{ Zytotoxizität} &= \left[ 1 - \frac{\text{OD (behandelte Zellen)}}{\text{OD (Kontroll-Zellen)}} \right] \times 100 \end{aligned}$$

In Experimenten wurden ausschließlich solche Versuchsbedingungen gewählt, bei denen die Zellen 24 h nach einer Behandlung noch mindestens eine Vitalität von 80 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrolle aufwiesen.

#### 4.3.4 Mykoplasmentest

<u>Lösungen:</u>	Färbe-Stammlösung	50 µg/ml	Hoechst 33258 (Bisbenzimid) in dH <sub>2</sub> O lösen, bei 4°C lagern
	Färbelösung	0,05 µg/ml	Färbe-Stammlösung 1:1000 in McIlvaine-Puffer verdünnen, pH 5,5
	McIlvaine-Puffer	19,79 g/l 8,53 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Zitronensäure, pH 5,5
	Carnoy's Fixativ		Methanol/ Essigsäure (3:1)
	Einbettmedium		Glycerol/ McIlvaine-Puffer (1:1), für Dauerpräparate 0,02% Na-Azid zugeben

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht. Bei Mykoplasmen handelt es sich um zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, welche parasitär Zellen befallen können. Mykoplasmen können das geregelte Zellwachstum beeinflussen bzw. die Reaktionen von Zellen auf bestimmte Stimuli verändern. Da sie lichtmikroskopisch nicht zu sehen sind, bleiben sie ohne eine geeignete Detektionsmethode unerkannt. Durch den Einsatz des fluoreszierenden

Farbstoffes Bisbenzimid (Hoechst 33258) erfolgte die Kontrolle der Zellkulturen (Chen et al., 1977).

Zellen wurden in einer Dichte von etwa 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> auf einem Deckgläschen in einer Zellkulturschale (Ø 3,5 cm) ausgesät und mit 1,5 ml DMEM<sup>+/+</sup> mit 10 % FCS überschichtet. Nach 2 Tagen Inkubation im Brutschrank wurden die nicht konfluenten Zellen auf dem Deckgläschen mit 2 ml PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und für 10 min in 1 ml Carnoy's Fixativ (Methanol/Eisessig, 3:1) fixiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit je 2 ml McIlvaine-Puffer und eine 15minütige Inkubation in 1 ml Bisbenzimid-Lösung (0,05 µg/ml). Nach zweimaligem Waschen mit dH<sub>2</sub>O konnte das Deckgläschen mit den Zellen auf einen Objektträger mit 20 µl Einbettmedium fixiert werden.

Innerhalb der nächsten 20 min wurden die angefärbten Zellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm auf Mykoplasmen kontrolliert. Durch den Farbstoff Bisbenzimid wird selektiv DNA angefärbt. Nicht kontaminierte Kulturen zeigten eine deutliche hellblaue Fluoreszenz, welche ausschließlich auf den Zellkern beschränkt ist. Zellkulturen mit Mykoplasmen zeigten neben dem fluoreszierenden Zellkern eine deutliche Fluoreszenz im Bereich der äußeren Zellmembran und zwischen den Zellen. Die Mykoplasmen erschienen entweder als gleichmäßig über die Zytoplasmamembran verteilte Partikel oder sie bildeten Aggregate auf der Zelloberfläche und/oder zwischen den Zellen. Kontaminierte Zellen wurden autoklaviert und entsorgt.

### **4.3.5 UVB-Bestrahlung von Zellen**

#### **4.3.5.1 Monochromatische UVB-Bestrahlung**

Für die monochromatische UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen wurde eine Xenon-Hochdruck-UV-Quelle in Kombination mit einem Monochromator mit holographischem Gitter verwendet (Dermolum UMW, Müller, Moosinning). Nach der Aussaat in 3,5 cm (Ø) Schalen, einer Wachstumsperiode von 24 h und einer anschließenden Inkubation in serumfreien Medium für 18 h wurden die Zellen zweimal mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und unter einem Film von PBS<sup>+/+</sup> mit verschiedenen Dosen (1 bis 500 mJ/cm<sup>2</sup>) der Wellenlängen  $\lambda = 285, 295, 305$  und 315 nm bei einer Spaltenbreite von 5 nm bestrahlt. Um eine konstante Intensität und ein gleichmäßiges Bestrahlungsspektrum zu gewährleisten, wurde die

Bestrahlungsquelle vor Beginn der Experimente mittels eines Spektroradiometers (OL-754; Optronics, Orlando, FL, USA) dosimetrisch und einer spektrometrisch analysiert. Um eine gleichmäßige Bestrahlung der Schalen zu garantieren, wurden die Zellkulturschalen während der Bestrahlung auf einer rotierenden Platte fixiert. Nach der Bestrahlung wurde das PBS<sup>+/+</sup> abgesaugt und die Zellen mit 1 ml serumfreien DMEM<sup>+/+</sup>-Mediums inkubiert.

#### 4.3.5.2 Bestrahlung von Zellen mit dem Gesamt-UVB-Spektrum

Für die Bestrahlung von Keratinozyten und HaCaT-Zellen mit verschiedenen Dosisbereichen des gesamten UVB-Spektrums (280 bis 320 nm) wurde ebenfalls die Xenon-Hochdruck-UV-Quelle verwendet, wobei der Monochromator auf eine Wellenlänge von 300 nm mit einer Spaltenbreite von 17,5 nm eingestellt war. Durch diese Einstellungen wurde ein Wellenlängenbereich von 282,5 bis 317,5 nm abgedeckt, was mit dem UVB-Spektrum nahezu identisch ist. Die Bestrahlungsintensität betrug durchschnittlich 0,4 mW/cm<sup>2</sup>.

Nach subkonfluentem Wachstum und einer 18stündigen Inkubation mit DMEM<sup>+/+</sup> ohne FCS wurden das Medium von den Zellen genommen. Bei einer späteren Inkubation der Zellen mit dem konditionierten Medium wurde dieses bis nach der Bestrahlung in Reaktionsgefäßen verwahrt. Die Zellen wurden unter Verwendung eines UVC-Filters (Müller, Moosinning) unter einem dünnen Film von PBS<sup>+/+</sup> mit UVB-Dosen von 5 bis 20 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Dieser Dosisbereich weist *in vitro* eine vernachlässigbare Zytotoxizität und ist von physiologischer Relevanz, da UVB-Strahlung dieser Intensität *in vivo* bis zu den basalen Keratinozyten der humanen Haut durchdringt (Herzinger et al., 1995). Nach der UVB-Bestrahlung wurde der PBS<sup>+/+</sup>-Film von den Zellen entfernt. Anschließend wurde 1 ml frisches DMEM<sup>+/+</sup> ohne FCS oder das zuvor abgenommene konditionierte Medium wieder auf die Zellen gegeben. Um bei einem Nachweis von Zytokinen und Wachstumsfaktoren nach der UVB-Bestrahlung eine Akkumulation dieser Proteine zu vermeiden, wurden die Zellen 4 h vor Ablauf der jeweiligen Inkubationszeiten mit PBS gewaschen und das konditionierte Medium durch 1 ml frisches, serumfreies DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt.

### 4.3.5.3 Repetitive UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen

Um den Einfluß einer repetitiven UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen zu untersuchen, wurde die Zellen mehrfach im Abstand von 24 h mit dem gesamten UVB-Spektrum (280 - 320 nm) und einer Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Dabei wurde entsprechend Kapitel 4.3.5.2 verfahren. Die Zellen wurden nach der jeweiligen Bestrahlung mit ihrem zuvor konditioniertem Medium versehen. Nach der letzten Bestrahlung wurde 4 h vor Beendigung der Inkubationszeit das konditionierte Medium durch 1 ml serumfreies DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt.

### 4.3.6 Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression durch ROS-generierende Systeme

Während der UVB-Bestrahlung von Zellen und der Haut kommt es zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Um die direkten Auswirkungen bestimmter ROS mit denen durch UVB-Bestrahlung induzierte auf die Induktion von VEGF mit den Auswirkungen von durch UVB-Strahlung induzierten ROS zu vergleichen, wurden HaCaT-Zellen nach subkonfluentem Wachstum in 3,5 cm (Ø) Schalen und einer 18stündigen Inkubation in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> mit verschiedenen ROS-generierenden Systemen behandelt.

#### 4.3.6.1 Intrazelluläre Generierung von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>)

Zur intrazellulären Anreicherung von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) wurde Paraquat (PQ<sup>2+</sup>) verwendet, ein pflanzliches Herbizid, welches intrazellulär eine zyklische Reduktion zu einem stabilen Monokationradikal (PQ<sup>•+</sup>) durchläuft, das durch Reoxidation mit molekularem Sauerstoff wieder zu PQ<sup>2+</sup> reagiert, wobei (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) entsteht.

Paraquat zeigte bei der Vitalitätsbestimmung bei einer Konzentration von 500 µM keine zytotoxische Wirkung auf die Zellen. Dementsprechend wurde Paraquat in einer Konzentration von 500 µM in 1,5 ml DMEM<sup>+/+</sup> gelöst auf die HaCaT-Zellen gegeben. Vier Stunden vor Beendigung der jeweiligen Inkubationszeit wurde das konditionierte Medium durch 1 ml frisches DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt. Am Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellkulturüberstände durch Zentrifugation für 10 min bei 10.600 x g und 4°C von Zellen und Zelltrümmern befreit. Die Überstände wurden abschließend bei -20°C gelagert oder direkt für einen ELISA verwendet (s. Kapitel 4.3.11).

#### 4.3.6.2 Extrazelluläre Generierung von Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet -}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ )

Zur extrazellulären Anreicherung von Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet -}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) wurde ein Xanthin/Xanthinoxidase (X/XO)-System verwendet. Das Enzym Xanthinoxidase hydroxyliert Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasser ( $H_2O$ ) im Nukleinsäure-Stoffwechsel. Sekundär entstehen dabei Superoxidanionen ( $O_2^{\bullet -}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Parks und Granger, 1986; Stipek et al., 1994).

Von Xanthinoxidase katalysierte Reaktionen:



Bei der Inkubation von HaCaT-Zellen mit dem X/XO-System wurde als Reaktionsmedium PBS<sup>+/+</sup> und nicht DMEM<sup>+/+</sup> verwendet, da in DMEM<sup>+/+</sup> die Produktion von Superoxidanionen vermindert ist. Nach Austestung der Zytotoxizität der X/XO-Behandlung wurden zu 2 ml PBS<sup>+/+</sup> 20 µl einer 10 mM Xanthinlösung (Endkonzentration: 0,1 mM) und 0,02 bis 0,16 U/ml Xanthinoxidase gegeben und mit dieser Lösung HaCaT-Zellen für 20 min im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Lösung von den Zellen genommen und durch 1,5 ml DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt. Vier Stunden vor Beendigung der jeweiligen Inkubationszeiten wurde das vorhandene Medium durch 1 ml frisches DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt, nach Beendigung der Inkubation für 10 min bei 10.600 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellkulturüberstände wurden bei -20°C gelagert oder direkt für einen ELISA verwendet.

#### 4.3.7 Neutralisation der UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Expression durch Antikörper gegen TGFα

Zur Untersuchung des Einflusses von TGFα bei der UVB-Induktion von VEGF wurden HaCaT-Zellen nach subkonfluentem Wachstum und einer 16stündigen Inkubation mit FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> für 2 h mit einem neutralisierenden Antikörper gegen TGFα (Maus-anti-

hTGF $\alpha$  IgG; Calbiochem, Bad Soden) inkubiert. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 100 bzw. 500 ng/ml in FCS-freiem Medium mit 0,2 % Lactalbuminhydrolysat auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die HaCaT-Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> Gesamt-UVB bestrahlt, wobei sich der Antikörper während der Bestrahlung in 500  $\mu$ l PBS gelöst auf den Zellen befand. Nach Entfernen des PBS wurde die bestrahlten Zellen für weitere 20 h mit dem neutralisierenden Maus-anti-hTGF $\alpha$ -Antikörper in frischem FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> mit 0,2 % Lactalbuminhydrolysat (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Nach Abnahme des konditionierten Mediums und Waschen mit PBS wurde für 4 h frisches DMEM<sup>+/+</sup> mit 0,2 % Lactalbuminhydrolysat ohne Antikörper auf die Zellen gegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Überstände zur Detektion von VEGF in einem ELISA eingesetzt (s. Kapitel 4.3.11).

#### 4.3.8 Transiente Transfektion von HaCaT-Zellen

Für die transiente Transfektion von HaCaT-Zellen mit Deletionskonstrukten des humanen VEGF-Promotors wurde LipofectAMINE<sup>TM</sup> verwendet. Dieses Transfektionsreagenz entspricht einem Liposomengemisch aus polykationischen Lipiden und neutralen Lipiden im Verhältnis 3:1. Das LipofectAMINE<sup>TM</sup> Reagenz bildet spontan mit Nukleinsäuren (DNA oder RNA) Lipid-Nukleinsäure-Komplexe, die von Zellen aufgenommen werden und die Expression der Nukleinsäuren ermöglichen. Der Ablauf der transienten Transfektion soll in Abb. 16 in einer schematischen Darstellung verdeutlicht werden.

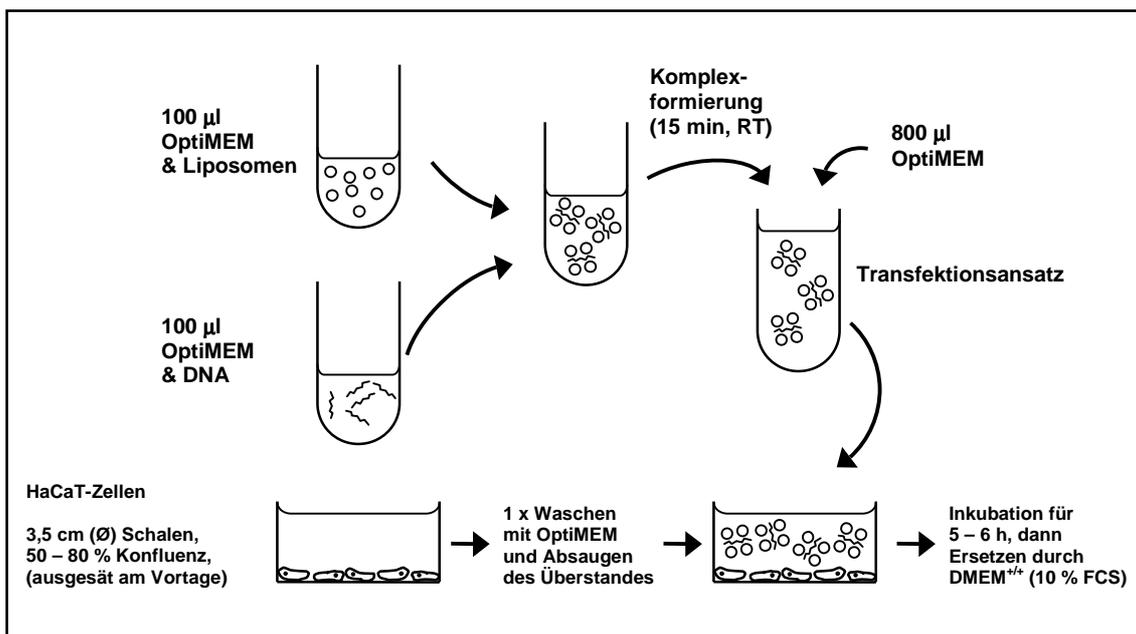


Abb. 16 Schematische Darstellung der transienten Transfektion von HaCaT-Zellen

HaCaT-Zellen wurden am Tag vor der transienten Transfektion in einer Dichte von etwa  $4 \times 10^5$  Zellen in 3,5 cm ( $\emptyset$ ) Schalen in 1,5 ml DMEM<sup>+/+</sup> mit 10 % FCS ausgesät. Vierundzwanzig h später erfolgte eine Inkubation mit dem Transfektionsansatz für 5 - 6 h. Für die Transfektion wurde ein 3,2 kbp großes Kpn I- Nar I-DNA-Fragment aus dem Promotor des humanen VEGF-Gens (Tischer et al., 1991) verwendet, welches zuvor in den promotorlosen Luciferase-Reportervektor pGL2-basic (Promega, Heidelberg) inkloniert wurde. Zusätzlich wurden für die Transfektion eine Reihe von Deletionskonstrukten des humanen VEGF-Promotors (Ikeda et al., 1995) eingesetzt, die ebenfalls in den pGL2-basic-Vektor subkloniert waren. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurde eine Kotransfektion mit einem  $\beta$ -Galaktosidase-Vektor (pCMV- $\beta$ Gal; Clontech, Heidelberg) durchgeführt. Bei jedem Transfektionsansatz wurden jeweils 1,5  $\mu$ g Luciferase-Reportervektor und 0,5  $\mu$ g pCMV- $\beta$ Gal-Plasmid in serumfreiem Medium (OptiMEM; Life Technologies, Eggenstein) nach Angaben des Herstellers kotransfiziert. Dabei wurden für jedes Luciferasekonstrukt zum gleichen Zeitpunkt mindestens drei voneinander unabhängige Transfektionen durchgeführt. Der Transfektionsansatz wurde nach einer Transfektionsdauer von 5 - 6 h von den Zellen genommen. Die transfizierten Zellen wurden anschließend zur Regeneration für 24 h mit DMEM<sup>+/+</sup> und 10 % FCS inkubiert. Um einen Einfluß von Serumfaktoren auf die Promotoraktivität der humanen VEGF-Promotorkonstrukte zu vermeiden, wurden die transfizierten Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen und für einen Zeitraum von 18 h mit FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> und 0,2 % Lactalbuminhydrolysat (Sigma, Deisenhofen) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die transfizierten Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> Gesamt-UVB bestrahlt und für einen Zeitraum von 12 h mit FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> mit 0,2 % Lactalbuminhydrolysat inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen derselben Prozedur unterzogen, jedoch nicht bestrahlt. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 150  $\mu$ l Reporterlysispuffer (Promega, Heidelberg) lysiert. Nach Entfernung von Zelltrümmern durch eine 10minütige Zentrifugation bei 20.800 x g und 4°C wurden 70  $\mu$ l zellulären Proteinextraktes zur Messung der Luciferase-Aktivität in einem Luciferase-Analysesystem (Promega, Heidelberg) eingesetzt. Zur Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden 5  $\mu$ l Proteinextrakt einer 1:10-Verdünnung mit Reporterlysispuffer in einem Chemilumineszenz-Analyseverfahren (Perkin-Elmer, Weiterstadt) verwendet. Die Messungen der Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität wurden in einem Typ 2010 Luminometer (ALL, San Diego, CA, USA) durchgeführt.

## 4.3.9 RNA-Präparation aus HaCaT-Zellen

### 4.3.9.1 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden mit PBS gewaschen, in 500 µl Trizol<sup>®</sup> (Life Technologies, Eggenstein) abgeschabt und nach Homogenisierung der Zellsuspension durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 5minütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 100 µl Chloroform (0,2 ml Chloroform/ 1 ml Trizol<sup>®</sup>). Die Zellsuspension wurde 15 sek stark geschüttelt und weitere 2 - 3 min bei RT inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation für 15 min bei 12.000 x g und 4°C ergibt sich eine Auftrennung der Proben in 3 verschiedene Phasen von denen die oberste, wäßrige Phase die RNA enthält. Die wäßrige Phase wurde vorsichtig ohne Proteine der Interphase in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte durch die Zugabe von 250 µl Isopropanol (0,5 ml Isopropanol/ 1 ml Trizol<sup>®</sup>) gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation bei RT. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g und 4°C wurde das RNA-Pellet einmal mit 75%igem Ethanol gewaschen (1 ml 75%iger Ethanol/ 1 ml Trizol<sup>®</sup>) und nochmals zentrifugiert (5 min, 7.500 x g, 4°C). Das RNA-Pellets wurde für 5 - 10 min an der Luft belassen, bis es fast vollständig getrocknet war. Das Pellet wurde abschließend in einem geeigneten Volumen an dH<sub>2</sub>O aufgenommen und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

### 4.3.9.2 RNase Protection Assay

Zur Analyse der mRNA-Expression verschiedener VEGF-Isoformen nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen wurde nach der Isolierung der Gesamt-RNA ein RNase Protection Assay durchgeführt (Werner et al., 1992). Diese Methode besitzt im Vergleich zum herkömmlichen Northern Blot-Analyseverfahren eine höhere Sensitivität und eine niedrigere Nachweisgrenze spezifischer mRNA-Mengen. Ein 159 bp langes DNA-Fragment (Nukleotide 339-498 der humanen VEGF<sub>121</sub> cDNA) wurde in den Transkriptionsvektor pBluescript KSII(+) (Stratagene, La Jolla, CA, USA) kloniert und am 5'-Ende linearisiert. Danach wurde eine *in vitro*-Transkription mittels einer T3-RNA-Polymerase und radioaktiv markiertem [<sup>32</sup>P]UTP (800 Ci/mmol, Amersham, Braunschweig) durchgeführt. Anschließend wurden 20 µg Gesamt-RNA mit 100.000 cpm radioaktiv markiertem Antisense-Transkriptes üN bei 42°C

hybridisiert. Die entstandenen Hybride wurden für 1 h bei 30°C mit RNase A und T1 inkubiert, wodurch alle einzelsträngigen RNA-Bereiche abgebaut wurden. Die durch die Hybridisierung geschützten RNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in einem 5%igen Acrylamidgel mit 8 M Harnstoff aufgetrennt. Nach erfolgter Autoradiographie wurde die Expression der einzelnen VEGF-Isoformen durch computerunterstützte Densitometrie analysiert (Scan PackII, Biometra, Göttingen).

### **4.3.10 Quantifizierung von Gesamtprotein**

#### **4.3.10.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Quantifizierung von Gesamtprotein wurde eine modifizierte Methode der Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) verwendet (Bio-Rad München). Für jede zu bestimmende Probe wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß 200 µl Bradford-Reagenz zu 800 µl dH<sub>2</sub>O gegeben und gemischt. Zu jedem Ansatz wurden 15 µl proteinhaltige Lösung pipettiert und auf einem Vortex gemischt. Nach einer 20minütigen Inkubation bei RT erfolgte eine photometrische Absorptionsbestimmung bei 595 nm. Für den Leerwert wurde anstelle der proteinhaltigen Lösung der entsprechende Puffer eingesetzt. Durch Vergleich mit der Absorption einer Verdünnungsreihe mit 1 - 10 µg Rinderserumalbumin konnte die Proteinkonzentration der Proben bestimmt werden.

#### **4.3.10.2 Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Konzentrationsbestimmung von Gesamtprotein nach Lowry (Lowry et al., 1951) kam zum Einsatz, wenn stark detergenzienhaltige Puffer zur Lyse von Zellen verwendet wurden. Dieses Quantifizierungssystem (Bio-Rad, München) beruht auf der Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und einem Folin-Reagenz und führt in einem Zwei-Stufen-Prozeß zu einer Farbentwicklung, deren Absorption sich photometrisch bestimmen läßt. In einem ersten Schritte reagieren Protein und Kupfer in einem alkalischen Medium, gefolgt von einer Reduktion des Folin-Reagenz durch den Protein-Kupfer-Komplex. Aus dieser zweiten Reaktion resultiert schließlich eine meßbare Farbentwicklung.

Die Proteinbestimmung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Absorption des entstehenden Farbkomplexes wurde bei  $\lambda = 750 \text{ nm}$  photometrisch bestimmt. Anhand einer Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (1 - 10  $\mu\text{g}$ ) wurde abschließend durch einen Absorptionsvergleich der Proben die jeweilige Proteinkonzentration ermittelt.

#### 4.3.11 Quantitativer Nachweis von VEGF<sub>165</sub>-, TGF $\alpha$ - und EGF-Proteinen

Die Konzentration spezifischer Proteine aus Zellkulturüberständen wurde mit Hilfe von „Sandwich“-ELISA-Systemen (R&D Systems, Wiesbaden; Calbiochem, Bad Soden) durchgeführt. Nach Abnahme der Zellkulturüberstände folgte zur Beseitigung von Zellen und Zelltrümmern eine Zentrifugation der Überstände für 10 min bei 10.600 x g und 4°C. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend zum spezifischen Proteinnachweis in einen ELISA eingesetzt. Die in der Zellkulturschale verbliebenen Zellen wurden zur Bestimmung des Gesamtproteingehalt zweimal mit PBS (4°C) gewaschen in 150  $\mu\text{l}$  Reporterlysispuffer (Promega, Heidelberg) lysiert. Der Proteingehalt der Zellysate wurde nach der modifizierten Bradford-Methode bestimmt (s. Kapitel 4.3.10.1).

Das Prinzip der ELISA-Methode soll anhand eines VEGF-ELISA (R&D Systems, Wiesbaden) kurz beschrieben werden. Dieser ELISA detektiert spezifisch die Isoform VEGF<sub>165</sub> und ermöglicht den quantitativen Nachweis von VEGF<sub>165</sub> in Blutserum oder Zellkulturüberständen in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte. Nach Beladen der Mikrotiterplatte mit definierten Volumina von Zellkulturüberständen wird vorhandenes VEGF<sub>165</sub>-Protein durch einen monoklonalen Antikörper gebunden, mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist. Nach mehreren Waschschritten zur Entfernung nicht-gebundener Bestandteile erfolgt die Zugabe eines polyklonalen Antikörpers, welcher ebenfalls für die VEGF<sub>165</sub>-Isoform spezifisch ist und welcher mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Durch wiederholtes Waschen werden nicht-gebundene polyklonale Antikörper entfernt. Der Detektion von VEGF<sub>165</sub> erfolgt nach Zugabe einer Substratlösung, die durch die Meerrettich-Peroxidase des polyklonalen Zweit-Antikörpers in charakteristischer Weise ihre Farbe ändert. Diese Farbentwicklung verläuft proportional zur der Menge gebundenen VEGF<sub>165</sub> und wurde photometrisch durch ein ELISA-Meßgerät (Diagnostics Pasteur, Freiburg) bestimmt. Nach der Bestimmung der VEGF<sub>165</sub>-Proteinmenge in den Zellkulturüberständen wurden ermittelten Konzentrationen auf 1  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein der Zellysate bezogen, was der Standardisierung und Vergleichbarkeit der einzelnen Proben untereinander dient.

### 4.3.12 Analyse der UVB-induzierten Phosphorylierung des EGF-Rezeptors

#### 4.3.12.1 Präparation von Zelllysaten

<u>Lösungen:</u>	Lysispuffer	20	mM	Imidazol, pH 10
		100	mM	KCl
		1	mM	MgCl <sub>2</sub>
		200	mM	EGTA
		0,5 %	(v/v)	Triton X-100
		150	nM	Aprotinin
		2	µM	Leupeptin
		1,5	µM	Pepstatin A
		1	mM	PMSF
		10	mM	NaF
		200	mM	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
		1	mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , auf pH 10 einstellen

Zu 80% konfluente in 6 cm (Ø) Schalen kultivierte HaCaT-Zellen wurden nach Bestrahlung mit unterschiedlichen UVB-Dosen zu verschiedenen Zeitpunkten lysiert. Dazu wurden die bestrahlten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und nach Abschaben mit 0,5 ml Lysispuffer in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße transferiert. Der Aufschluß der Zellen wurde durch die Beschallung der Proben mit einem Ultraschallgerät (Colora Meßtechnik, Lorch) unterstützt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 20.800 x g und 4°C wurde das Zelllysate in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

#### 4.3.12.2 Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors

<u>Lösungen:</u>	Probenpuffer (2 x)	100	mM	Tris/HCl, pH 6,8
		4 %	(w/v)	SDS
		0,1 %	(w/v)	Bromphenolblau
		5 %	(v/v)	2-Mercaptoethanol
		20 %	(v/v)	Glycerol
	TBS (10 x)	250	mM	Tris/HCl, pH 7,4
		1,4	M	NaCl
		30	mM	KCl
		10	mM	CaCl <sub>2</sub>
		5	mM	MgCl <sub>2</sub>
		9	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4

Es wurden 800 µl Zellysate einer Proteinkonzentration von 1,25 µg/µl mit Protein A-Agarose für 1 h bei 4°C auf einem Rotator zum Abfangen von unspezifischen Wechselwirkungen mit der Protein A-Agarose inkubiert. Zur Immunpräzipitation des EGF-Rezeptors wurde ein monoklonaler anti-hEGF-R Antikörper aus der Maus verwendet. Nach kurzer 1minütiger Zentrifugation des vorgereinigten Zellysates bei 20.800 x g und 4°C und Überführung in ein neues 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde das Lysat mit dem Antikörper für 2 h bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Protein A-Agarose pro Ansatz erfolgte die Immunpräzipitation üN rotierend bei 4°C. Abschließend wurde der Protein-Agarose-Komplex durch Zentrifugation sedimentiert, zweimal mit je 1 ml eiskaltem TBS gewaschen und in 60 µl Probenpuffer (2 x) für 10 min bei 90°C inkubiert. Nach einer Abkühlung auf Eis und einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 20.800 x g und 4°C erfolgte eine Auftrennung der Proben mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

#### 4.3.12.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Proteinen

<u>Lösungen:</u> Laufpuffer	50	mM	Tris/Base
	380	mM	Glycin
	2	mM	EDTA
	0,1 %	(w/v)	SDS
Probenpuffer (2 x)	250	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	10 %	(w/v)	SDS
	0,1 %	(w/v)	Bromphenolblau
	25 %	(v/v)	2-Mercaptoethanol
	50 %	(v/v)	Glycerol
Trenngel (6 %) (13 x 16 x 0,15 cm)	7	ml	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid
	8,75	ml	1,5 M Tris/HCl, pH 8,0
	0,35	ml	10 % SDS (w/v)
	0,35	ml	10 % APS (w/v)
	0,028	ml	TEMED
	18,5	ml	dH <sub>2</sub> O
Sammelgel (5 %) (5 x 16 x 0,15 cm)	2,6	ml	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid
	1,9	ml	1,0 M Tris/HCl, pH 6,8
	0,15	ml	10 % SDS (w/v)
	0,15	ml	10 % APS (w/v)
	0,015	ml	TEMED
	10,2	ml	dH <sub>2</sub> O

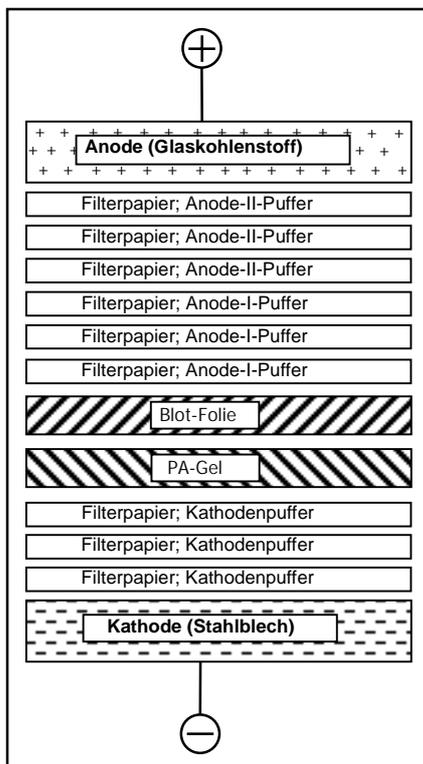
Zur Analyse der Phosphorylierung des EGF-Rezeptors erfolgte nach UVB-Bestrahlung und Immunpräzipitation des Gesamt-EGF-Rezeptors eine Auftrennung des Immunpräzipitates mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Aufgrund der Größe des EGF-Rezeptors von 170 kDa wurden Trenngele mit 6 % und Sammelgele mit 5 % Polyacrylamid verwendet. Die Trenngellösung wurde bis ca. 5 cm unter den oberen Glasplattenrand zwischen die abgedichteten Platten der Elektrophoreseapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 30 min Polymerisation wurde das Isopropanol ausgespült, der Platteninnenraum vorsichtig mit saugfähigem Papier getrocknet und bis zum Rand mit Sammelgellösung aufgefüllt. Danach wurde ein Kamm zwischen die Glasplatten hineingesteckt und nach einer Polymerisation von mindestens 30 min vorsichtig entfernt. Abschließend wurden die Kammern luftblasenfrei mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden, mit Probenpuffer auf eine Endkonzentration von 2 x Probenpuffer verdünnt und 10 min bei 95°C erhitzt. Nach einer Abkühlung der Proben auf Eis wurden diese für 5 min bei 20.800 x g und 4°C zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte üN bei 6 mA oder bei einer Stromstärke von 25 mA innerhalb von 3 - 4 h.

Zur Abschätzung und Kontrolle des Molekulargewichts der aufgetragenen Proteine wurde ein vorgefärbter Standard mit aufgetrennt (Rainbow-Marker, Novex, San Diego, CA, USA), der folgende Proteine enthielt:

<i>Protein</i>	<i>Molekulargewicht (kDa)</i>
Myosin	250
Phosphorylase B	148
Glutamin-Dehydrogenase	60
Carbon-Anhydrase	42
Myoglobin-Blau	30
Myoglobin-Rot	22
Lysozym	17
Aprotinin	6
Insulin	4

#### 4.3.12.4 Elektrotransfer von Proteinen

<u>Lösungen:</u>	Kathodenpuffer	25 mM	Tris-Base
		40 mM	6-Aminohexansäure
		20 % (v/v)	Methanol
	Anode-I-Puffer	30 mM	Tris-Base
		20 % (v/v)	Methanol
	Anode-II-Puffer	300 mM	Tris-Base
		20 % (v/v)	Methanol



**Abb. 17 Aufbau der Elektro-Blotapparatur**

Nach Auftrennung der Proteine über ein SDS-PAGE wurden diese über ein "Semi Dry"-Proteintransferverfahren mit einer Blotapparatur der Firma Phase (Lübeck) auf Protan-Nitrocellulose (Schleicher & Schüll, Dassel) transferiert. Je drei Filterpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel) wurden auf die exakte Größe des Gels zurechtgeschnitten und für 10 min in den verschiedenen Blotpuffern benetzt. Die Membran, ebenfalls in der Größe des Gels, inkubierte für 20 - 30 min bei RT in Anode-I-Puffer. Die Blotapparatur wurde, wie in Abb. 17 dargestellt, aufgebaut. Der Elektrotransfer erfolgte innerhalb von 60 - 80 min bei einer Stromstärke von  $2 \text{ mA/cm}^2_{(\text{Gelgröße})}$ . Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Transfer der Proteine anschließend in einer Immunodetektion des phosphorylierten EGF-Rezeptors eingesetzt.

#### 4.3.12.5 Immunodetektion des phosphorylierten EGF-Rezeptors

<u>Lösungen:</u>	Casein-Stammlösung	10 % (w/v)	in 0,2 N NaOH ansetzen
	PEG-6000-Stammlösung	10 % (w/v)	in dH <sub>2</sub> O lösen
	Polyvinylpyrrolidon-Stammlösung	10 % (w/v)	in dH <sub>2</sub> O ansetzen, unter Wärmezufuhr lösen

TBS (10 x)	250 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	1,4 M	NaCl
	30 mM	KCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4
Blockierungspuffer (1 %)	1 % (v/v)	Casein
	1 % (v/v)	Polyvinylpyrrolidon (PVP)
	0,05 % (v/v)	Tween-20, in TBS (1 x) lösen, filtrieren, pH 7,2
Antikörper-Puffer	0,5 % (v/v)	Casein
	0,5 % (v/v)	Polyvinylpyrrolidon (PVP)
	0,1 % (v/v)	PEG-6000
	0,05 % (v/v)	Tween-20, in TBS (1 x) lösen, pH 7,2

Nach dem Elektrotransfer der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran für 1 h in Blockierungspuffer unter leichtem Schwenken bei RT inkubiert. Nach dem Ansetzen wurde der Blockierungspuffer durch einen Sterilfilter (Porendurchmesser: 0,45 µm) gegeben, um feste, ungelöste Partikel zu beseitigen, welche später zu unspezifischer Hintergrundfärbung führen könnten. Der Primärantikörper (Maus anti-Phosphotyrosin IgG (PY99), Santa Cruz Biotech., Heidelberg) wurde in einer Konzentration von 0,2 µg/ml (1:1000) mit nicht filtriertem Antikörper-Puffer verdünnt und nach kurzem Vortexen für die Dauer der Blockierungsphase in diesem bei RT inkubiert. Nach Abgießen der Blockierungslösung erfolgte unter Schwenken bei RT eine 1stündige Inkubation mit dem Primärantikörper. Dieser Antikörper wurde mit dem Antikörper-Puffer verdünnt und direkt durch einen Sterilfilter mit 0,45 µm Porendurchmesser zur Nitrocellulosemembran gegeben. Während der Inkubation des Primärantikörpers wurde der mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Nachweisantikörper (Kaninchen anti-Maus-IgG-HRP, Santa Cruz Biotech., Heidelberg) mit dem Antikörper-Puffer in einer Konzentration von 0,2 µg/ml (1:2000) inkubiert. Nach zweimaligem Spülen der Membran mit TBS-T (TBS mit 0,05 % Tween-20) wurde die Membran dreimal je 5 min mit TBS-T gewaschen und der Nachweisantikörper zur Membran für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken gegeben. Abschließend wurde die Membran 6 - 8 x je 5 min in TBS-T gewaschen und in einer Nachweisreaktion eingesetzt. Als Substrat der Antikörper-gekoppelten Peroxidase wurde Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Roche, Mannheim) verwendet. Mit diesem Substrat ist eine Detektion von Proteinen in einer Konzentration von 1-5 pg

möglich. Außerdem besitzt dieses Reagenz eine Signalstabilität von über 9 h nach Zugabe der Substratlösung. Die Membran wurde für 5 min in der Substratlösung (1 ml pro 10 cm<sup>2</sup> Membran) bei RT inkubiert und danach mit der Proteinseite nach oben zwischen zwei dünnen Folien in eine Röntgenfilmkassette gelegt. Die Detektion der ECL-Signale erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-OMAT, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) bei verschiedenen langen Expositionszeiten.

## **4.4 Analyse der VEGF-Regulation in muriner und humaner Haut**

### **4.4.1 UVB-Bestrahlung haarloser Skh-1-Mäuse und humaner Haut**

#### **4.4.1.1 Bestrahlung von Skh-1-Mäusen mit Einzeldosen des gesamten UVB-Spektrums**

<u>Lösungen:</u>	Narkosemittel	1	ml	Ketanest
		250	µl	Rompun
		4	ml	NaCl-Lösung (0,9 %)

Für die Ermittlung einer für die haarlosen (Skh-1) Mäuse verträglichen Bestrahlungsdosis wurde eine Lichttreppe entwickelt, durch die es möglich war jeweils 6 mm große Areale mit verschiedenen UVB-Dosen (Dermolum UMW, Müller, Moosinning) zu bestrahlen. Der Abstand zur Bestrahlungsquelle betrug dabei 15 cm und die Bestrahlungsintensität 0,4 mW/cm<sup>2</sup>. Nach 24 Stunden konnte die minimale Erythemdosis (MED) abgelesen werden. Die minimale erythemale Dosis betrug 80 mJ/cm<sup>2</sup>. Aufgrund dieser Untersuchung wurden die Skh-1-Mäuse nur mit einer maximalen UVB-Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt, um eine Gewebsschädigung des bestrahlten Areals zu vermeiden. Unmittelbar nach Narkotisierung der Tiere durch intraperitonealer (i.p.) Injektion von 250 µl Narkosemittel erfolgte die Bestrahlung mit Gesamt-UVB unter Verwendung eines UVC-Filters (Müller, Moosinning). Die Kopfreion der Mäuse wurde während der Bestrahlung zur Vermeidung von Augenschäden abgedeckt. Die Narkose dauerte ca. 30-40 Minuten an und wurde von allen Tieren ohne sichtbare Schädigung gut vertragen.

#### 4.4.1.2 UVB-Bestrahlung von humaner Haut zur Analyse der VEGF-Expression

Zur Untersuchung der UVB-vermittelten VEGF-Expression *in vivo* wurden nach Durchführung einer Lichttreppe zur Ermittlung der minimalen erythemalen Dosis (MED) für gewöhnlich nicht sonnenexponierte Hautareale (Gesäß) dreier gesunder Individuen mit einer UVB-Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Nach 24 h wurden 6 mm (Ø) Biopsien sowohl aus bestrahlten als auch aus unbestrahlten Bereichen entnommen, in 4 % Paraformaldehyd fixiert und 24 h später in Paraffin eingebettet. Die Proben konnten nun nach Anfertigung von 6 µm dicken Paraffinschnitten für eine immunohistologische Untersuchung verwendet werden.

#### 4.4.1.3 Repetitive UVB-Bestrahlung von Maushaut zur Untersuchung der UVB-induzierten Angiogenese

Um die Auswirkungen einer repetitiven UVB-Bestrahlung auf eine VEGF-vermittelte Angiogenese *in vivo* zu untersuchen, wurden Skh-1-Mäuse (Charles River, Sulzfeld) alle 24 h an drei aufeinanderfolgenden Tagen, wie in Kapitel 4.4.1.1 beschrieben, mit einer Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> Gesamt-UVB bestrahlt und 7 Tage nach der ersten Bestrahlung zur Entnahme von 6 mm (Ø) Biopsien aus der bestrahlten Rückenhaut den Richtlinien entsprechend getötet. Um den Einfluß von VEGF bei der UVB-induzierten Neoangiogenese zu bestimmen, wurde den Mäusen 24 h und 30 min vor der ersten UVB-Bestrahlung und wiederum 30 min vor der dritten UVB-Bestrahlung 100 µg eines neutralisierenden, monoklonalen anti-hVEGF-Antikörpers (Texas Biotechnology, Houston, TX, USA) in PBS intraperitoneal verabreicht. Dieser Antikörper weist eine vergleichbare Neutralisierungseffizienz von murinem und humanem VEGF auf (Seghezzi et al., 1998). Zur Kontrolle wurde Skh-1-Mäusen zeitgleich eine Isotypenkontrolle in PBS als nicht-immunspezifischer (n.i.) Antikörper und PBS alleine intraperitoneal verabreicht. Insgesamt wurden 4 Gruppen von Mäusen mit je 4 Tieren pro Gruppe untersucht:

Gruppe	UVB-Bestrahlung	Injektion (i.p.)
A	unbestrahlt	PBS
B	unbestrahlt	n.i. IgG (100 µg)
C	50 mJ/cm <sup>2</sup>	n.i. IgG (100 µg)
D	50 mJ/cm <sup>2</sup>	anti-hVEGF (100 µg)



Propandiol	21	g	2-Amino-2-Methyl-1,3-propandiol, in 1 l dH <sub>2</sub> O lösen, lagern bei 4°C
Entwicklungspuffer	4,9	g	Tris-Base
	1,5	g	Tris/HCl
	8,7	g	NaCl, in 1 l dH <sub>2</sub> O lösen, lagern bei 4°C
Saponinlösung	100	mg	Saponin in 100 ml TRIS-Puffer (1 x) lösen
TRIS-Puffer (10 x)	60,5	g	Tris/HCl, pH 7,6
	99	g	NaCl, in 1 l dH <sub>2</sub> O lösen
TRIS-Puffer (1 x)	1	l	10 x TRIS-Puffer, mit 9 l dH <sub>2</sub> O verdünnen
BSA/TRIS (1%)	1	g	BSA in 100 ml TRIS-Puffer (1x) lösen, aliquottieren, bei -20°C lagern

Zu Beginn der immunohistochemischen Färbung von Paraffinschnitten wurden diese zweimal 10 min in Xylol deparaffinisiert. Nach Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe mit 100 % Isopropanol, 96 % Ethanol, 75 % Ethanol, 50 % Ethanol und TRIS-Puffer für je 5 min bei RT wurden die Schnitte zur Freilegung der Antigene 15 min in Saponinlösung bei RT inkubiert und danach zweimal kurz mit TRIS-Puffer gespült. Nach 10minütiger Inkubation in TRIS-Puffer wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit einem Gummistift (PAP/PEN) begrenzt und zur Reduktion des Färbehintergrundes 15 min bei RT in einer feuchten Kammer mit ca. 150 µl Blockierungslösung (background reducing component; DAKO, Hamburg) pro Schnitt inkubiert. Durch die Blockierungslösung wird eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers vermieden. Nach Entfernen der Blockierungslösung erfolgte die Inkubation der Schnitte mit den folgenden Antikörpern:

	Spezies	Antikörper	Verdünnung
Primärantikörper :	Kaninchen	anti-hVEGF <sub>121,165,189</sub>	1:200
	Kaninchen	anti-Faktor VIII RAG	1:200
Zweitantikörper :	Maus	anti-Kaninchen-IgG	1:50
Drittantikörper :	Kaninchen	anti-Maus-IgG	1:50
APAAP-Komplex :	Maus	APAAP-gekoppelter IgG	1:100

Die Antikörper wurden jeweils in 1 %iger BSA/TRIS-Lösung verdünnt. Die Inkubation der Schnitte mit den jeweiligen Antikörperverdünnungen erfolgte in einer feuchten Kammer für je 30 min bei RT. Nach der Inkubation mit einem Antikörper wurden die Schnitte jeweils dreimal für 5 min in TRIS-Puffer bei RT gewaschen. Während der letzten Waschphase wurden die Entwicklerlösung angesetzt:

Komplex	Zusammensetzung	Arbeitsschritt
<b>I</b>	33 mg Levamisol (Sigma, Deisenhofen) 59 ml Entwicklerpuffer (4°C) 21 ml Propandiol (4°C)	in einem 100 ml Becherglas ansetzen und rühren (Magnetrührer)
<b>II</b>	17 mg Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> ) 420 µl dH <sub>2</sub> O 170 µl Astralfuchsin (4°C)	in einem 10 ml Becherglas ansetzen, genau 1 min miteinander reagieren lassen, sofort durch quantitatives Überspülen zu Komplex I geben
<b>III</b>	42 mg Naphtho-As-Bi-Phosphat (-20°C) 500 µl Dimethylformamid (DMF) + 1 % Triton	in einem 10 ml Becherglas ansetzen, und zu den Lösungen I + II geben, einstellen des pH-Wertes mit 2 N HCl auf pH 8,8 – 8,9 (ca. 1100 µl); Lösung durch einen Faltenfilter in eine reduzierte Färbeküvette (o.ä.) gießen

Nach Ansetzen der Entwicklerlösung wurden die Objektträger mit den Schnitten aus dem Waschpuffer genommen und mit je 100 - 200 µl der Entwicklerlösung für 20 bis 30 min inkubiert. Dabei wurde der Entwickler durch Aufpipettieren direkt auf die Schnitte gegeben, so daß zu jeder Zeit die Intensität spezifischer Signale und die etwaige Entwicklung eines unspezifischen Färbungshintergrundes kontrolliert und die Färbung dann rechtzeitig beendet werden konnte. Zur Kontrolle wurde die Färbelösung abgeklopft, die Objektträger kurz in TRIS-Puffer gespült und die Färbungsintensität unter einem Lichtmikroskop begutachtet. Falls erforderlich, wurde erneut bis zu einer maximalen Färbezeit von 30 min Entwicklerlösung auf die Schnitte gegeben. Nach Ablauf dieser Zeit kommt es zu einer Trübung der Färbelösung, welche dann nicht weiter verwendet werden kann. Nach abgeschlossener Färbung der Schnitte wurden diese kurz in TRIS-Puffer gespült und zur Anfärbung der Zellkerne für maximal 15 sek in Hämalaun (1 g/1 l) inkubiert, wobei die Dauer der Gegenfärbung von der gewünschten Farbintensität abhängt. Es folgte ein wiederholtes Spülen in TRIS-Puffer und ein Differenzieren der Schnitte mit Salzsäure-Alkohol (0,7 % HCl in absolutem Ethanol) für die Dauer der Gegenfärbung, wodurch überschüssiges Hämalaun

---

aus dem Zytoplasma der Zellen entfernt wurde. Abschließend wurden die Objektträger für 20 bis 30 sek in Leitungswasser gegeben (Bläuungsschritt), wobei die Farbe des Hämalauns durch den pH-Wert des Leitungswassers von Rot-Violett zu Blau wechselt. Die Schnitte wurden in Paramount (DAKO, Hamburg) oder alternativ mit Glycerin-Gelatine eingebettet unter Lichtabschluß üN bei RT getrocknet und danach für eine lichtmikroskopische Auswertung verwendet.

## 5. Ergebnisse

Die zunehmende Häufigkeit von nicht-melanozytären Hautkrebsarten, wie dem Basalzellkarzinom (Basaliom) und dem Plattenepithelkarzinom (spinozelluläres Karzinom), und dem kutanen malignen Melanom ist ein immer mehr in den Vordergrund drängendes globales Gesundheitsproblem (Madronich und de Gruijl, 1994; Mukhtar und Elmetts, 1996). Ursache dieser Zunahme ist eine gesteigerte Sonnenexposition der Haut, die im wesentlichen auf das gesellschaftliche Schönheitsideal einer ganzjährig gebräunten Haut zurückzuführen ist. Das solare Spektrum umfaßt neben Röntgenstrahlung, sichtbarem Licht und Wärmestrahlung auch Wellenlängen des gesamten ultravioletten (UV)-Spektrums mit UVC- (200-280 nm), UVB- (280-320 nm) und UVA-Strahlung (320-400 nm). Dabei kommt der UVB-Strahlung bei der Schädigung der Haut die größte Bedeutung zu (de Gruijl, 1996; de Gruijl und Van der Leun, 1994; Ziegler et al., 1994; Forbes, 1981), da sie im Gegensatz zur energiereicheren UVC-Strahlung, die vollständig durch die Ozonschicht gefiltert wird, die Erdoberfläche erreicht. Durch die Strahlenfilterung der Ozonschicht liegt der Anteil der UVB-Strahlung an der Gesamtstrahlungsstärke auf der Erde um 0,5 % mit einer Grenzwellenlänge bei 295 nm (Zölzer und Kiefer, 1989). Durch eine fortschreitende Depletion der stratosphärischen Ozonschicht ist die Erdoberfläche einer zunehmenden Intensität der UVB-Strahlung ausgesetzt (Lloyd et al., 1993; Slaper et al., 1996). Eine verstärkte UVB-Strahlung hat schädigende Auswirkungen auf die Physiologie der Haut mit konsekutiven pathologischen Vorgängen wie Photoalterung und Photokarzinogenese (Rowe et al., 1992; Scharffetter-Kochanek et al., 1997). Neben permanenten genetischen Veränderungen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Brash et al., 1991; Ziegler et al., 1994) führt UVB-Strahlung auch zur verstärkten Expression parakrin oder autokrin wirksamer Zytokine mit Störungen von Signaltransduktionswegen, die das Zellwachstum, den Bindegewebsabbau (Scharffetter-Kochanek et al., 1997) und die Neubildung von Blutgefäßen wesentlich verändern (Soffen und Blum, 1961).

Die Aktivierung neoangiogenetischer Prozesse durch parakrin wirksame Wachstumsfaktoren von Tumoren oder durch UVB-Strahlung, stellt vermutlich einen entscheidenden Schritt in der Tumorprogression dar. Eine Vaskularisation von Tumoren fördert nicht nur das Größenwachstum von Tumoren, sondern ermöglicht auch die Invasion von Tumorzellen in das körpereigene Blutgefäßsystem und die Ausbildung von Metastasen im gesamten Organismus (Liotta et al., 1974; Christofori und Hanahan, 1994; Hanahan und Folkman, 1996; Larcher et al., 1996; Skobe et al., 1997). Eine durch chronische Sonnenexposition

geschädigte Haut ist im Rahmen einer lichtbedingten vorzeitigen Photoalterung häufig durch eine starke Faltenbildung und der Ausbildung von Teleangiectasien, einem vermehrten Auftreten stark erweiterter oberflächennaher Blutgefäßen in der Haut gekennzeichnet (Soffen und Blum, 1961).

In der physiologischen und pathophysiologischen Angiogenese ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) neben einigen anderen angiogenetisch wirksamen Wachstumsfaktoren wie Angiogenin, bFGF oder TNF $\alpha$  von essentieller Bedeutung (Detmar, 1996; Brown et al., 1997). Aus diesem Grund konzentrierten sich die Untersuchungen zur UVB-induzierten Angiogenese *in vitro* und *in vivo* auf die UVB-abhängige Regulation von VEGF als zentralen Wachstumsfaktor neoangiogenetischer Prozesse.

### 5.1 VEGF wird in Plattenepithelkarzinomen aus sonnenexponierten anatomischen Arealen und in normaler Epidermis nach UVB-Bestrahlung exprimiert

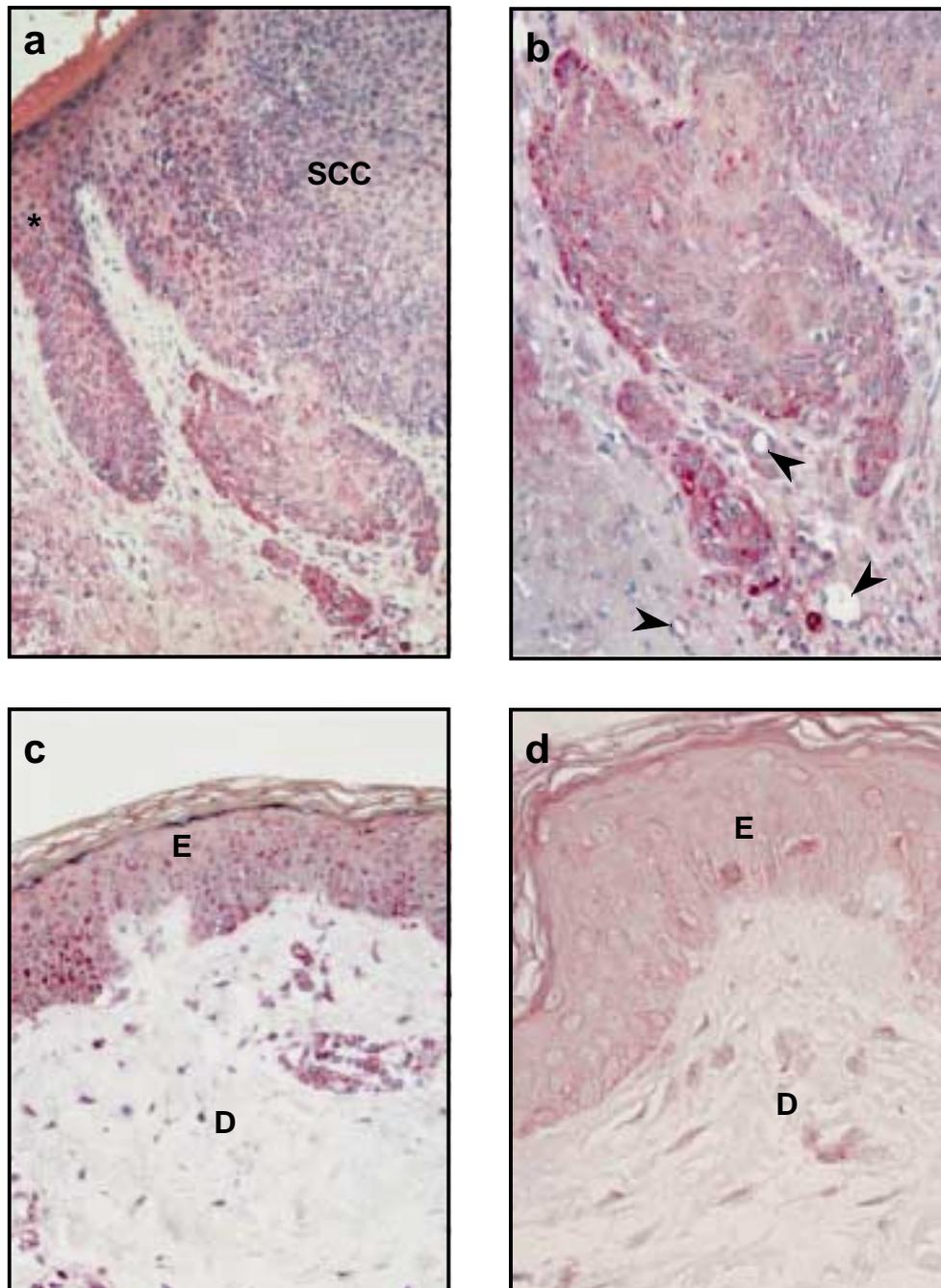
Die VEGF-Expression wurde in Biopsien von Plattenepithelkarzinomen und benachbarter Bereiche chronisch lichtgeschädigter Epidermis aus sonnenexponierten Hautregionen immunohistologisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. In diese Untersuchungen wurden sieben Individuen unterschiedlichen Alters eingeschlossen. Diese Patienten wiesen eine wiederholte Sonnenexpositionen vor Entnahme der Biopsien auf.

Spender	Geschlecht	Alter	UV-exponierter Hautabschnitt	VEGF-Expression in Tumorzellen
1	m	87	Gesicht	+++
2	m	82	Schulter	+++
3	w	60	Gesicht	+++
4	w	76	Gesicht	+++
5	m	90	Gesicht	++
6	m	90	Gesicht	++
7	m	60	Gesicht	+++

**Tabelle 1 VEGF-Expression in Plattenepithelkarzinomen aus sonnenexponierter Haut**

Diese Tabelle gibt eine Übersicht über die VEGF-Expression in Plattenepithelkarzinomen aus sonnenexponierten Hautregionen sieben verschiedener Spender unterschiedlichen Geschlechts und Alters. Bei einem Großteil der Plattenepithelkarzinome (5 von 7 Spendern) konnte verglichen mit Biopsien aus normaler Haut aus sonnenexponierten Bereichen eine stark erhöhte VEGF-Expression (+++) beobachtet werden, wobei die Biopsien zweier Spender eine moderat gesteigerte VEGF-Expression aufwiesen (++).

Exemplarisch ist in Abb. 18a+b die VEGF-Expression eines Plattenepithelkarzinoms aus dem Gesichtsbereich eines Spenders nach einer immunhistologischen Detektion dargestellt.



**Abb. 18 VEGF-Expression eines spinozellulären Karzinoms aus sonnenexponierter Haut und von normaler Haut nach UVB-Bestrahlung**

(a) In einem Plattenepithelkarzinom aus einem sonnenexponierten anatomischen Areal (Gesicht) wurde eine starke VEGF-Expression immunhistologisch nachgewiesen. (b) Dargestellt ist eine Ausschnittsvergrößerung von Abb. 18a. (c) Einmalige UVB-Bestrahlung mit einer Dosis von  $50 \text{ mJ/cm}^2$  resultierte in einer starken Induktion von VEGF in normaler Epidermis 24 h nach der Bestrahlung. (d) Unbestrahlte Haut zeigte eine nur geringe VEGF-Expression hauptsächlich in basalen und suprabasalen Bereichen der Epidermis auf. E, Epidermis; D, Dermis; SCC, invasives Plattenepithelkarzinom (*engl. squamous cell carcinoma*); \*, hyperplastische normale Epidermis in direkter Nähe zum invasiven Plattenepithelkarzinom; ▲, Blutgefäße.

Bei über 70 % (5 von 7 Spendern) konnte im Vergleich zu Biopsien von Normalhaut aus sonnenexponierten Arealen der Haut (Abb. 18d) eine stark erhöhte VEGF-Expression in den Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen werden. In Abb. 18a+b ist die VEGF-Expression eines Plattenepithelkarzinoms aus einem sonnenexponierten Gesichtsareal eines Spenders mit deutlich verstärkter VEGF-Expression im Bereich des Tumors dargestellt, während sich die VEGF-Expression in Normalhaut auf eine schwache basale und suprabasale Expression in der Epidermis beschränkt (Abb. 18d).

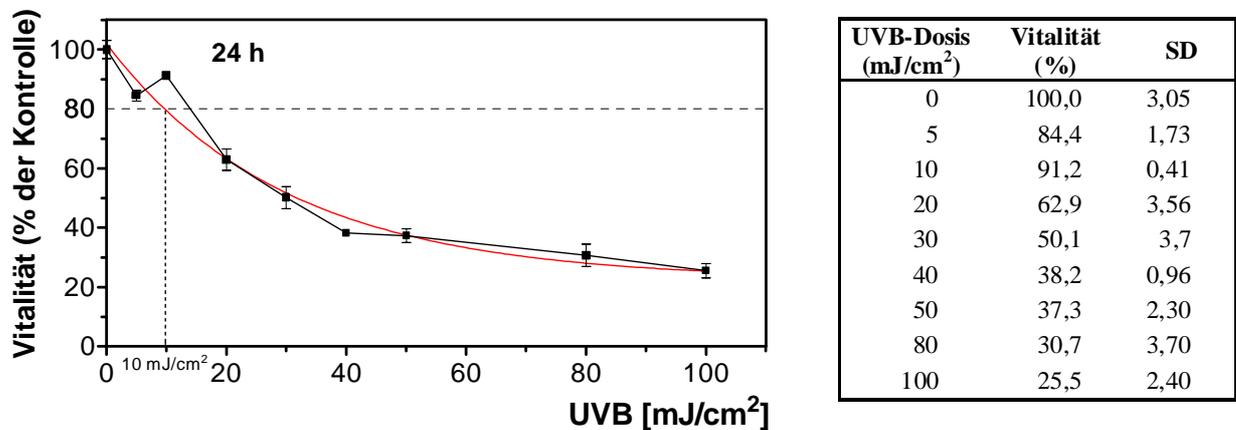
Für eine *in vivo*-Untersuchung der UVB-induzierten VEGF-Expression in Normalhaut wurden drei freiwillige Individuen an nicht-sonnenexponierten Arealen (Gesäß) mit einer UVB-Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die Expression von VEGF wurde 24 h nach der Bestrahlung immunhistologisch an Biopsien aus dem bestrahlten Areal und aus einem benachbarten, unbestrahlten Hautareal nachgewiesen. Eine starke VEGF-Expression wurde nach der UVB-Bestrahlung in der gesamten Epidermis gefunden (Abb. 18c). In geringerem Ausmaß waren inflammatorische Zellen und Fibroblasten ebenfalls VEGF-positiv. Die Spezifität der VEGF-Färbungen wurde mit Kontrollen ohne Primärantikörper und durch die Verwendung einer nicht-immunspezifischen Isotypenkontrolle verifiziert.

## **5.2 UVB bewirkt eine zeitabhängige Induktion der mRNA-Expression verschiedener VEGF-Isoformen in HaCaT-Zellen**

Aus ethischen Gründen ist eine genaue Analyse der Regulation der UVB-induzierten VEGF-Expression am Menschen nicht möglich. Daher wurden verschiedene *in vitro*-Modelle zur weiteren Charakterisierung molekularer Mechanismen der UVB-induzierten VEGF-Expression verwendet. Für eine detaillierte Untersuchung der UVB-bedingten VEGF-Expression *in vitro* wurden neben sekundären Keratinozyten HaCaT-Zellen (Boukamp et al., 1988, 1997; Fusenig und Boukamp, 1998) verwendet. Diese Zellen entsprechen spontan immortalisierten Keratinozyten und werden als Modellsystem für initiierte Tumorzellen angesehen (Brash et al., 1991; Ziegler et al., 1994).

Zur Analyse der UVB-induzierten VEGF-Expression auf mRNA-Ebene wurde ein RNase Protection Assay verwendet, mit dessen Hilfe eine Unterscheidung verschiedener VEGF-Isoformen möglich ist (Brauchle et al., 1996).

Zur Vermeidung nicht-physiologischer Reaktionen UVB-bestrahlter Zellen wurde vor Versuchsbeginn die dosisabhängige Zytotoxizität der UVB-Behandlung mittels einer Vitalitätstestung (MTT-Test, vgl. Kapitel 4.4.3) festgestellt (Abb. 19).

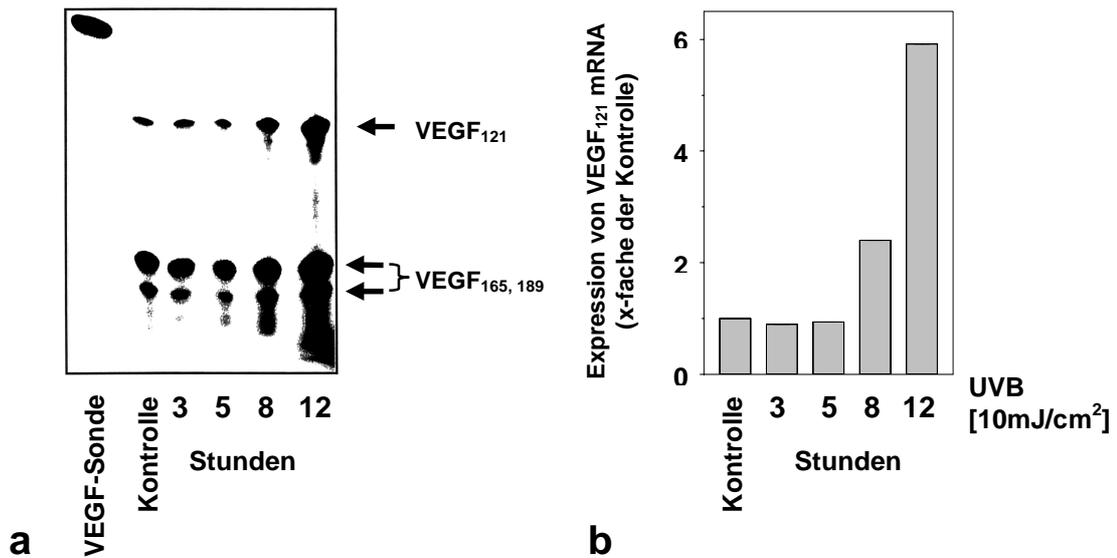


**Abb. 19 Vitalität von HaCaT-Zellen nach einer Bestrahlung mit Gesamt-UVB (280 – 320 nm)**

Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden nach einer 18stündigen Inkubation in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> mit steigender UVB-Dosis bestrahlt. Vierundzwanzig h nach der Bestrahlung wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der bestrahlten Zellen ist im Verhältnis zu unbestrahlten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3).

Ab einer UVB-Dosis von 30 mJ/cm<sup>2</sup> wiesen die bestrahlten Zellen 24 h nach der UVB-Exposition im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen eine deutlich verminderte Vitalität auf (50,1 %). Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden unter Bedingungen durchgeführt, bei denen die Zellen 24 h nach der Behandlung eine Vitalität von mindestens 80 % aufwiesen.

Für die Analyse der VEGF-Expression auf mRNA-Ebene wurde eine UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> gewählt. Bei dieser Dosis wiesen bestrahlte HaCaT-Zellen 24 h nach der UVB-Exposition eine Vitalität von mehr als 80 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf. Die HaCaT-Zellen wurden nach subkonfluentem Wachstum und einer 18stündigen Inkubation in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> zu verschiedene Zeitpunkten nach der UVB-Bestrahlung aufgearbeitet (s. Kapitel 4.3.9).



**Abb. 20 UVB-Bestrahlung induziert zeitabhängig die Expression von VEGF-mRNA in HaCaT-Zellen**

(a) Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden in DMEM<sup>+/+</sup> ohne FCS für 18 h inkubiert und anschließend mit einer UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die spezifische mRNA-Menge verschiedener VEGF-Isoformen wurde in einem RNase Protection Assay analysiert. Als Größenmarker wurde die VEGF-Hybridisierungssonde mit 1000 counts/min aufgetragen. Verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle ist 8 h nach UVB-Bestrahlung eine signifikante Induktion aller dargestellten VEGF-Isoformen zu beobachten. (b) Für die Isoform VEGF<sub>121</sub> wurde die mRNA-Expression nach UVB-Bestrahlung anhand einer densitometrischen Analyse ermittelt und als vielfache Induktion der unbestrahlten Kontrolle dargestellt. Dabei wurde die unbestrahlte Kontrolle gleich 1 gesetzt.

Bisher wurden in humanen Zellen fünf verschiedene VEGF-Isoformen beschrieben, welche durch alternatives Spleißen eines einzelnen Transkriptes entstehen (Tischer et al., 1991; Houck et al., 1991). Die für den Hybridisierungsschritt des RNase Protection Assays verwendete Sonde entsprach dem 3'-Bereich der kürzesten VEGF-Isoform VEGF<sub>121</sub> und ermöglicht eine Untersuchung der VEGF-Spleißvarianten VEGF<sub>121,165</sub> und VEGF<sub>189</sub>.

Die oberste Bande in Abb. 20a repräsentiert die Expression von VEGF<sub>121</sub>, während die beiden darunterliegenden Fragmente gemeinsam die Expression der VEGF-Isoformen VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub> darstellen. Eine signifikante Induktion aller dargestellten VEGF-Isoformen war 8 h nach der UVB-Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> nachweisbar. Die UVB-Induktion der VEGF-Expression entsprach nach 8 h dem 2,5-fachen und nach 12 h dem 6-fachen der detektierten mRNA-Menge der Kontrollzellen.

Dies ist für die Isoform VEGF<sub>121</sub> nach einer densitometrischen Auswertung exemplarisch in Tabelle 2 dargestellt.

<b>Ansatz</b>	<b>VEGF<sub>121</sub> (x-fache der Kontrolle)</b>
Kontrolle	1,00
UVB (10 mJ/cm <sup>2</sup> ); 3 h	0,90
UVB (10 mJ/cm <sup>2</sup> ); 5 h	0,94
UVB (10 mJ/cm <sup>2</sup> ); 8 h	2,40
UVB (10 mJ/cm <sup>2</sup> ); 12 h	5,92

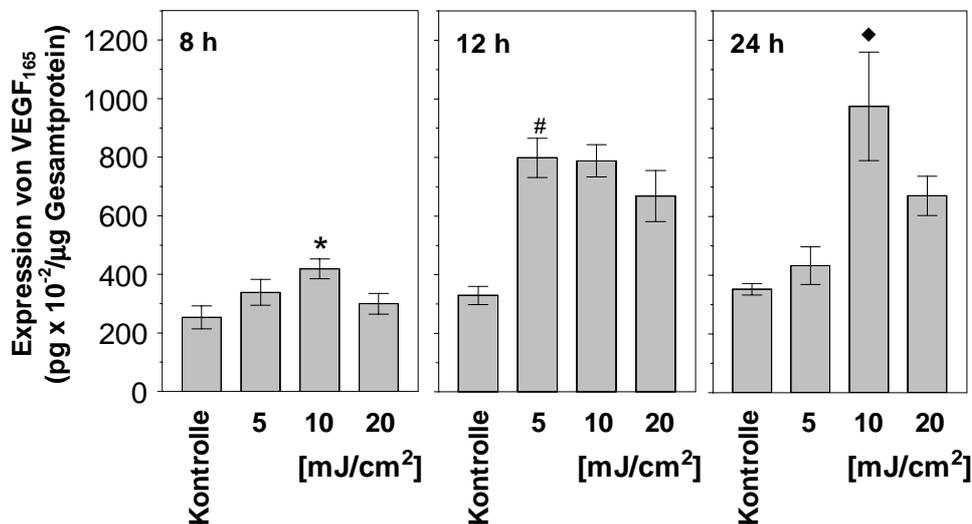
**Tabelle 2: Densitometrische Auswertung der mRNA-Expression von VEGF<sub>121</sub> nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen**

Diese Tabelle zeigt die zeitabhängige Expression der Isoform VEGF<sub>121</sub> nach einer UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen und beruht auf einer computergestützten densitometrischen Analyse von Abb. 20a (Scan PackII, Biometra, Göttingen).

Die mRNA-Expression von VEGF nach UVB-Bestrahlung wurde in Einzelansätzen untersucht, und die resultierenden Daten bestätigen für die UVB-induzierte VEGF-Expression in HaCaT-Zellen die Ergebnisse frühere Arbeiten (Brauchle et al., 1996).

### 5.3 Die Expression von VEGF<sub>165</sub> ist auf Proteinebene nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen im Vergleich zu sekundären Keratinozyten verstärkt

Der VEGF<sub>165</sub>-Proteingehalt in Zellkulturüberständen von HaCaT-Zellen wurde nach einer UVB-Bestrahlung der Zellen mit Dosen zwischen 5 und 20 mJ/cm<sup>2</sup> zu verschiedenen Zeitpunkten nach der UVB-Exposition in einem VEGF-ELISA bestimmt. Nach subkonfluentem Wachstum der HaCaT-Zellen und einer 18stündigen Inkubation mit FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> resultierte eine UVB-Bestrahlung der Zellen in einer dosis- und zeitabhängigen VEGF<sub>165</sub>-Expression (Abb. 21).

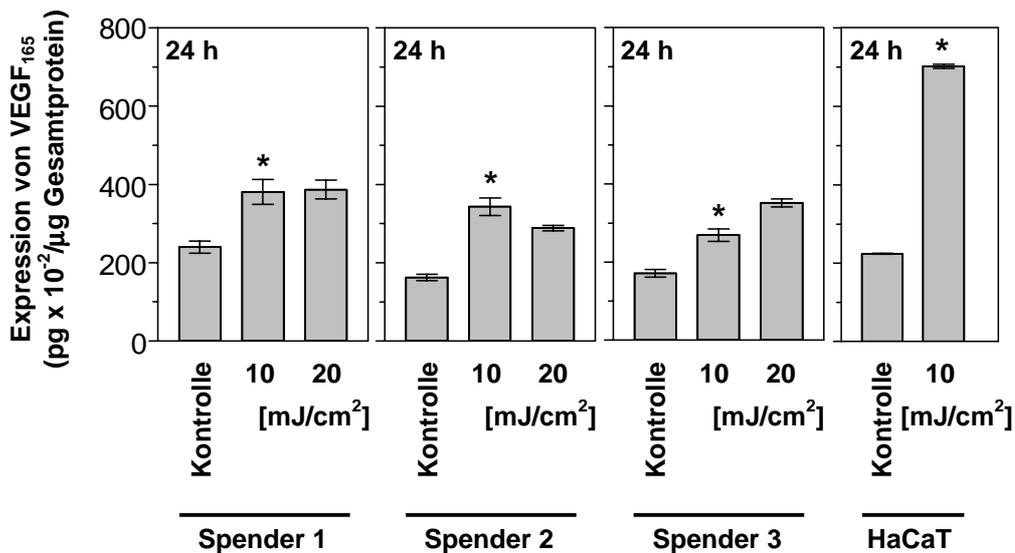


**Abb. 21 Dosis- und zeitabhängige UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> in HaCaT-Zellen**

Zellkulturüberstände von HaCaT-Zellen wiesen nach einer UVB-Bestrahlung der Zellen eine dosis- und zeitabhängige Erhöhung der VEGF<sub>165</sub>-Konzentration auf. Bereits 8 h nach der Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB zeigte sich ein signifikanter Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Expression verglichen mit der VEGF<sub>165</sub>-Expression unbestrahlter Kontrollen. Eine maximale VEGF<sub>165</sub>-Expression wurde 24 h nach einer Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> beobachtet. Das konditionierte Medium unbestrahlter Zellen diente zum jeweiligen Zeitpunkt als Kontrolle. Die Daten sind dargestellt in pg VEGF<sub>165</sub> x 10<sup>-2</sup>/µg Gesamtprotein (Mittelwert ± SD, n = 3); \*P = 0,052, #P = 0,004, ♦P = 0,0044 verglichen mit unbestrahlten Kontrollen (Student's *t*-Test).

In dieser Versuchsreihe wurde auf Proteinebene eine maximal 3-fache Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression 24 h nach UVB-Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> beobachtet. Eine signifikante 1,7-fache Induktion von VEGF<sub>165</sub> wurde bereits 8 h nach UVB-Exposition beobachtet. In weiteren Experimenten zeigte sich 24 h nach UVB-Bestrahlung unter gleichen Versuchsbedingungen eine bis zu 5-fache Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression.

Im Vergleich zur UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Expression normaler epidermaler Zellen mit der von HaCaT-Zellen wurden subkonfluente sekundäre Keratinozytenkulturen verschiedener Spender (Tabelle 3) mit einer UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Vierundzwanzig Stunden nach der Bestrahlung wurde die VEGF<sub>165</sub>-Konzentration der Zellkulturüberstände bestimmt und mit der Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression von HaCaT-Zellen verglichen (Abb. 22).



**Abb. 22 Sekundäre Keratinozyten weisen im Vergleich zu HaCaT-Zellen nach UVB eine verminderte VEGF<sub>165</sub>-Expression auf**

Sekundäre Keratinozyten wurden aus Hauttransplantaten verschiedener Spender (s. Tabelle 3) isoliert und danach als sekundäre Keratinozyten bis zur Passage 3 bzw. 4 kultiviert. Die UVB-Bestrahlung mit einer Dosis von 10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup> erfolgte in 3,5 cm (Ø) Schalen unter einem Film von PBS<sup>+/+</sup>. Vierundzwanzig h nach der Bestrahlung wiesen die Keratinozyten der verschiedenen Spender im Vergleich zu HaCaT-Zellen bei vergleichbarer basaler VEGF<sub>165</sub>-Expression eine deutlich niedrigere VEGF<sub>165</sub>-Expression nach UVB auf. Die Daten sind in pg VEGF<sub>165</sub> x 10<sup>-2</sup>/µg Gesamtprotein (Mittelwert ± SD, n = 3) dargestellt; \*P = 0,0001 verglichen mit UVB-bestrahlten sekundären Keratinozyten drei verschiedener Spender (ANOVA).

	Geschlecht	Alter	Ort der Entnahme
Spender 1	m	61	Schläfe
Spender 2	w	42	Bauch
Spender 3	w	72	Kopf (Capillitium)

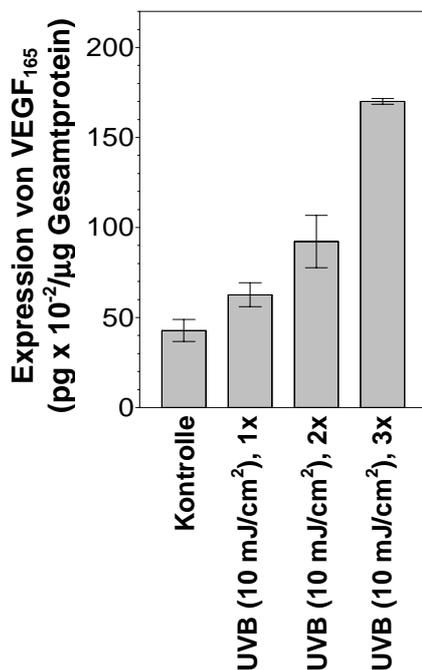
**Tabelle 3 Spender für die Isolierung primärer Keratinozyten**

Vierundzwanzig Stunden nach einer UVB-Bestrahlung mit 10 bzw. 20 mJ/cm<sup>2</sup> war die VEGF<sub>165</sub>-Expression der sekundären Keratinozyten bis auf das 2-fache der VEGF<sub>165</sub>-

Expression der unbestrahlten Kontrollen gestiegen. Die Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression nach UVB-Bestrahlung von sekundären Keratinozyten liegt deutlich unter der VEGF<sub>165</sub>-Induktion der HaCaT-Zellen (\*P = 0,0001, ANOVA). Dieser Unterschied wurde in Keratinozyten von drei verschiedenen Spendern bestätigt.

#### 5.4 Repetitive UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen führt zu einem kumulativen Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Expression

Um die *in vivo*-Situation und die mögliche neoangiogenetische Wirkung einer wiederholten UVB-Bestrahlung nachzustellen, wurde *in vitro* der Einfluß wiederholter UVB-Bestrahlungen auf die VEGF<sub>165</sub>-Expression von HaCaT-Zellen untersucht. Nach einer Inkubation in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> für 18 h wurden HaCaT-Zellen 1 - 3 x mit einer UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt (Abb. 23).



**Abb. 23 Repetitive UVB-Bestrahlungen von HaCaT-Zellen führen zu einem kumulativen Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Expression**

Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden nach einer 18stündigen Inkubation mit FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> in einem zeitlichen Abstand von 24 h mehrfach mit einer UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Der Versuchsablauf wurde so gewählt, daß alle Ansätze inklusive der Kontrollen 24 h nach der letzten Bestrahlung zum selben Zeitpunkt aufgearbeitet wurden. Nach jeder Bestrahlung wurde das konditionierte Medium, welches vor der UVB-Bestrahlung von den Zellen genommen worden ist, wieder zurück auf die HaCaT-Zellen gegeben. Die VEGF<sub>165</sub>-Expression ist in pg VEGF<sub>165</sub> x 10<sup>-2</sup>/µg Gesamtprotein (Mittelwert ± SD, n = 3) dargestellt.

Nach jeder Bestrahlung wurde das konditionierte Medium, welches vor der UVB-Bestrahlung von den Zellen genommen worden ist, zurück auf die HaCaT-Zellen gegeben. Alle Ansätze inklusive der Kontrollen wurden 24 h nach der letzten Bestrahlung zum identischen Zeitpunkt aufgearbeitet. Zur Ermittlung der VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate wurde das konditionierte Medium 4 h vor Beendigung der Inkubationszeit durch serumfreies DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt. Die VEGF<sub>165</sub>-

Konzentration mittels eines quantitativen ELISA-System bestimmt und auf 1  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein der Zellen bezogen.

Ansatz	VEGF <sub>165</sub> (pg x 10 <sup>-2</sup> /μg Protein) (Mw / SD)		VEGF <sub>165</sub> (x-fache der Kontrolle) (Mw / SD)	
	Kontrolle	42,8	6,1	1,0
UVB (10 mJ/cm <sup>2</sup> ); (1 x)	62,7	6,6	1,5	0,15
UVB (10 mJ/cm <sup>2</sup> ); (2 x)	92,2	14,5	2,15	0,34
UVB (10 mJ/cm <sup>2</sup> ); (3 x)	170,0	1,6	4,0	0,04

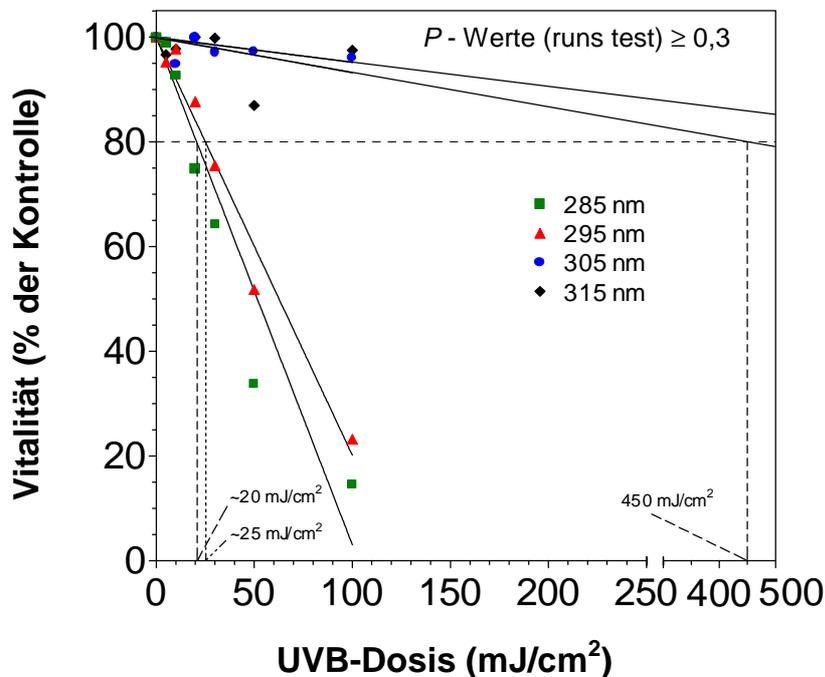
**Tabelle 4 Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression durch repetitive UVB-Bestrahlung**

Repetitive Bestrahlungen von HaCaT-Zellen führten zu einem kumulativen Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate (Tabelle 4). Die dreimalige UVB-Bestrahlung mit einer jeweiligen Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> steigerte die VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate auf das 4-fache unbestrahlter Kontrollen, während die einmalige UVB-Bestrahlung nur zu einer 1,5-fache Steigerung der VEGF<sub>165</sub>-Expression gegenüber der unbestrahlten Kontrolle führte. Dieses Experiment zeigt, daß die VEGF<sub>165</sub>-Expression von HaCaT-Zellen durch mehrmalige UVB-Bestrahlungen noch weiter gesteigert wird. Ob dieser Anstieg durch direkte intrazelluläre Veränderungen beispielsweise durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies innerhalb der Zellen oder durch eine UVB-verursachte Sekretion autokrin wirksamer Zytokine oder Wachstumsfaktoren hervorgerufen wird, sollte in weiteren Versuchsansätzen geklärt werden. Zunächst sollten jedoch einzelne Wellenlängenbereiche des UVB-Spektrums auf ihre VEGF-induzierende Wirkung untersucht werden.

### **5.5 Die UVB-Wellenlängen von 285 bis 295 nm sind bei der VEGF<sub>165</sub>-Induktion wirksamer als der Bereich ab 305 nm**

Um innerhalb des UVB-Spektrums (280 bis 320 nm) die Wellenlängen mit stärkster VEGF-induzierender Wirkung zu identifizieren, wurden bei der UVB-bedingten VEGF<sub>165</sub>-Induktion HaCaT-Zellen mit verschiedenen Dosen (1 bis 500 mJ/cm<sup>2</sup>) der Wellenlängen 285, 295, 305 und 315 nm bestrahlt. Als UVB-Quelle wurde eine Xenon-Hochdruck-UV-Lampe in Kombination mit einem Monochromator mit holographischem Gitter verwendet. Nach Ermittlung der Zytotoxizität (MTT-Test) einer wellenlängenabhängigen UVB-Bestrahlung

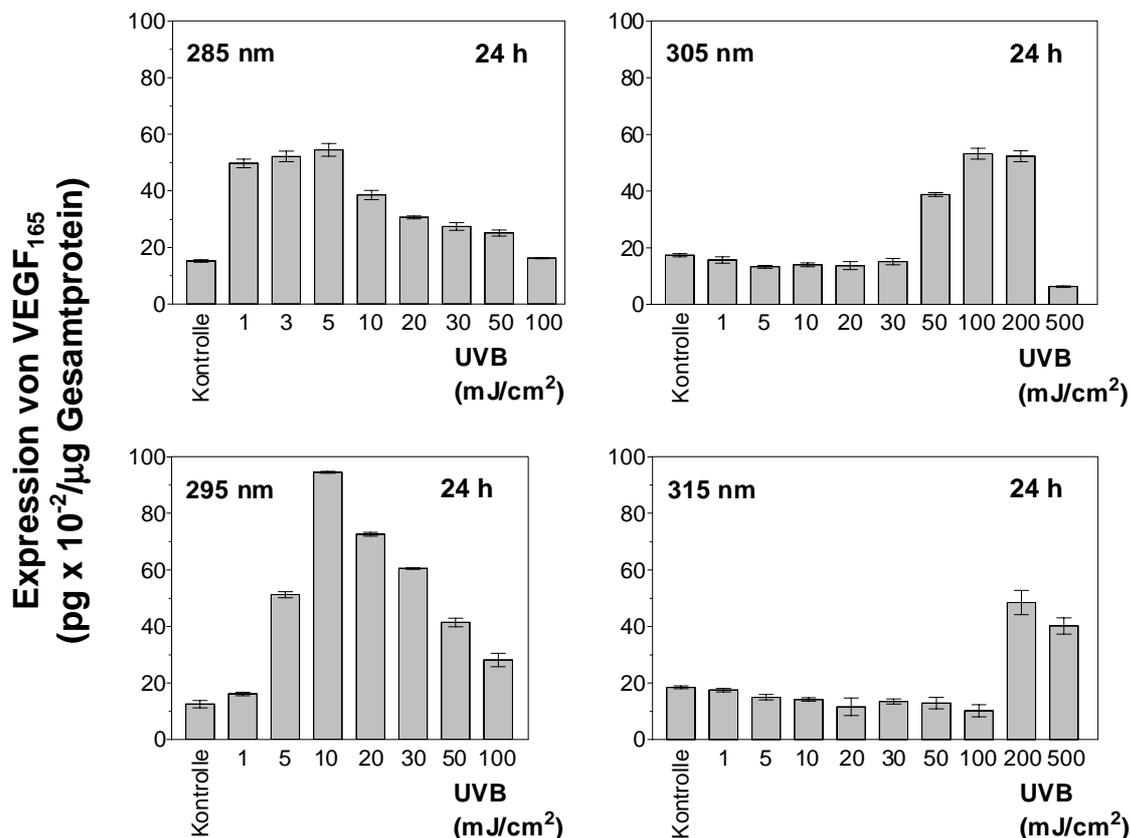
(Abb. 24), wurde die kumulative VEGF<sub>165</sub>-Expression 24 h nach Bestrahlung der HaCaT-Zellen in einem VEGF<sub>165</sub>-ELISA ermittelt. Der Effekt von UVB-Strahlung definierter Wellenlängenbereiche auf die VEGF<sub>165</sub>-Expression der Zellen ist in Abb. 25 dargestellt.



**Abb. 24 Vitalität von HaCaT-Zellen vierundzwanzig Stunden nach Exposition mit UVB-Strahlung definierter Wellenlängenbereiche**

Nach subkonfluentem Wachstum und einer 18stündigen Inkubation in serumfreien DMEM<sup>+/+</sup> wurden HaCaT-Zellen bei einer Spaltenbreite von 5 nm mit verschiedenen Dosen der Wellenlängen 285, 295, 305 und 315 nm bestrahlt. Vierundzwanzig h nach der Bestrahlung wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der bestrahlten Zellen ist im Verhältnis zu unbestrahlten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten (n = 3) bestimmt.

Ab einer Dosis von  $> 20 \text{ mJ/cm}^2$  wiesen HaCaT-Zellen 24 h nach der wellenlängenspezifischen Bestrahlung bei 285 nm im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen eine Vitalität unter 80 % auf. Für den Wellenlängenbereich von 295 nm lag dieser Grenzwert bei einer Dosis von  $25 \text{ mJ/cm}^2$  und für den Wellenlängenbereich von 305 nm bei  $450 \text{ mJ/cm}^2$ . Eine Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit einem Wellenlängenbereich von 315 nm zeigte bis zu einer Dosis von  $500 \text{ mJ/cm}^2$  keinen Vitalitätsverlust der bestrahlten Zellen unter 80 % im Vergleich zu unbestrahlten Kontrollzellen (Abb. 24).



**Abb. 25 Die VEGF<sub>165</sub>-Expression ist abhängig von Dosis und Wellenlänge der UVB-Bestrahlung**

Die wellenlängenabhängige UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen erfolgte mit einer Xenon-Hochdruck-UV-Quelle in Kombination mit einem Monochromator mit holographischem Gitter (Dermolum UMW, Müller, Moosinning). Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden nach einer 18stündigen Inkubation in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> zweimal mit PBS<sup>+/+</sup> gewaschen und unter einem Film von PBS<sup>+/+</sup> mit verschiedenen Dosen (1 bis 500 mJ/cm<sup>2</sup>) der Wellenlängen 285, 295, 305 und 315 nm bei einer Spaltenbreite von 5 nm bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde das PBS<sup>+/+</sup> abgesaugt und die Zellen mit 1 ml serumfreien DMEM<sup>+/+</sup>-Mediums versehen. Vierundzwanzig Stunden nach der UVB-Bestrahlung wurden VEGF<sub>165</sub>-Konzentration und Gesamtproteingehalt der Ansätze bestimmt. Die Daten sind in pg VEGF<sub>165</sub> x 10<sup>-2</sup>/μg Gesamtprotein dargestellt (Mittelwert ± SD, n = 3).

Eine Dosis von 5 mJ/cm<sup>2</sup> im Wellenlängenbereich von 285 nm führte zu einer 3,5-fachen Induktion der VEGF-Expression verglichen mit der von Kontrollzellen. Die stärkste 6,6-fache Induktion von VEGF<sub>165</sub> wurde bei einer Wellenlänge von 295 nm und einer Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> erreicht. Um eine ähnlich starke Induktion bei den Wellenlängen 305 und 315 nm zu erreichen, mußten die HaCaT-Zellen mit wesentlich höheren UVB-Dosen von 100 bzw. 200 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt werden, was bei 305 nm zu einer maximal 3,1-fachen und bei 315 nm zu einer 2,6-fachen Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression führte. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Zellen mit dem gesamten UVB-Spektrum (280 bis 320 nm) bestrahlt. Bestrahlungen mit Gesamt-UVB führten bei einer Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> zu einer bis zu 5-fachen Expression von VEGF<sub>165</sub>.

## 5.6 Die UVB-bedingte VEGF<sub>165</sub>-Induktion wird durch eine Gruppe von SP-1/AP-2-Bindungsstellen (-1133 bis -1107) im humanen VEGF-Promotors vermittelt

Zur Identifizierung UVB-sensitiver Elemente im VEGF-Promotor wurden HaCaT-Zellen mit Deletionskonstrukten des humanen VEGF-Promotors transient transfiziert und mit einer UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Die Promotoraktivität der Konstrukte wurde anhand der Expression eines Luciferase-Reportergens ermittelt.

Zur Herstellung der Deletionskonstrukte wurden 3 kbp des 5'-flankierenden Bereiches des humanen VEGF-Gens mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen geschnitten (s. Abb. 26) und die daraus resultierenden Fragmente in einem Luciferase-Vektor (pGL-2; Promega, Heidelberg) vor das Reportergen kloniert. Die Abb. 26 gibt einen Überblick über den humanen VEGF-Promotor mit verschiedenen potentiellen Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren. Desweiteren sind in der Abb. 26 die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen zur Herstellung der verschiedenen Promotordeletionskonstrukte angegeben.

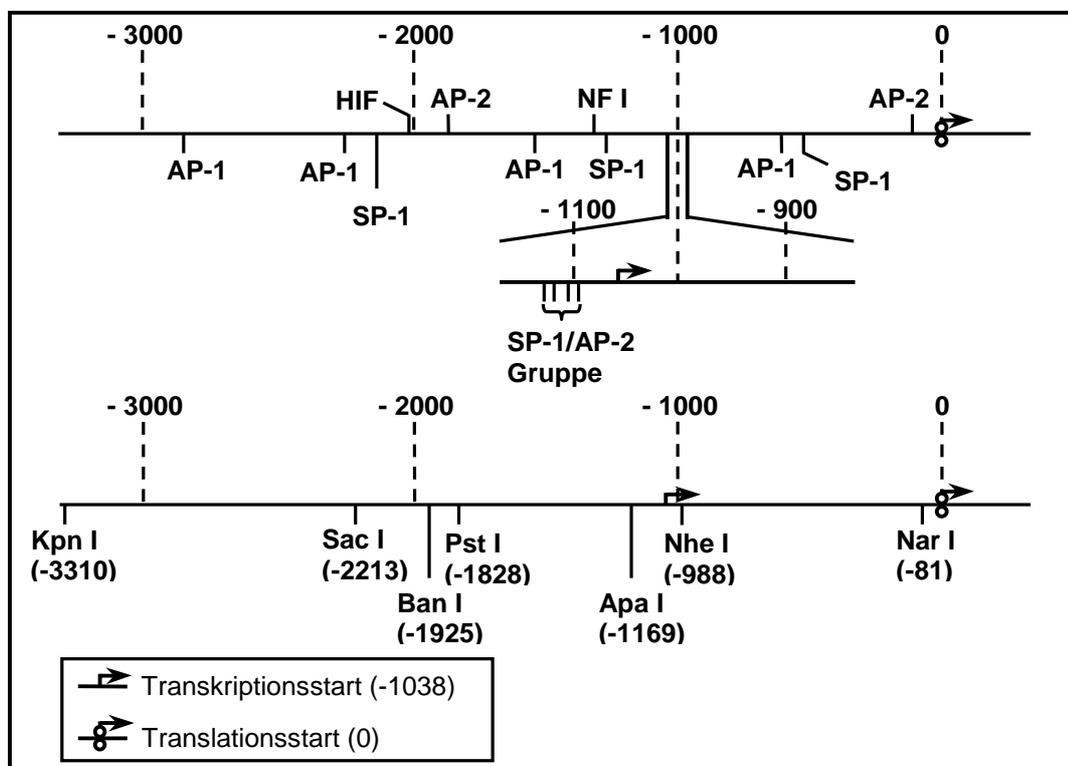


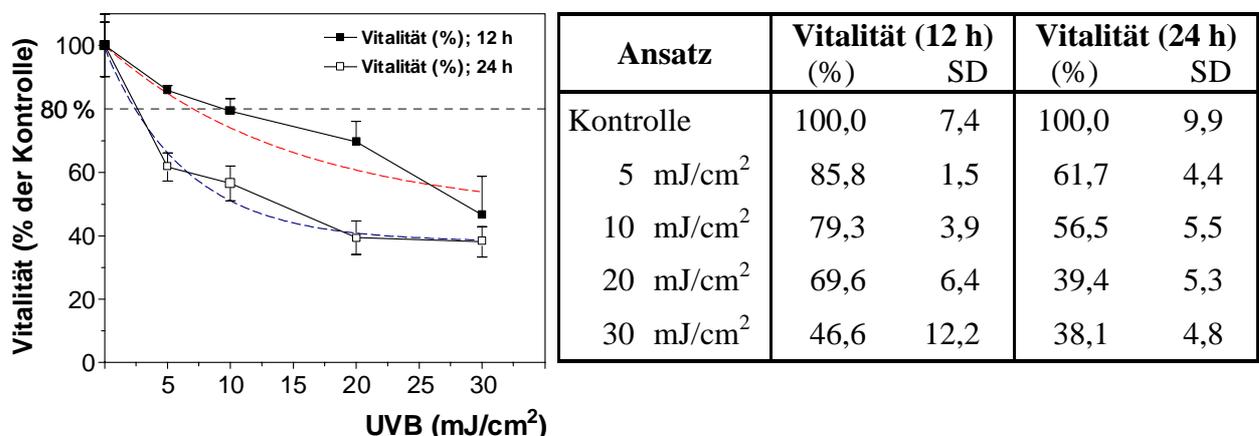
Abb. 26 Übersicht des humanen VEGF-Promotors und Restriktionsschnittstellen zur Herstellung von Promotordeletionskonstrukten (modifiziert nach Tischer et al., 1991)

Für die Analyse potentieller UVB-sensitiver Elemente im VEGF-Promotor wurden Promotorkonstrukte mit Transkriptionsfaktorbindungsstellen verwendet (s. Tabelle 5).

Konstrukt	Promotorabschnitt (relativ zum Translationsstart)	Potentielle Bindungsstellen für:				
		HIF	AP-1	AP-2	SP-1	NF I
VEGF.1	-3310 bis -81	1	4	3	7	1
VEGF.4	-3310 bis -998	1	3	2	6	1
VEGF.12	-1925 bis -998		1	2	5	1
VEGF.7	-1828 bis -998		1		5	1
VEGF.8	-1169 bis -81		1	2	6	
VEGF.9	-1169 bis -998			1	4	

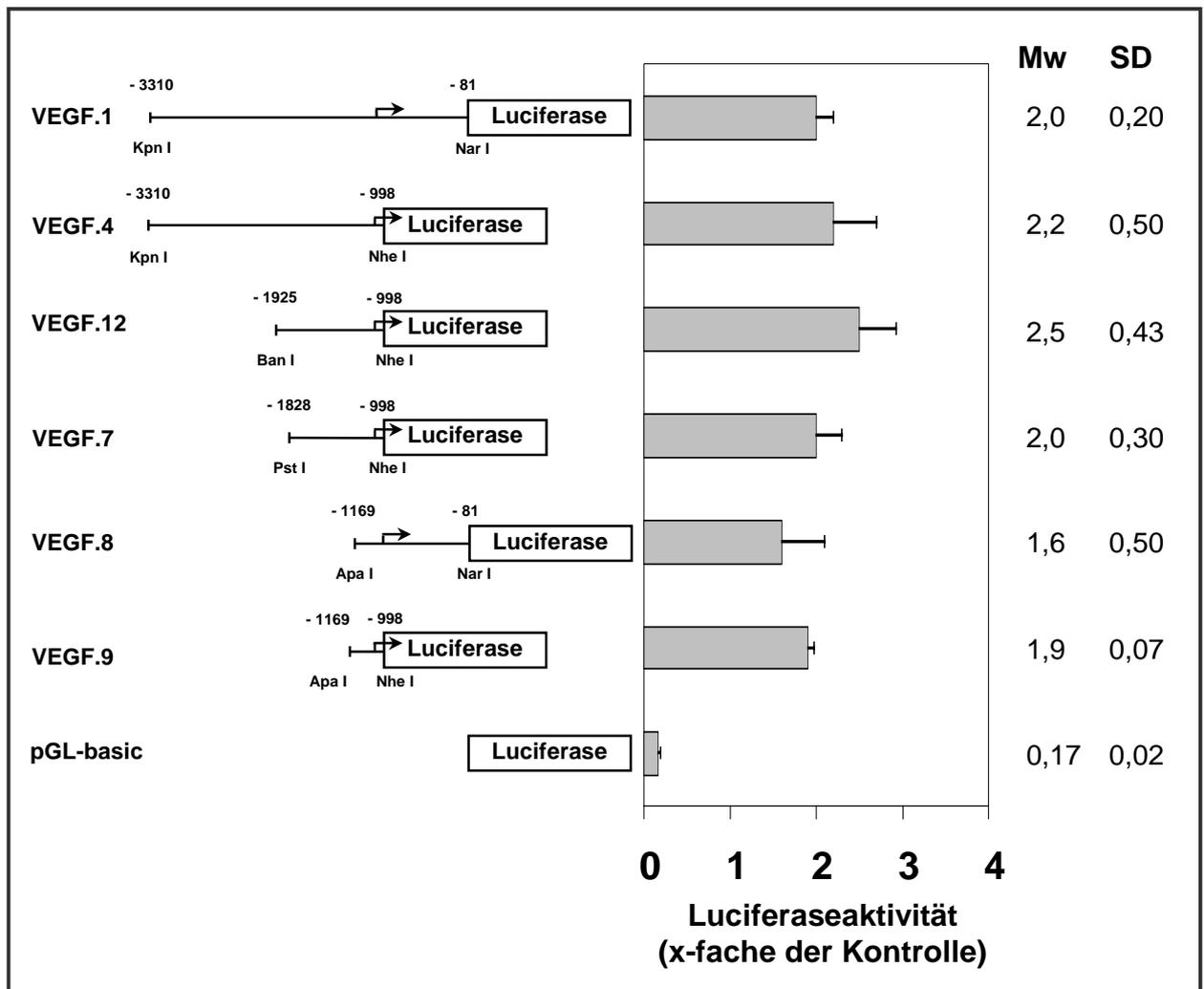
**Tabelle 5** Potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in den verwendeten VEGF-Promotorkonstrukten

Das Promotorkonstrukt VEGF.1 entspricht dem gesamten VEGF-Promotor mit den Sequenzen -3317 bis -81 (relativ zum Translationsstart) und den entsprechenden potentiellen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren wie AP-1, AP-2, SP-1 und für HIF, einem durch Hypoxie induzierbaren Transkriptionsfaktor (Ikeda et al., 1995). Das kürzeste Konstrukt VEGF.9 enthält eine Gruppierung von 4 SP-1- und einer überlappenden AP-2-Bindungsstelle in direkter Nachbarschaft zum Transkriptionsstart (Gille et al., 1997; Williams und Tjian, 1991). Da zusätzlich zur UVB-Bestrahlung eine transiente Transfektion der HaCaT-Zellen einen nicht zu unterschätzender Streßfaktor darstellt, wurde zur Einschätzung der Zytotoxizität ein erneuter Vitalitätstest (MTT-Test) durchgeführt. Repräsentativ für alle Promotorkonstrukte wurde dazu das Konstrukt VEGF.1 in Kotransfektion mit einem  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden Vektor verwendet (s. Abb. 27).



**Abb. 27** Vitalität transient transfizierter HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung (280 - 320 nm) Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden nach transienter Transfektion mit dem Promotorkonstrukt VEGF.1 mit steigender UVB-Dosis bestrahlt. Zwölf bzw. 24 h nach der Bestrahlung wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der bestrahlten Zellen ist im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3).

Die Vitalität transfizierter HaCaT-Zellen 12 h nach einer UVB-Bestrahlung mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  bei 80 % der transfizierten, unbestrahlten Kontroll-Zellen und war 24 h nach Bestrahlung mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  auf 57 % gesunken. Da zusätzliche Experimente (Daten nicht aufgeführt) eine maximale Luciferaseaktivität 12 h nach Bestrahlung der transfizierten Zellen zu den Zeitpunkten 3, 6, 8, 12 und 24 h nach einer UVB-Bestrahlung mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  ergaben, wurde in den folgenden Transfektionsexperimenten dieser Zeitpunkt gewählt.



**Abb. 28 UVB-induzierte Luciferaseaktivität transient transfizierter HaCaT-Zellen**

Nach der Aussaat in 3,5 cm ( $\emptyset$ ) Schalen, einer Wachstumsperiode von 24 h wurden HaCaT-Zellen mit  $1,5 \mu\text{g}$  des jeweiligen Promotorkonstruktes und  $0,5 \mu\text{g}$  pCMV- $\beta$ Gal-Vektor für die Dauer von 5 h kotransfiziert und nach einer 24stündigen Regenerationsphase in  $\text{DMEM}^{+/+}$  + 10 % FCS für 18 h in FCS-freiem  $\text{DMEM}^{+/+}$  mit 0,2 % Lactalbuminhydrolysat inkubiert. Die Bestrahlung der transfizierten Zellen erfolgte mit einer Dosis von  $10 \text{ mJ/cm}^2$  Gesamt-UVB (280 - 320 nm). Zwölf Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen in  $150 \mu\text{l}$  Reporterlysispuffer lysiert. Nach Aufarbeitung der Zelllysate wurden Luciferaseaktivität und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität mit einem Luminometer bestimmt und die Induktion der einzelnen Konstrukte im Verhältnis zur Transfektionseffizienz berechnet. Die Luciferaseaktivität der transfizierten und UVB-bestrahlten Zellen wurde auf die der transfizierten jedoch unbestrahlten Zellen bezogen. Die Luciferaseaktivität der jeweiligen Promotorkonstrukte wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert (Mw)  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

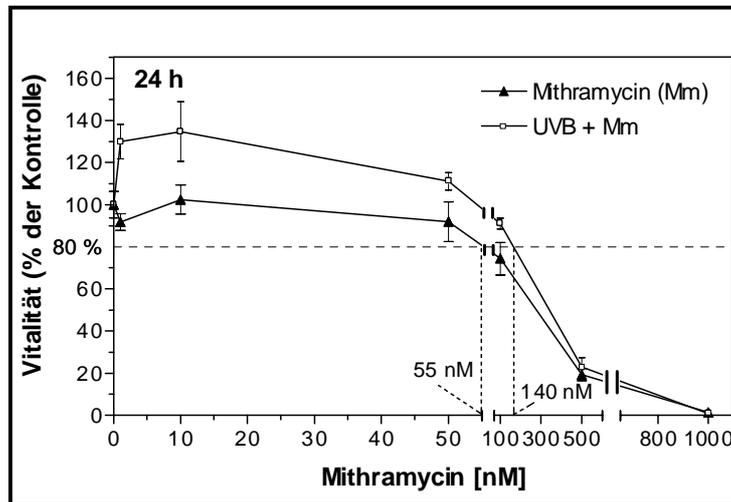
Wie bereits beschrieben wurden HaCaT-Zellen mit verschiedenen Promotorkonstrukten und dem pCMV- $\beta$ Gal-Vektor transient kotransfiziert. Nach einer Regenerationsphase von 24 h in DMEM<sup>+/+</sup> mit 10 % FCS wurden die transfizierten Zellen für 18 h in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert und danach mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> Gesamt-UVB bestrahlt (s. Kapitel 4.3.8). Zwölf Stunden später wurde die Expression von Luciferase und  $\beta$ -Galaktosidase in einem Luminometer gemessen und die jeweiligen Promotoraktivitäten der einzelnen Konstrukte berechnet (s. Material und Methoden). Die UVB-induzierte Luciferaseaktivität der einzelnen Promotorkonstrukte ist in Abb. 28 dargestellt.

Im Gegensatz zur Luciferaseaktivität der promotorlosen Kontrolle (pGL-basic) zeigten alle Konstrukte im Vergleich zu den transfizierten unbestrahlten Kontrollen nach UVB-Bestrahlung eine deutliche Induktion der Luciferaseaktivität. Eine Bestrahlung von Zellen, die mit dem kürzesten Promotorkonstrukt VEGF.9 transfiziert wurden, ergab eine vergleichbar hohe Luciferaseaktivität wie die übrigen Promotorkonstrukte. Das Konstrukt VEGF.9 (-1169 bis -998) enthielt lediglich eine Gruppierung von vier SP-1- und einer überlappenden AP-2-Bindungsstelle vor dem Reporter gen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß diese SP-1/AP-2-Gruppierung zur Vermittlung des UVB-Effektes auf den VEGF-Promotor ausreicht. Um die essentielle Rolle dieses Promotorbereiches bei der UVB-Induktion von VEGF zu bestätigen, wurde in den folgenden Experimenten die Auswirkung von Mithramycin auf die UVB-induzierte VEGF-Promotoraktivität und VEGF<sub>165</sub>-Expression untersucht. Mithramycin bindet ebenso wie der Transkriptionsfaktor SP-1 an GC-reiche DNA-Sequenzen und wirkt daher als kompetitiver Inhibitor der SP-1-Bindung an den VEGF-Promotor.

### **5.7 Die UVB-induzierte VEGF-Promotoraktivität und VEGF<sub>165</sub>-Expression wird durch Mithramycin verringert**

Um die Bedeutung der SP-1/AP-2-Transkriptionsfaktor-Gruppierung bei der UVB-abhängigen Induktion der VEGF-Promotoraktivität und der VEGF<sub>165</sub>-Proteinexpression zu untersuchen, wurden HaCaT-Zellen vor und nach einer UVB-Exposition mit Mithramycin inkubiert. Bei Mithramycin handelt es sich um einen antimikrobiellen Wirkstoff mit reversibler Bindung an GC-reiche DNA-Sequenzabschnitte (Berlin et al., 1968; Van Dyke und Dervan, 1983). Durch Mithramycin kann die Transkription von Genen reversibel inhibiert

wird, die GC-haltige Sequenzen im Promotorbereich besitzen (Miller et al., 1987; Ray et al., 1990; Blume et al., 1991; Hardenbol und Van Dyke, 1992). Mithramycin hemmt die Bindung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. SP-1 (Konsensussequenz: 5'-GGGCGG-3' oder 5'-CCGCCC-3') an GC-reiche Promotorsequenzen (Ray et al., 1989; Snyder et al., 1991).



**Abb. 29 Vitalität von HaCaT-Zellen nach Behandlung mit Mithramycin oder einer Kombination von Mithramycin und UVB (10 mJ/cm<sup>2</sup>)**

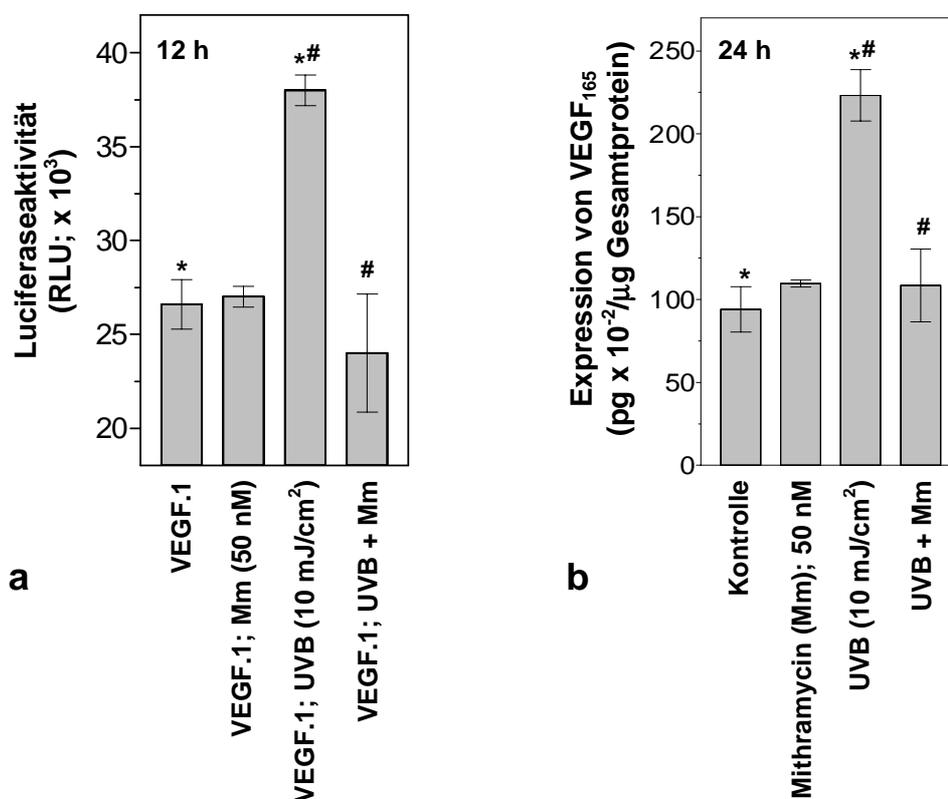
Nach subkonfluentem Wachstum wurden HaCaT-Zellen für 18 h in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert und danach für 2 h mit steigenden Konzentrationen von Mithramycin behandelt. Zur Ermittlung der kombinierten Zytotoxizität von Mithramycin und UVB wurden HaCaT-Zellen zusätzlich zur Behandlung mit Mithramycin noch mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> Gesamt-UVB bestrahlt. Anschließend wurden bestrahlte wie auch unbestrahlte HaCaT-Zellen für weitere 2 h mit Mithramycin inkubiert. Zweiundzwanzig h später wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der behandelten Zellen ist im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert ± SD, n = 3).

In einem Vorexperiment wurde die Zytotoxizität von Mithramycin ohne UVB und mit UVB einer Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> geprüft (Abb. 29). Die kombinierte Behandlung von HaCaT-Zellen mit Mithramycin und UVB führte bis zu einer Mithramycin-Konzentrationen von 100 nM im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zu einem Anstieg der Vitalität was auf eine gesteigerten Proliferation der HaCaT-Zellen zurückzuführen ist. Ab einer Mithramycin-Konzentration von 140 nM und einer kombinierten UVB-Bestrahlung sank die Vitalität der behandelten Zellen unter 80 % der Vitalität un behandelter Kontrollzellen. Eine alleinige Behandlung von HaCaT-Zellen mit Mithramycin ergab bis zu einer Konzentration von 55 nM eine Vitalität der Zellen über 80 % verglichen mit den Kontrollzellen.

Die HaCaT-Zellen wurden nach der Transfektion mit dem Promotorkonstrukt VEGF.1 zur Regeneration für 24 h mit DMEM<sup>+/+</sup> und 10 % FCS inkubiert. Nach einer 18stündigen Inkubation mit serumfreien DMEM<sup>+/+</sup> wurden die transfizierten Zellen für 2 h mit 50 nM

Mithramycin inkubiert und mit einer UVB-Dosis von  $10 \text{ mJ/cm}^2$  bestrahlt. Die Inkubation mit  $50 \text{ nM}$  Mithramycin wurde anschließend für weitere  $2 \text{ h}$  fortgesetzt. Zwölf h nach der Bestrahlung wurde die Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität in den Zellen gemessen.

Die UVB-Bestrahlung führte zu einer 1,5-fachen Induktion der Luciferaseaktivität im Vergleich zu unbestrahlten aber transfizierten Kontrollen. Mithramycin reduzierte die Luciferaseaktivität der transfizierten und bestrahlten Zellen auf das Basalniveau der unbestrahlten Kontrolle (Abb. 30a).



**Abb. 30 Mithramycin inhibiert die VEGF-Promotoraktivität und VEGF-Expression nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen**

(a) Nach transienter Transfektion von HaCaT-Zellen mit dem Promotorkonstrukt VEGF.1 wurden die Zellen nach 18stündiger Inkubation in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> für  $2 \text{ h}$  mit  $50 \text{ nM}$  Mithramycin inkubiert und mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt. Anschließend folgte eine weitere Inkubation mit Mithramycin für  $2 \text{ h}$ . Nach Austausch des Mithramycin-haltigen Medium durch frisches, serumfreies DMEM<sup>+/+</sup> erfolgte  $12 \text{ h}$  nach der Bestrahlung die Lyse der Zellen mit Reporterlysispuffer und die Messung der Luciferase- und  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Die Luciferaseaktivität ist in relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P = 0,0002 und #P = 0,0017 bezogen auf die UVB-bestrahlte Kontrolle; Student's *t*-Test). (b) HaCaT-Zellen wurden nach einer 18stündigen Inkubation in serumfreiem DMEM<sup>+/+</sup> für  $2 \text{ h}$  mit  $50 \text{ nM}$  Mithramycin inkubiert und mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  UVB bestrahlt. Anschließend wurden die bestrahlten HaCaT-Zellen für weitere  $20 \text{ h}$  mit Mithramycin behandelt. Die VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate wurde innerhalb des Zeitraums von  $20\text{-}24 \text{ h}$  in einem ELISA bestimmt und auf  $1 \mu\text{g}$  Proteingehalt der einzelnen Ansätze bezogen. Die Daten sind in  $\text{pg VEGF}_{165} \times 10^{-2}/\mu\text{g}$  Gesamtprotein dargestellt (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P = 0,0004 und #P = 0,0018 bezogen auf die UVB-bestrahlte Kontrolle; Student's *t*-Test).

Die inhibitorische Wirkung von Mithramycin war ebenfalls auf Proteinebene zu beobachten. Im Vergleich zu einer etwa 2,4-fachen UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub>-Protein gegenüber der unbestrahlten Kontrolle, konnte der UVB-Effekt mit 50 nM Mithramycin annähernd auf das Basalniveau der unbestrahlten Kontrolle vermindert werden (Abb. 30b). Da Mithramycin aufgrund seiner GC-Spezifität vielfältige Bindungsmöglichkeiten auf DNA-Ebene besitzt und der beobachtete Effekt auf einer unspezifischen Bindung von Mithramycin basieren könnte, sollte die Funktion der SP-1/AP-2-Gruppe in weiteren Experimenten untersucht werden.

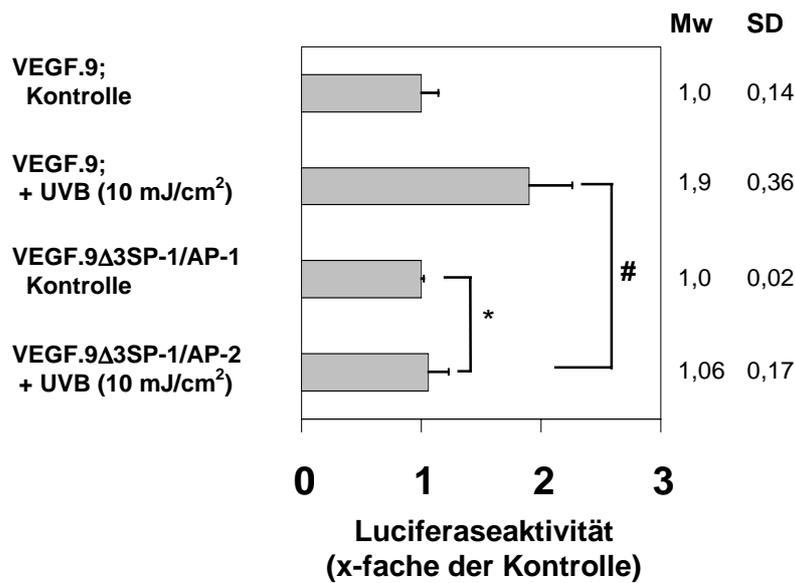
### **5.8 Eine Deletion der SP-1/AP-2-Gruppe (-1133 bis -1107) im VEGF-Promotor verhindert die Promotoraktivierung durch UVB-Bestrahlung**

Um einen weiteren Hinweis dafür zu erhalten, ob die SP-1/AP-2-Gruppierung in direkter Nähe zum Transkriptionsstart des humanen VEGF-Gens eine wesentliche Rolle bei der UVB-induzierten VEGF-Expression spielt, wurden die Bindungsstellen dieser Gruppe in den Promotorkonstrukten VEGF.1 und VEGF.9 über eine auf PCR-basierendes *in vitro*-Mutageneseverfahren modifiziert (Pogulis et al., 1996).

Über eine Zweistufen-PCR und die Wahl entsprechender Primer (s. Kapitel 4.1.6) wurden in beiden Promotorkonstrukten drei der vier SP-1- und die überlappende AP-2-Bindungsstelle deletiert. Durch die *in vitro*-Mutagenese wurde in beiden Konstrukten die Nukleotid -1133 bis -1107 entfernt. Die entsprechenden Mutationen wurden in einer Sequenzanalyse bestätigt.

Für eine erste Untersuchung wurden HaCaT-Zellen sowohl mit dem Konstrukt VEGF.9 und mit dem deletierten Konstrukt VEGF.9  $\Delta$ 3SP-1/AP-2 transient transfiziert. Die Luciferaseaktivität beider Promotorkonstrukte wurde nach einer UVB-Bestrahlung mit einer Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> gemessen und mit der Basalaktivität der Luciferase transfizierter jedoch unbestrahlter Kontrollen verglichen (Abb. 31).

Die UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen, die zuvor mit dem deletierten Konstrukt VEGF.9 $\Delta$ 3SP-1/AP-2 transfiziert worden sind, zeigte im Vergleich zur transfizierten und unbestrahlten Kontrolle keine signifikanten Induktion der Luciferaseaktivität, während die UVB-Exposition der mit VEGF.9 transfizierten Zellen zu einer 2-fachen Induktion der Luciferaseaktivität führte (Abb. 31).

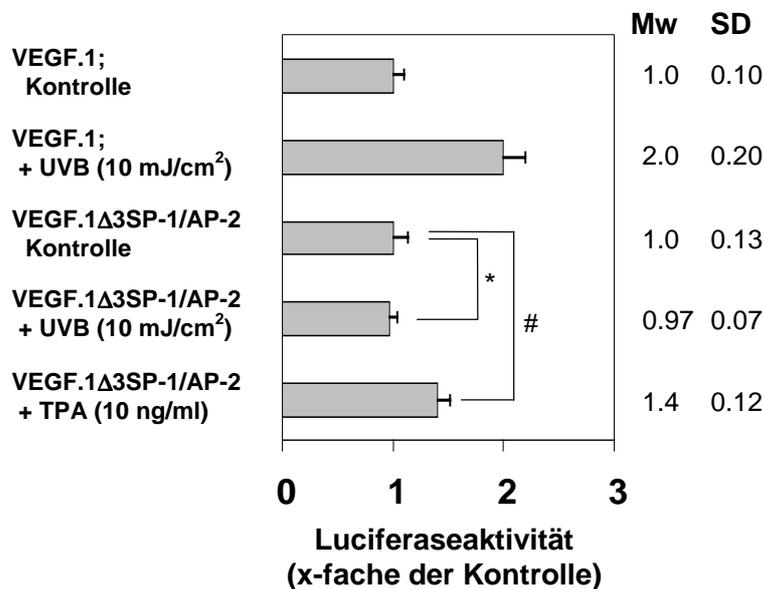


**Abb. 31 Die Deletion in der SP-1/AP-2-Gruppe verhindert die UVB-vermittelte Aktivierung der Luciferase im Promotorkonstrukt VEGF.9**

Nach transienter Transfektion der beiden Konstrukte VEGF.9 und VEGF.9 $\Delta$ 3SP-1/AP-2 wurden HaCaT-Zellen nach einer 24stündigen Regeneration in DMEM<sup>+/+</sup> mit 10 % FCS für 18 h in serumfreien DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> Gesamt-UVB bestrahlt. Die UVB-induzierte Luciferaseaktivität wurde nach 12 h gemessen und auf die Basalaktivität der transfizierten jedoch unbestrahlten Kontrollen bezogen. Nach einer UVB-Bestrahlung der mit VEGF.9 transfizierten Zellen ergab sich eine etwa 2-fache Induktion der Luciferaseaktivität, während die Bestrahlung der mit VEGF.9 $\Delta$ 3SP-1/AP-2 transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu keiner signifikanten Induktion der Luciferaseaktivität führte. Die Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert (Mw)  $\pm$  SD, n = 3; \*P = 0,57 bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle; #P = 0,022 bezogen auf die Luciferaseaktivität des nicht-mutierten Konstruktes VEGF.9; Student's *t*-Test).

Dieses Ergebnis wurde durch transiente Transfektion mit den Konstrukten VEGF.1 und dem mutierten Konstrukt VEGF.1 $\Delta$ 3SP-1/AP-2 in HaCaT-Zellen und nachfolgende UVB-Induktion der Luciferaseaktivität bestätigt (Abb. 32). Wie auch schon beim Konstrukt VEGF.9 $\Delta$ 3SP-1/AP-2 war 12 h nach UVB-Bestrahlung beim mutierten Konstrukt VEGF.1 $\Delta$ 3SP-1/AP-2 die Luciferaseaktivität nicht erhöht. Eine UVB-Bestrahlung der mit dem Konstrukt VEGF.1 transfizierten Zellen zeigte eine 2-fach erhöhte Luciferaseaktivität im Vergleich zur transfizierten und unbestrahlten Kontrolle. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, daß die VEGF-

induzierende Wirkung von UVB-Strahlung über diese SP-1/AP-2-Gruppe (-1133 bis -1107) auf den VEGF-Promotor ausgeübt wird.



**Abb. 32 Die partielle Deletion der SP-1/AP-2-Gruppe im VEGF-Promotor verhindert spezifisch die UVB-abhängige Aktivierung der Luciferase und interferiert nicht mit der generellen Transkription**

Nach transienter Transfektion der beiden Konstrukte VEGF.1 und VEGF.1Δ3SP-1/AP-2 in HaCaT-Zellen wurde die UVB-induzierte Luciferaseaktivität nach 12 h gemessen und mit der Basalaktivität der transfizierten jedoch unbestrahlten Kontrollen verglichen. Eine UVB-Bestrahlung der mit VEGF.1 transfizierten Zellen ergab eine 2-fache Induktion der Luciferaseaktivität, während die Bestrahlung der mit VEGF.1Δ3SP-1/AP-2 transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu keiner signifikanten Induktion der Luciferaseaktivität führte. Die Stimulierung der mit VEGF.1Δ3SP-1/AP-2 transfizierten HaCaT-Zellen mit TPA führte jedoch zu einer signifikanten Induktion der Luciferaseaktivität. Diese TPA-vermittelte Induktion der Luciferaseaktivität spricht gegen eine generelle Inhibierung der Transkriptionsaktivität dieses Konstruktes durch die eingebrachte Deletion. Die Luciferaseaktivität der Promotorkonstrukte wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert (Mw) ± SD, n = 3; \*P = 0,69 und #P = 0,011 bezogen auf die unbestrahlte Kontrolle; Student's t-Test).

Bei TATA-losen Promotoren, wie dem VEGF-Promotor wird zur Transkription des Gens die Bindung von SP-1-Transkriptionsfaktoren zur Rekrutierung von Proteinen des Transkriptionsinitiations-Komplexes benötigt (Azizkhan et al., 1993). Um auszuschließen, daß die in den VEGF-Promotor eingebrachte Deletion mit der generellen Initiation der Transkriptionsmaschinerie interferierte, wurde die Induzierbarkeit des mutierten Konstruktes VEGF.1Δ3SP-1/AP-2 durch 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) untersucht. Dabei handelt es sich bei TPA um einem Tumorpromoter der Phorbolsterklasse. Mit TPA kann die Expression von Genen induziert werden, deren Promotoren durch die Transkriptionsfaktoren AP-1 und AP-2 transaktiviert werden (Imagawa et al., 1987).

Nach partieller Deletion der SP-1/AP-2-Gruppe enthielt das Konstrukt VEGF.1 $\Delta$ 3SP-1/AP-2 im Promotorbereich noch 4 potentielle AP-1- und 2 AP-2-Bindungsstellen. Eine Induktion der Luciferaseaktivität dieses mutierten Konstruktes mit TPA sollte möglich sein, wenn nicht die generelle Transkription des Reportergens durch die eingebrachte Deletion inhibiert wird. Im Vergleich zur fehlenden Induktion nach UVB führte die Stimulierung des mutierten Promotorkonstruktes VEGF.1 $\Delta$ 3SP-1/AP mit TPA zu einer 1,4-fachen Induktion der Luciferaseaktivität gegenüber der mit dem entsprechenden Konstrukt transfizierten jedoch unbestrahlten Kontrolle.

Zusammenfassend unterstützen diese Daten die Schlußfolgerung, daß die SP-1/AP-2-Gruppe den UVB-Effekt auf den VEGF-Promotor vermittelt. Untersuchungen von Gille et al. (1997) haben ergeben, daß in humanen A431-Plattenepithelkarzinomzellen diese SP-1/AP-2-Gruppierung zumindest teilweise an der TGF $\alpha$ -vermittelten Induktion von VEGF beteiligt ist.

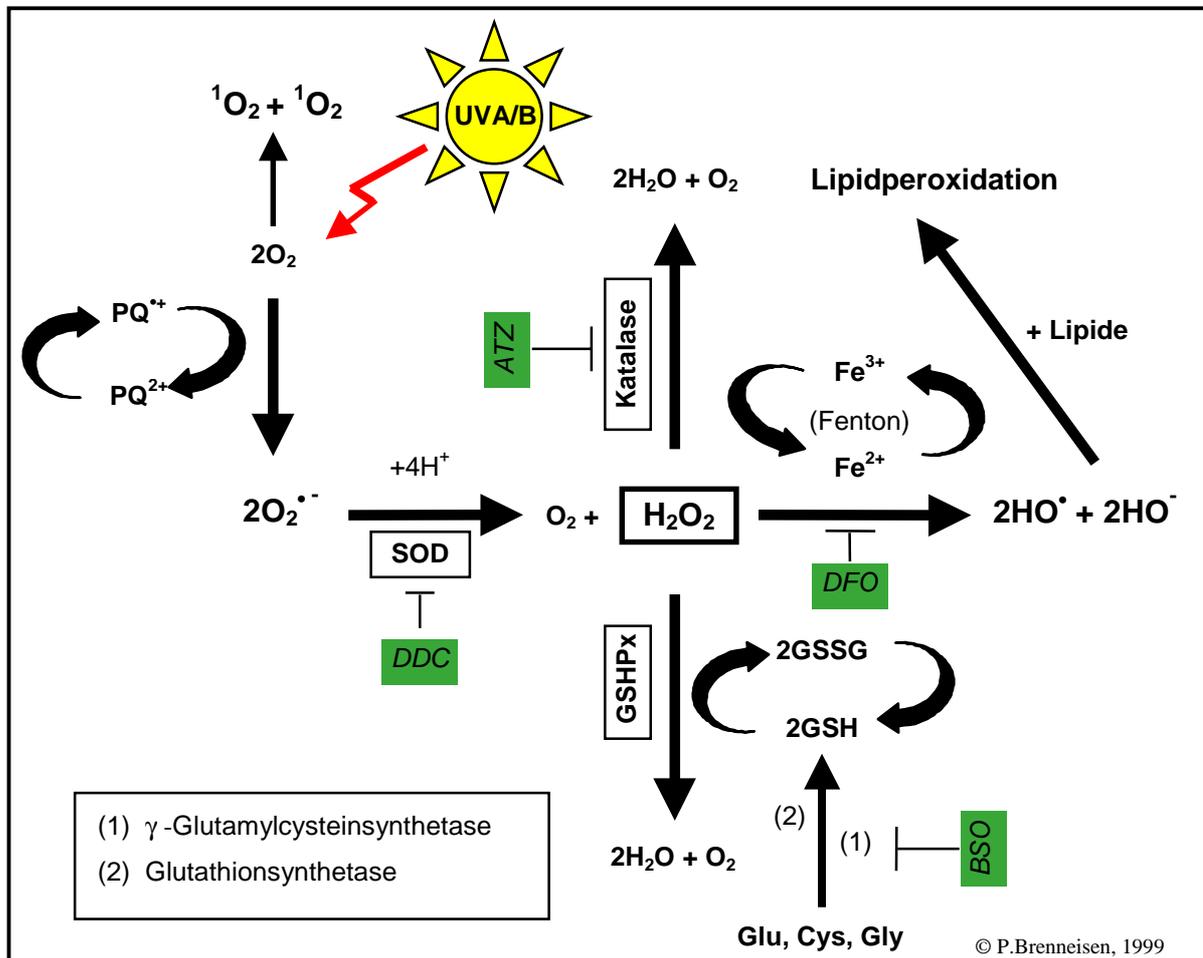
In den folgenden Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, inwiefern die UVB-induzierte VEGF-Expression durch die Wirkung UVB-induzierter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder autokrin wirksamer Faktoren vermittelt wird.

### **5.9 Die UVB-bedingte Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Synthese in HaCaT-Zellen ist nicht auf den direkten Einfluß reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen**

Neben der Induktion von potentiell mutagenen DNA-Schäden in den Zellen der Haut (Halliwell und Aruoma, 1991; Cerutti, 1994; Scharffetter-Kochanek et al., 1997) führt UVB-Strahlung zur Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Darr und Fridovich, 1994; Jurkiewicz und Buettner, 1994), durch deren Wirkung das Expressionsmuster vieler Gene beeinflußt wird, die bei der Signaltransduktion von Zellzykluskontrolle, Tumorpromotion oder -progression eine wichtige Rolle spielen (Stein et al., 1989; Hibi et al., 1993; Keyse, 1993).

Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß eine UV-Absorption (UVA und UVB) der Haut sowohl in der Epidermis als auch der Dermis intrazellulär zu oxidativem Streß durch UV-Strahlung generierte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) führt (Sies, 1991). Zu den reaktiven Sauerstoffverbindungen gehören beispielsweise Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), Superoxidanionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Stickstoffmonoxid (NO) und Hydroxylradikale ( $\text{HO}^{\cdot}$ )

(Black, 1987; Masaki et al., 1995a; Jurkiewicz und Buettner, 1996). Diese reaktiven Sauerstoffspezies sind in der Lage, direkt oder über Folgeprodukte (Babbs und Steiner, 1990; Morlière et al., 1991; Perez et al., 1995) die zelluläre Homeostase zu schädigen (Abb. 33).



**Abb. 33 UV-Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und deren enzymatische Entgiftung**

Absorption von UVA- und UVB-Strahlung durch verschiedene Chromophore führt in Zellen der Haut zu verstärktem oxidativen Streß durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), Superoxidanion ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikalen ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) und ihren Folgeprodukten. Demgegenüber verfügen die Zellen über verschiedene ROS-detoxifizierende Enzyme, wie z.B. die Superoxiddismutase (SOD), Katalase oder die Glutathionperoxidase (GSHPx), welche durch ein aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel in der Lage sind, ROS in ungiftige und nicht-reaktive Endprodukte wie Wasser und Sauerstoff zu überführen. Die Funktion dieser Enzyme läßt sich durch verschiedene Inhibitoren (ATZ, BSO, DDC oder DFO) hemmen, wodurch es möglich ist, gezielt bestimmte ROS in der Zelle anzureichern. Cys, Cystein; Glu, Glutamat; Gly, Glycin; GSH, Glutathion; GSSG, Glutamylcystin;  $\text{H}_2\text{O}$ , Wasser;  $\text{O}_2$ , Sauerstoff.

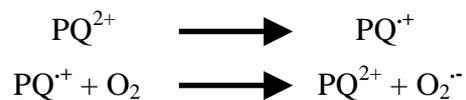
UVB-Bestrahlung erzeugt bereits in geringeren Dosen als UVA-Strahlung Superoxidanionen ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), Hydroxylradikalen ( $\text{HO}^{\cdot}$ ) und Lipidhydroperoxiden (LOOH) (Masaki et al., 1995a, b; Perez et al., 1995). Die Eisen ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ )-abhängige Erzeugung von Hydroxylradikalen (Fenton-Reaktion) und nachfolgende Lipidperoxidation

stellen beispielsweise primäre Ereignisse in der UVB-vermittelten streßabhängigen Signalkaskade dar und steigern *in vitro* die c-Jun-N-terminale Kinase 2 (JNK2) Aktivität, den c-jun mRNA Gehalt und führen letztendlich auf mRNA-Ebene zur Erhöhung der Matrix-abbauenden Metalloproteinasen MMP-1 (interstitielle Kollagenase) und MMP-3 (Stromelysin) in humanen dermalen Fibroblasten (Brenneisen et al., 1998).

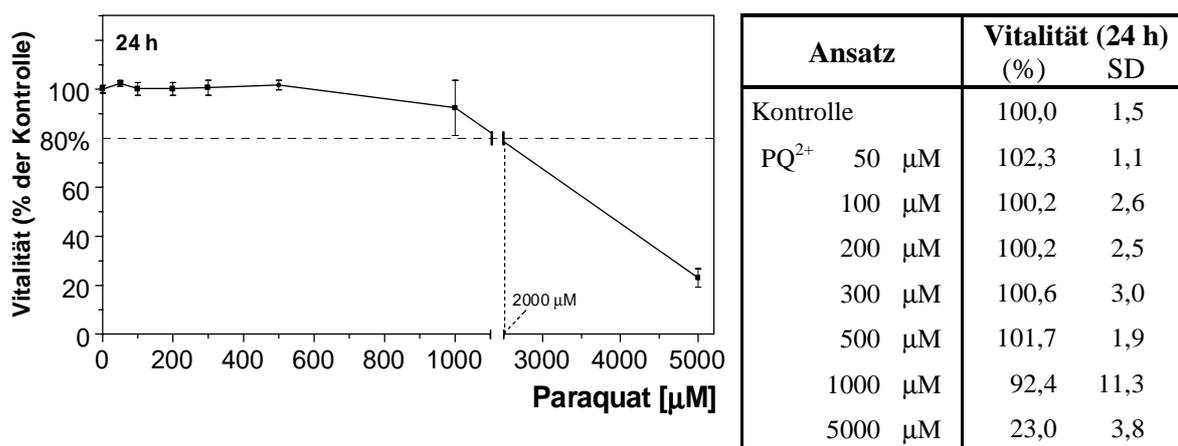
In den folgend beschriebenen Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, ob die UVB-induzierte VEGF-Expression auf die Wirkung UVB-generierter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit ROS-bedingten Veränderungen in der Expression spezifischer Gene zurückzuführen ist. In einem Vorversuch sollte zunächst untersucht werden, ob reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in der Lage sind, VEGF<sub>165</sub> in HaCaT-Zellen zu induzieren und ob der Zeitverlauf der Proteinexpression mit der UVB-induzierten Zeitkinetik übereinstimmt. Dies sollte Aufschluß darüber geben, ob und welche ROS an der UVB-induzierten VEGF-Expression beteiligt sind.

Durch den Einsatz verschiedener Reagenzien ist eine Generierung UVB-spezifischer ROS möglich. Das pflanzliche Herbizid Paraquat (PQ<sup>2+</sup>) reichert beispielsweise intrazellulär Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) an. Paraquat diffundiert in die Zellen und reagiert dort nach zyklischer Reduktion zum stabilen Kationenradikal (PQ<sup>+</sup>) mit molekularem Sauerstoff (O<sub>2</sub>), wodurch wieder PQ<sup>2+</sup> und auch O<sub>2</sub><sup>-</sup> gebildet werden.

Bildung von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) durch Paraquat (PQ<sup>2+</sup>):



Vor der Behandlung von HaCaT-Zellen mit Paraquat wurde dessen Zytotoxizität in einer Vitalitätstestung (MTT-Test) durch die Inkubation von HaCaT-Zellen mit steigenden Konzentrationen von Paraquat ermittelt (Abb. 34).

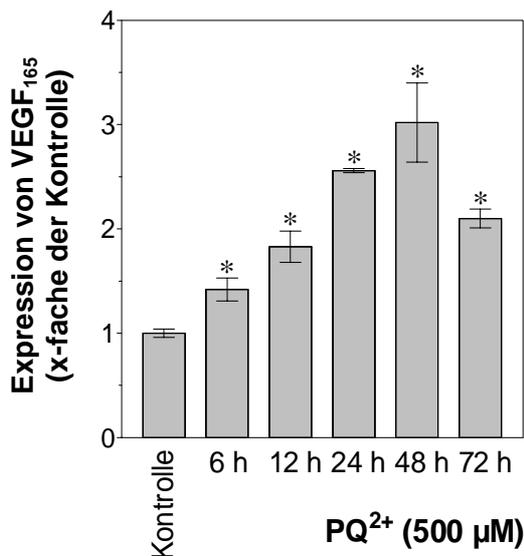


**Abb. 34 Vitalität von HaCaT-Zellen 24 h nach Inkubation mit Paraquat (PQ<sup>2+</sup>)**

Nach subkonfluentem Wachstum wurden HaCaT-Zellen für 18 h in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert und danach mit steigenden Konzentrationen von Paraquat behandelt. Nach 24 h wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der behandelten Zellen ist im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3).

Die Austestung der Zytotoxizität von Paraquat in einer Konzentration von 50 bis 5000  $\mu$ M ergab sich nach 24 h eine leicht verminderte Überlebensrate der Zellen ab 1000  $\mu$ M Paraquat (Abb. 34). Entsprechend wurden die nachfolgenden Experimente mit 500  $\mu$ M PQ<sup>2+</sup> durchgeführt. Bei dieser Paraquat-Konzentration war die Vitalität der behandelten Zellen mit der von unbehandelten Zellen vergleichbar.

Um zu untersuchen, ob Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) einen Einfluß auf die Induktion von VEGF<sub>165</sub>-Protein haben, wurden subkonfluente HaCaT-Zellkulturen nach 18stündiger Inkubation in serumfreien DMEM<sup>+/+</sup> für 2, 8, 20, 44 und 68 h mit 500  $\mu$ M PQ<sup>2+</sup> in 1,5 ml DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert. Anschließend wurde das Paraquat-haltige Medium durch FCS-freies DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt und nach 6, 12, 24, 48 und 72 h die VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate von 4 h bestimmt (Abb. 35).



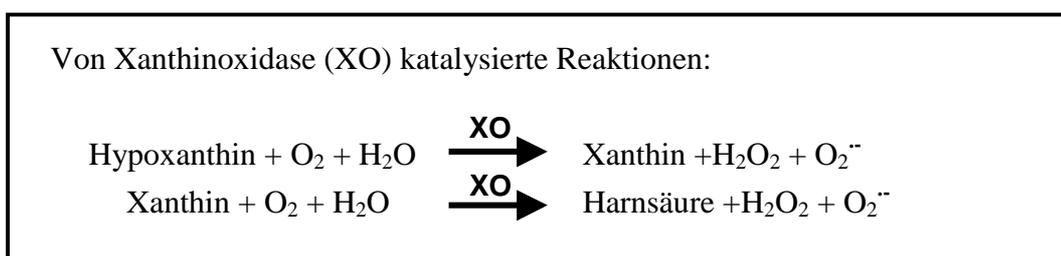
**Abb. 35 Zeitabhängige Induktion von VEGF<sub>165</sub> durch Paraquat (PQ<sup>2+</sup>)**

Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden nach einer 18stündigen Inkubation in serumfreien DMEM<sup>+/+</sup> für 2, 8, 20, 44 und 68 h mit 500 µM PQ<sup>2+</sup> behandelt. Anschließend wurde das Paraquat-haltige Medium durch FCS-freies DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt und nach 4 h die VEGF-Synthese der behandelten HaCaT-Zellen bestimmt. Bereits 6 h nach Inkubation mit Paraquat ergab sich eine signifikanten Erhöhung der VEGF<sub>165</sub>-Synthese mit einer maximalen VEGF-Expression 48 h nach Inkubation mit Paraquat. Die VEGF<sub>165</sub>-Synthese ist als die x-fache Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert ± SD, n = 3) dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P < 0,0001 verglichen mit der unbehandelten Kontrolle; ANOVA).

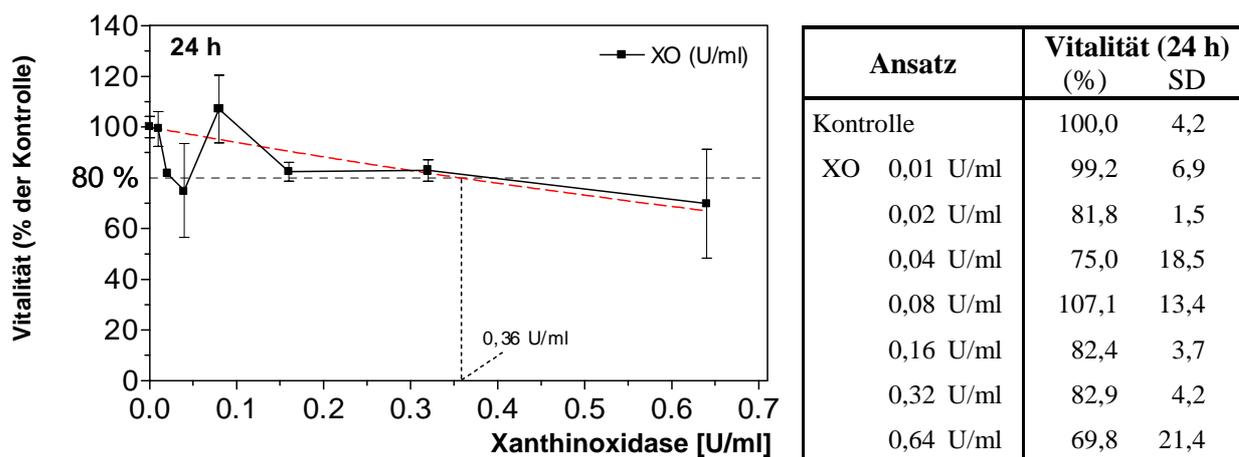
Die Austestung der Zytotoxizität von Paraquat in einer Konzentration von 50 bis 5000 µM ergab sich nach 24 h eine leicht verminderte Überlebensrate der Zellen ab 1000 µM Paraquat (Abb. 34). Entsprechend wurden die nachfolgenden Experimente mit 500 µM PQ<sup>2+</sup> durchgeführt. Bei dieser Paraquat-Konzentration war die Vitalität der behandelten Zellen mit der von unbehandelten Zellen vergleichbar.

Nach 6 h führte eine Behandlung mit 500 µM PQ<sup>2+</sup> zu einer signifikanten 1,4-fachen Erhöhung der VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate mit einer maximalen 3-fachen Expression nach 48 h (Abb. 35). Im Vergleich zur UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Expression mit einem signifikanten Anstieg von VEGF<sub>165</sub>-Protein ab 8 h wies die Induktion von VEGF<sub>165</sub> durch Paraquat eine andere Zeitkinetik auf. Die PQ<sup>2+</sup>-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression begann nach 6 h während die UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Expression 2 h später, entsprechend 8 h nach der Bestrahlung mit UVB zu beobachten war. Dieser Unterschied im Zeitverlauf der VEGF<sub>165</sub>-Expression spricht für eine untergeordnete Rolle von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) in der UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Expression.

Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurde ein weiteres Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) erzeugendes System zur Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression verwendet. Durch die Verwendung von Xanthinoxidase (XO), einem Enzym des Nukleinsäure-Stoffwechsels, und dem Substrat Xanthin (X) ist dieses X/XO-System in der Lage, extrazellulär Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu erzeugen. Dabei hydroxyliert Xanthinoxidase die Substrate Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) und Wasser ( $H_2O$ ). Sekundär entstehen Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (Parks und Granger, 1986).



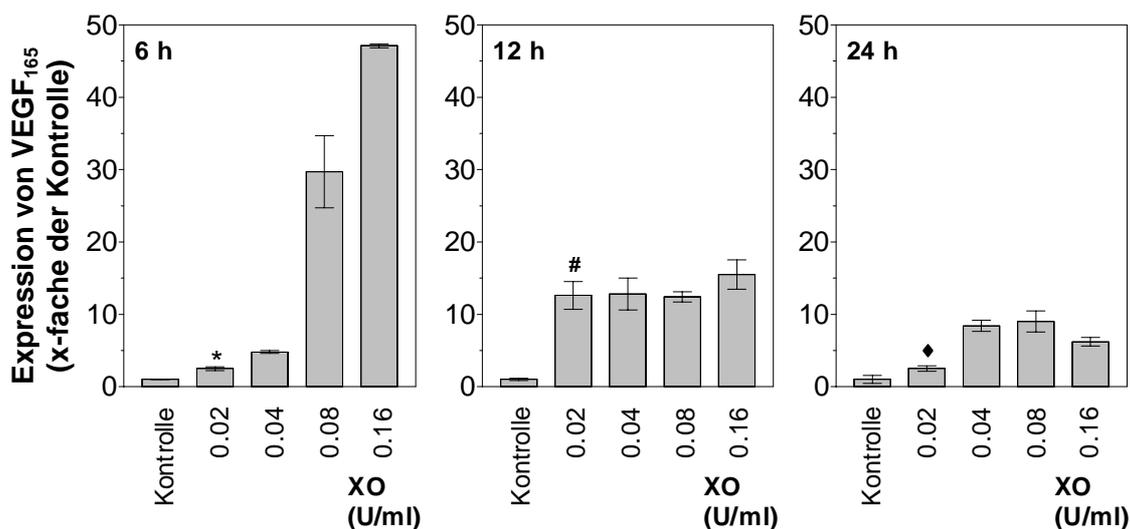
Vor der Behandlung von HaCaT-Zellen mit dem X/XO-System wurde die Zytotoxizität steigenden Konzentrationen von Xanthinoxidase in einer Vitalitätstestung (MTT-Test) ermittelt (Abb. 36).



**Abb. 36 Vitalität von HaCaT-Zellen 24 h nach Inkubation mit Xanthinoxidase (XO)**

Nach subkonfluentem Wachstum wurden HaCaT-Zellen für 18 h in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert und danach bei steigender Xanthinoxidase-Konzentration für 20 min mit dem X/XO-System in PBS<sup>+/+</sup> behandelt. Anschließend wurde die X/XO-haltige Lösung durch FCS-freies DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt. Vierundzwanzig h nach Behandlung mit dem X/XO-System wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der behandelten Zellen ist im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3).

Die Behandlung von HaCaT-Zellen mit dem X/XO-System bei einer Xanthinoxidase-Konzentration von 0,02 bis 0,64 U/ml ergab ab einer Konzentration von 0,36 U/ml Xanthinoxidase eine Vitalität von unter 80 % verglichen mit der Vitalität unbehandelter Kontrollzellen (Abb. 36). Demzufolge wurden HaCaT-Zellen mit Xanthinoxidase einer Konzentration von 0,02 bis 0,16 U/ml behandelt.



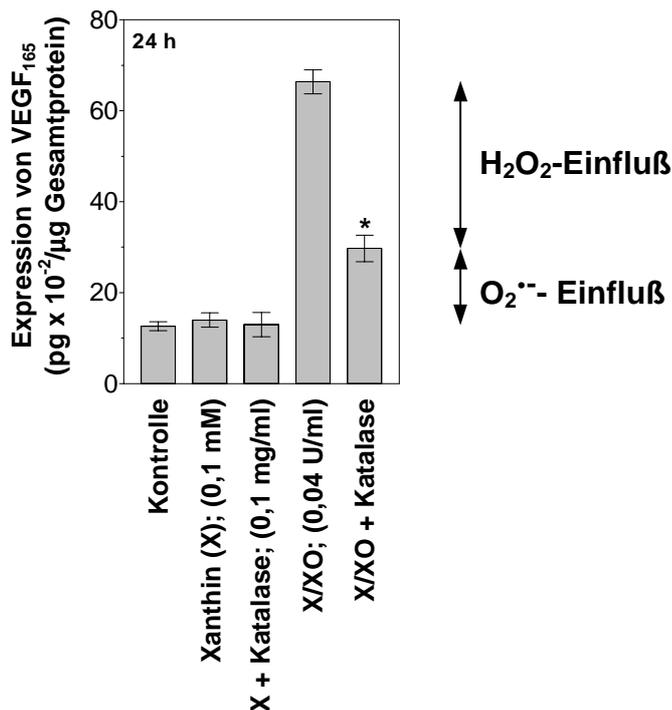
**Abb. 37 Zeit- und konzentrationsabhängige Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Synthese durch die extrazelluläre Generierung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Xanthinoxidase**

Nach subkonfluentem Wachstum und Inkubation für 18 h in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> wurden HaCaT-Zellen für 20 min mit dem X/XO-System bei verschiedenen Konzentrationen an Xanthinoxidase (XO) behandelt. Zur Messung der VEGF-Syntheserate erfolgte 4 h vor Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit (6, 12 und 24 h) ein Austausch des konditionierten Mediums durch frisches FCS-freies DMEM<sup>+/+</sup>. Für eine XO-Konzentration von 0,02 U/ml ergab sich nach 6 h eine signifikante 2,5-fache Erhöhung der VEGF<sub>165</sub>-Synthese mit einer maximalen 12,6-fachen VEGF<sub>165</sub>-Expression nach 12 h. Die VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate ist dargestellt als die x-fache Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert ± SD, n = 3) und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P = 0,0007; #P = 0,0004; ♦P = 0,001 bezogen auf die unbehandelten Kontrollen; Student's *t*-Test).

Eine Inkubation von HaCaT-Zellen mit 0,02 U/ml XO ergab bereits nach 6 h einen signifikanten 2,5-fachen Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Expression mit einer maximalen 12,6-fachen Induktion nach 12 h. Die VEGF<sub>165</sub>-Synthese war 24 h nach der XO-Behandlung mit 0,02 U/ml mit einer 2,5-fachen VEGF<sub>165</sub>-Induktion zwar rückläufig, lag jedoch noch deutlich über der Basalexpression der unbehandelten Kontrollen (Abb. 37).

Durch die Verwendung von XO einer Konzentration >0,04 U/ml konnte eine maximale VEGF<sub>165</sub>-Induktion bereits 6 h nach Inkubation mit dem X/XO-System beobachtet werden. Eine 47,1-fache Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Synthese konnte durch die Behandlung von HaCaT-Zellen mit XO einer Konzentration von 0,16 U/ml nach 6 h erzielt werden (Abb. 37).

Wie zuvor beschrieben führt die Inkubation von Zellen mit dem X/XO-System extrazellulär sowohl Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) als auch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Da in früheren Arbeiten eine Induzierbarkeit von VEGF<sub>165</sub> durch  $H_2O_2$  beschrieben worden ist (Brauchle et al., 1996), wurde dem X/XO-Versuchsansatz Katalase zugesetzt (Abb. 38). Dieses Vorgehen erlaubt es, über die  $H_2O_2$ -entgiftende Katalase den isolierten Einfluß von Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) auf die VEGF<sub>165</sub>-Expression zu untersuchen.



**Abb. 38 Die Induktion von VEGF<sub>165</sub> durch das Xanthin/Xanthinoxidase-System erfolgt sowohl über  $O_2^{\cdot-}$  als auch über  $H_2O_2$**

Wie schon in vorherigen Experimenten führte die Behandlung von HaCaT-Zellen mit X/XO nach 24 h zu einem deutlichen, etwa 5-fachen Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate. Durch die Inkubation der Zellen mit Katalase in einer Konzentration von 1 mg/ml vor und nach der X/XO-Behandlung konnte die VEGF<sub>165</sub>-Expression auf 32% der Induktion der X/XO-Kontrolle gesenkt werden. Die Daten sind dargestellt in pg VEGF<sub>165</sub> x 10<sup>-2</sup>/µg Gesamtprotein (Mittelwert ± SD, n = 3) und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P < 0,0001 bezogen auf die X/XO-behandelte Kontrolle; Student's *t*-Test).

Die X/XO-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression in HaCaT-Zellen konnte durch die Inkubation der Zellen mit 1 mg/ml Katalase deutlich vermindert werden. Die 5-fache Induktion von VEGF<sub>165</sub> durch 0,04 U/ml XO wurde durch die Katalase auf eine 2,3-fache Induktion vermindert, was einem 68 %igen Rückgang der VEGF<sub>165</sub>-Expression entspricht.

Die X/XO-bedingte VEGF<sub>165</sub>-Expression beruht somit sowohl auf der Wirkung von  $H_2O_2$  als auch auf der  $O_2^{\cdot-}$ , wobei die Induktion von VEGF<sub>165</sub> zu einem Großteil auf X/XO-bedingte Entstehung von  $H_2O_2$  zurückzuführen ist. Eine Unterscheidung oder eine genaue

Quantifizierung der Entstehung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid durch das X/XO-System waren zum gegebenen Zeitpunkt aufgrund fehlender technischer Voraussetzungen nicht möglich, so daß bei der Generierung von Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) Paraquat zu bevorzugen ist, welches im Gegensatz zum X/XO-System Superoxidanionen intrazellulär und nicht in Kombination mit  $H_2O_2$  entstehen läßt.

Bei der Induktion von VEGF durch ROS-generierende System wie Paraquat oder X/XO zeigte sich in den vorherigen Experimenten ein unterschiedlicher zeitlicher Verlauf der VEGF<sub>165</sub>-Expression verglichen mit der Induktion von VEGF<sub>165</sub> durch UVB. Während bei der Induktion von VEGF<sub>165</sub> durch X/XO bzw. Paraquat ( $PQ^{2+}$ ) bereits 6 h nach der Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Reagenzien eine deutliche Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression zu verzeichnen war (Abb. 35 und 37), ist bei der UVB-induzierten Expression von VEGF<sub>165</sub> eine signifikante Erhöhung des VEGF<sub>165</sub>-Expression erst 8 h nach Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit UVB zu beobachten (s. Kapitel 5.3, Abb. 21). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> weniger über einen direkten Einfluß reaktiver Sauerstoffspezies verläuft, sondern daß eher indirekte Mechanismen wie die autokrine bzw. parakrine Beteiligung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren für die UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression verantwortlich sind.

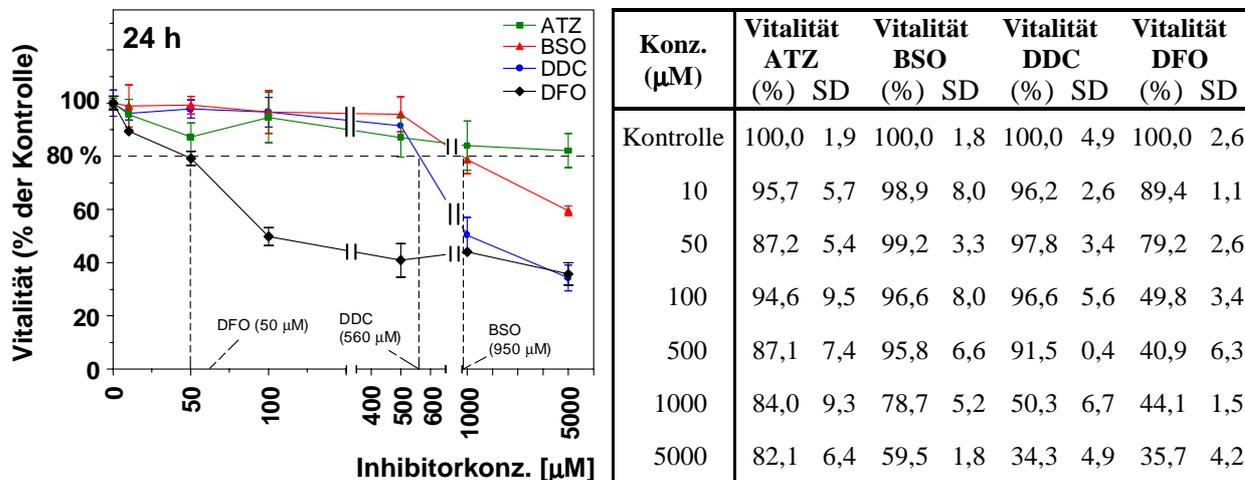
Aufschluß über die direkte Beteiligung von ROS bei der UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Synthese sollte die Verwendung spezifischer Inhibitoren von ROS-detoxifizierenden Enzymen mit intrazellulärer Anreicherung bestimmter reaktiver Sauerstoffspezies geben. Bei diesen Enzymen handelt es sich um ein Verteidigungssystem der Zelle gegen schädigende Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies. An der ROS-Entsorgung sind Enzyme wie Superoxiddismutase (SOD) (Brawn und Fridovich, 1980), Katalase (Halliwell, 1981) und Glutathionperoxidase (GSHPx) (Flohe, 1982) beteiligt. Zudem vermindern bzw. verhindern nicht-enzymatische Antioxidantien wie  $\alpha$ -Tocopherol und Carotinoide durch ROS und Lipidperoxidation bedingte Schädigungen von Membranen (Diplock, 1994).

Als Inhibitoren wurden Aminotriazol (ATZ), Buthioninsulfoximin (BSO), Diethyldithiocarbamat (DDC) und Desferrioxamin (DFO) verwendet. Diese Reagenzien verhindern auf unterschiedlicher Ebene den Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Enzyme Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase und durch die  $Fe^{3+}$ -abhängige Fenton-Reaktion (vgl. Abb. 33). Die Inhibitoren ATZ, BSO und DFO führen zu einer

Anreicherung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wobei ATZ direkt das Enzym Katalase hemmt (Inoue et al., 1992), während BSO das Enzym GSHPx indirekt durch eine Reduzierung der Substratzufuhr inhibiert (Tyrrell, 1991). DFO blockiert die Aufspaltung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Metallionen (Fenton-Reaktion), indem es als Chelator von zweiwertigen Metallionen fungiert (Singh und Hider, 1994) und diese der Fenton-Reaktion entzieht. Diethyldithiocarbamat (DDC) inhibiert die Cu, Zn Superoxiddismutase (SOD) und verhindert die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus Superoxidanionen und führt zur Anreicherung von  $\text{O}_2^{\cdot -}$  in der Zelle (Maitre et al., 1993).

Die Verwendung dieser Inhibitoren erlaubt es, bestimmte reaktive Sauerstoffspezies intrazellulär anzureichern und ermöglicht, indirekt auch der Frage nachzugehen, ob bei der UVB-Induktion von  $\text{VEGF}_{165}$  reaktive Sauerstoffspezies eine entscheidende Rolle spielen.

Vor der Behandlung von HaCaT-Zellen mit diesen Inhibitoren wurde deren Zytotoxizität nach einer 24stündigen Inkubation von HaCaT-Zellen in einer Vitalitätstestung (MTT-Test) ermittelt (Abb. 39).



**Abb. 39 Vitalität von HaCaT-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Inhibitoren ROS-detoxifizierender Enzyme**

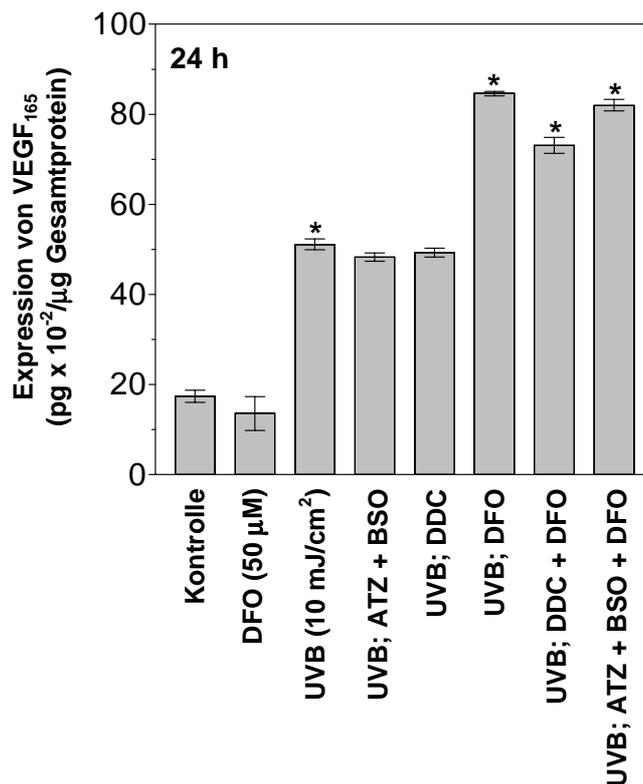
Nach subkonfluentem Wachstum von HaCaT-Zellkulturen und einer Inkubation für 18 h in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> wurden HaCaT-Zellen mit steigenden Konzentrationen der Inhibitoren ATZ, BSO, DDC und DFO behandelt. Nach 24 h wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der behandelten Zellen ist im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3).

Die Inhibitoren ATZ, BSO und DDC zeigten bis zu einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  keine Verminderung der Vitalität auf  $< 80\%$ . Die Inkubation von HaCaT-Zellen mit DFO ergab einen deutlichen Vitalitätsverlust der Zellen ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Der Grenzwert der DFO-Konzentration lag bei 50  $\mu\text{M}$  mit einer Vitalität der behandelten Zellen von 79,2 %.

Für das folgende Experiment wurden ATZ, BSO und DDC in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  verwendet, während DFO nur in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zum Einsatz kam. Da ATZ, BSO und DDC auch in Verbindung mit DFO zur Inkubation von HaCaT-Zellen eingesetzt werden sollten, wurde eine Konzentration dieser Substanzen von mehr als 100  $\mu\text{M}$  nicht in Betracht gezogen, obwohl die Verwendung der einzelnen Inhibitoren der Vitalität zufolge ohne weiteres eine Konzentration bis zu 500  $\mu\text{M}$  zuließe. Vor der Verwendung der Inhibitoren in Kombination mit einer UVB-Bestrahlung wurden die Substanzen auf eine mögliche VEGF<sub>165</sub>-Induktion untersucht, da zumindest von DFO eine VEGF<sub>165</sub>-Induktion in retinalen Epithelzellen und in C6 Glioblastomazellen berichtet wurde (Beerepoot et al., 1996). In der gewählten Konzentration war 24 h und 48 h nach einer Inkubation mit den Inhibitoren in HaCaT-Zellen keine Erhöhung der VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate im Vergleich unbehandelten Kontrollen zu beobachten.

Die Kombination von ATZ/ BSO oder ATZ/ BSO/ DFO sollte klären, ob durch eine Anreicherung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> verstärkt wird, indem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abbauende Systeme wie Katalase, GSHPx und Fenton-Reaktion in ihrer Funktion blockiert werden. Die Inkubation mit DDC führt zu einer intrazellulären Anhäufung von O<sub>2</sub><sup>-</sup>, da DDC die katalytische Wirkung der Cu, Zn Superoxiddismutase (SOD) inhibiert.

HaCaT-Zellen wurden nach subkonfluentem Wachstum für 18 h mit den einzelnen Inhibitoren oder den Inhibitorkombinationen in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert danach mit einer UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Anschließend folgte eine weitere 20stündige Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup>. Nach Austausch des Inhibitor-haltigen Mediums durch frisches FCS-freies Medium wurde nach 4 h die VEGF<sub>165</sub>-Synthese in einem ELISA ermittelt und auf den Proteingehalt der einzelnen Ansätze bezogen (Abb. 40).



**Abb. 40 Die UVB-bedingte Bildung von ROS spielt bei der Induktion von VEGF<sub>165</sub> eine untergeordnete Rolle**

HaCaT-Zellen wurden nach subkonfluentem Wachstum für 18 h mit Inhibitoren von ROS-detoxifizierenden Enzymen in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert und mit einer UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Danach folgte eine erneute Inkubation der Zellen für 20 h mit den Inhibitoren in DMEM<sup>+/+</sup>. Die VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate von 4 h wurde in einem ELISA ermittelt und auf den Proteingehalt der einzelnen Ansätze bezogen. Die Inhibitoren ATZ, BSO und DDC zeigten im Vergleich zur UVB-induzierten Kontrolle keinerlei Auswirkung auf UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression, während eine Kombination von UVB und DFO zu einem deutlichen Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Syntheserate führte. Die Daten sind in pg VEGF<sub>165</sub> x 10<sup>-2</sup>/μg Gesamtprotein (Mittelwert ± SD, n = 3) dargestellt und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P < 0,0001 verglichen mit der UVB-bestrahlten Kontrolle; ANOVA).

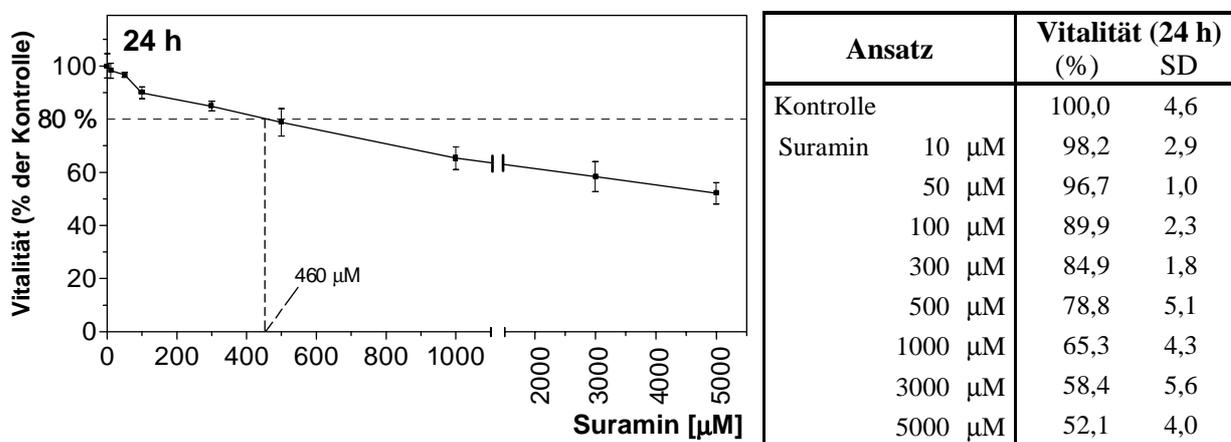
Die Inhibitoren ATZ, BSO und DDC veränderten die UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression nicht. Jedoch ließ sich bei den Ansätzen, die mit DFO oder DFO in Kombination mit weiteren Inhibitoren inkubiert wurden, nach der UVB-Bestrahlung eine deutliche Steigerung um das 4,2 - 4,9-fache der VEGF<sub>165</sub>-Expression im Vergleich zur nicht-bestrahlten Kontrolle und eine 1,5-fache Steigerung im Vergleich zur UVB-bestrahlten Kontrolle beobachten. Diese experimentellen Daten bestätigten die Hypothese, daß reaktive Sauerstoffspezies nicht direkt an der UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Expression beteiligt sind.

Zur weiteren Entschlüsselung der UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Expression wurden nun Experimente entwickelt, welche Aufschluß darüber geben sollten, ob autokrine bzw. parakrine Mechanismen an der UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> beteiligt sind.

## 5.10 Die UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> erfolgt über lösliche Faktoren

Zur Analyse alternativer Induktionsmechanismen von VEGF<sub>165</sub> durch UVB wurden konditionierte Überstände von UVB-bestrahlten HaCaT-Zellen auf sezernierte Faktoren hin untersucht, die autokrin eine VEGF-Induktion bei unbestrahlten Zellen vermitteln könnten (Abb. 42a). Parallel wurden die Auswirkungen von Suramin auf die UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> untersucht (Abb. 42b). Suramin besitzt ein breites Wirkungsspektrum. Suramin verhindert beispielsweise als unspezifischer Inhibitor die Bindung vieler Wachstumsfaktoren wie bFGF, EGF, TGF $\alpha$  und  $-\beta$  und PDGF an ihre Rezeptoren (Piva et al., 1996; Baghdiguian und Fantini, 1997) und inhibiert weiterhin die Signaltransduktion zwischen Rezeptoren der Zelloberfläche und membranassoziierten G-Proteinen (Baghdiguian und Fantini, 1997). Beide Versuchsansätze sollten Aufschluß darüber geben, ob sezernierte Zytokine oder Wachstumsfaktoren an der UVB-Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Synthese beteiligt sind.

Vor der Behandlung von HaCaT-Zellen mit Suramin wurde dessen Zytotoxizität in einer Vitalitätstestung (MTT-Test) ermittelt (Abb. 41).

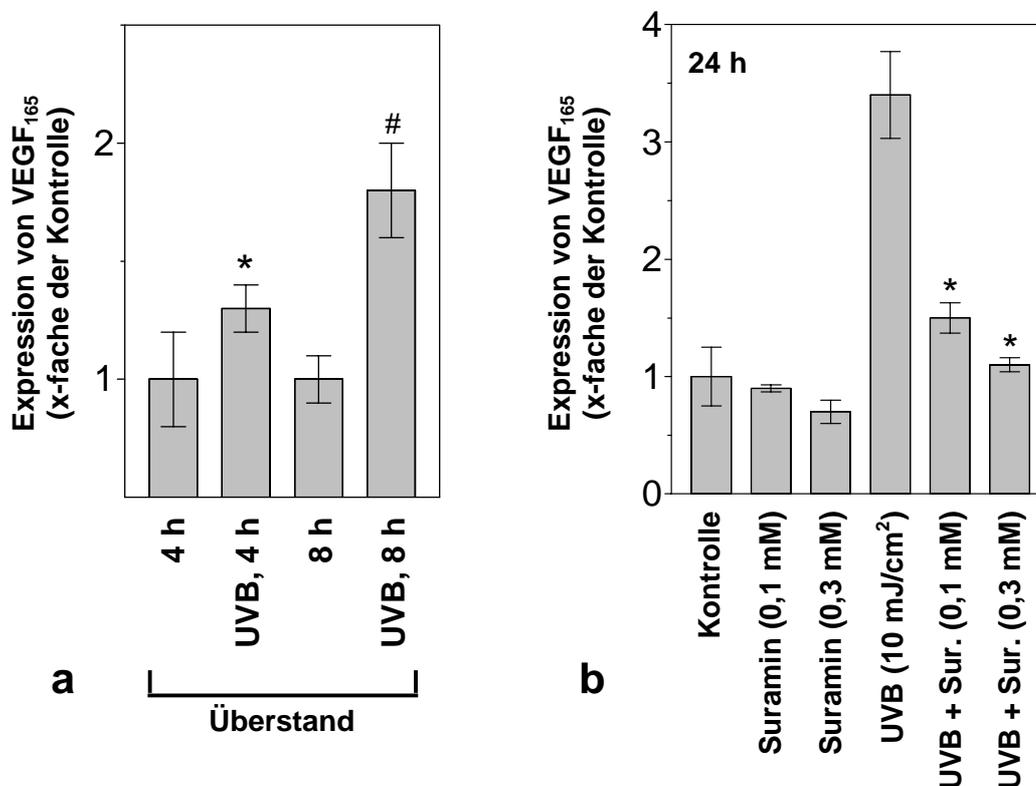


**Abb. 41 Vitalität von HaCaT-Zellen nach Inkubation mit Suramin**

Nach subkonfluentem Wachstum und einer Inkubation für 18 h in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> wurden HaCaT-Zellen mit steigenden Konzentrationen an Suramin behandelt. Nach 24 h wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der behandelten Zellen ist im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3).

Die Behandlung von HaCaT-Zellen mit Suramin im Konzentrationsbereich von 10 - 5000  $\mu$ M ergab, daß ab einer Konzentration von 500  $\mu$ M die Vitalität der Zellen unter 80 % der

Vitalität unbehandelter Kontrollzellen lag (Abb. 41). Demzufolge wurden HaCaT-Zellen mit steigenden Konzentrationen von Suramin bis 300  $\mu\text{M}$  behandelt.



**Abb. 42 An der UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> sind lösliche Faktoren beteiligt**

(a) Der Einfluß sezernierter Faktoren bei der UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> wurde durch den Transfer von Zellkulturüberständen bestrahlter und unbestrahlter HaCaT-Zellen auf ruhende, unbehandelte HaCaT-Zellen untersucht. Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden für 18 h in serumfreien DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert und dann mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> Gesamt-UVB bestrahlt. Vier und 8 h nach der Bestrahlung wurden die Überstände auf unbehandelte HaCaT-Zellen transferiert, die ebenfalls für 18 h mit FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> inkubiert worden sind. Nach 20 h wurden die Überstände von den Zellen genommen und durch FCS-freies DMEM<sup>+/+</sup> ersetzt. Die VEGF<sub>165</sub>-Synthese wurde 4 h später gemessen und auf den Proteingehalt der Ansätze bezogen. Die Daten sind als x-fache Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3) dargestellt und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P = 0,042 und #P = 0,0031 bezogen auf Kontrollen nach Inkubation mit Überständen nicht-bestrahlter HaCaT-Zellen; Student's *t*-Test). (b) Parallel dazu wurden HaCaT-Zellen nach einer 18stündigen Inkubation in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> mit 0,1 und 0,3 mM Suramin für 30 min inkubiert, anschließend mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB bestrahlt und für weitere 20 h mit Suramin-haltigem Medium inkubiert. Vier Stunden nach der Zugabe von frischem DMEM<sup>+/+</sup> wurde die VEGF<sub>165</sub>-Konzentration der Zellkulturüberständen bestimmt und auf den Proteingehalt der einzelnen Ansätze bezogen. Die Daten sind x-fache Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3) dargestellt und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P < 0,0001 verglichen mit der UVB-bestrahlten Kontrolle; ANOVA).

Nach subkonfluentem Wachstum und einer 18stündigen Inkubation in serumfreien DMEM<sup>+/+</sup> wurden HaCaT-Zellen mit einer UVB-Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurde frisches FCS-freies Medium auf die Zellen gegeben. Vier bzw. 8 h später wurde das

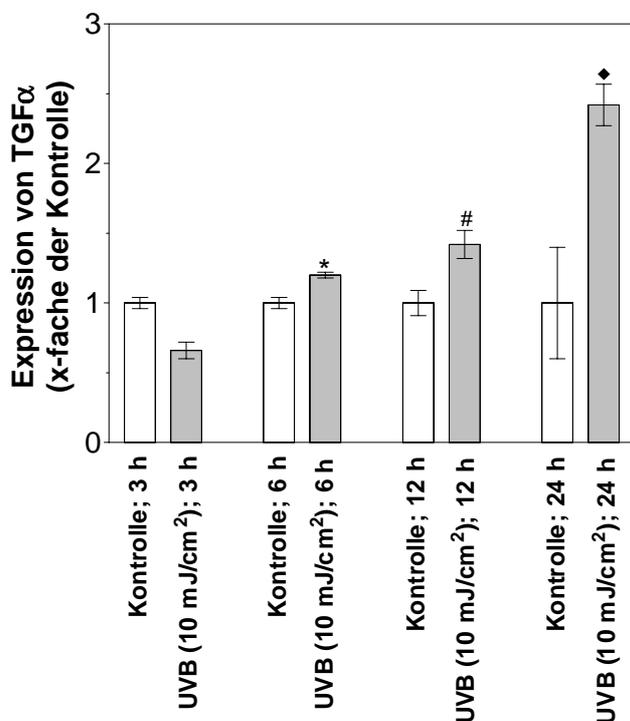
konditionierte Medium der UVB-bestrahlten Zellen und unbestrahlter Kontrollzellen auf unbestrahlte subkonfluente HaCaT-Zellkulturen transferiert, die zuvor für 18 h in DMEM<sup>+/+</sup> ohne FCS inkubiert worden sind. Nach 20 h wurde das transferierte Medium durch frisches DMEM<sup>+/+</sup> ohne FCS ersetzt. Vier h später wurde die VEGF<sub>165</sub>-Expression der HaCaT-Zellen bestimmt und auf den Proteingehalt der einzelnen Ansätze bezogen.

Vierundzwanzig h nach der Inkubation unbestrahlter HaCaT-Zellen mit den Zellkulturüberständen UVB-bestrahlter HaCaT-Zellen war im Vergleich zu Zellen, die mit den Überständen unbestrahlter Zellen inkubiert worden sind, eine deutliche Induktion von VEGF<sub>165</sub> zu beobachten (Abb. 42a). Der Transfer von Zellkulturüberständen bestrahlter Zellen, die nach 4 h von den HaCaT-Zellen genommen wurden, führten nach 24 h zu einer 1,3-fachen Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Synthese in unbestrahlten Kulturen verglichen mit Überständen von unbestrahlten HaCaT-Zellen. Überstände UVB-bestrahlter Zellen, die 8 h nach der Bestrahlung auf unbehandelte HaCaT-Zellen transferiert wurden, induzierten die VEGF<sub>165</sub>-Expression um das 1,8-fache.

Nach der UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> führten Suramin-konzentrationen von 0,1 bzw. 0,3 mM zu einer verminderten VEGF<sub>165</sub>-Synthese, die nach Inkubation mit 0,3 mM Suramin mit der VEGF<sub>165</sub>-Synthese unbestrahlter Kontrollen vergleichbar war (Abb. 42b). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß nach UVB-Bestrahlung Zytokine oder Wachstumsfaktoren von den HaCaT-Zellen sezerniert werden, welche die UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> autokrin über Rezeptoren vermitteln.

### 5.11 TGF $\alpha$ vermittelt autokrin die Induktion von VEGF<sub>165</sub> nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen und Keratinozyten

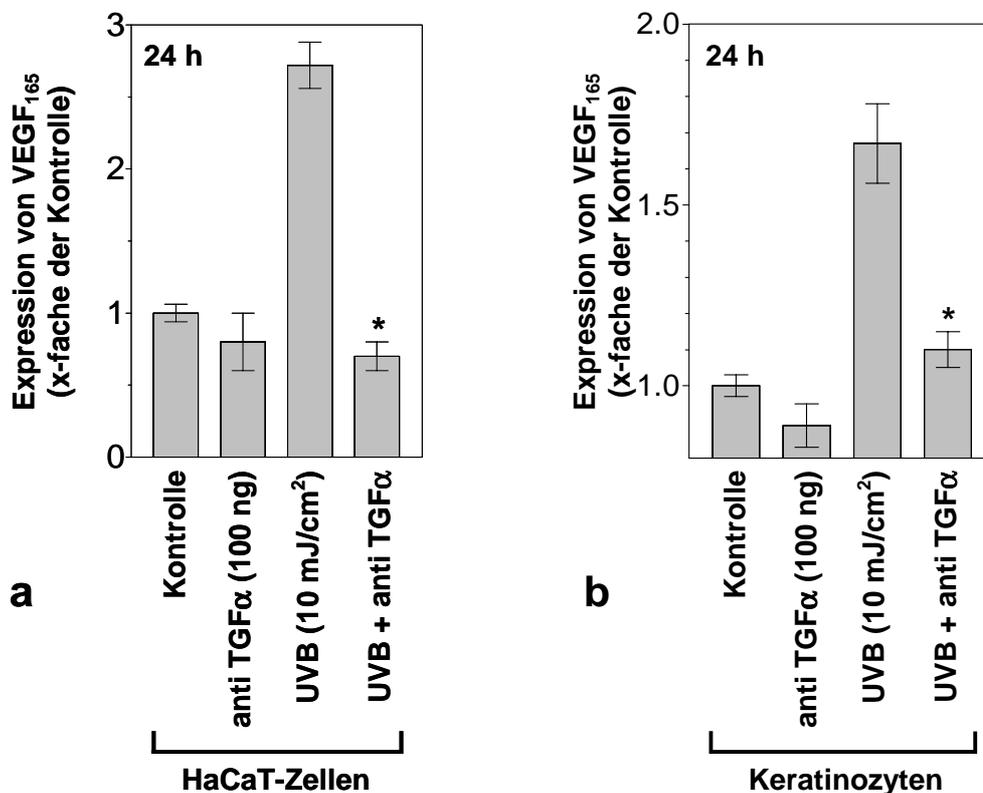
In den folgenden Experimenten sollten diejenigen Faktoren identifiziert werden, deren Synthese einerseits durch UVB-Strahlung in HaCaT-Zellen bzw. Keratinozyten induziert wird und die andererseits die UVB-induzierte Wirkung auf die VEGF<sub>165</sub>-Synthese vermitteln. In der Literatur sind bisher einige Zytokine beschrieben worden, die beide Bedingungen erfüllen. In früheren Arbeiten wurde über die Induktion von VEGF durch TNF $\alpha$  und TGF $\alpha$  berichtet, welche ihren induktiven Effekt über die SP-1/AP-2-Gruppe im VEGF-Promotor ausüben (Ryuto et al., 1996; Gille et al., 1997). Von anderen Arbeitsgruppen wurde die VEGF-induzierende Wirkung des epidermalen Wachstumsfaktors EGF beschrieben (Detmar et al., 1995; Frank et al., 1995). Auch mit hochsensitiven ELISA-Systemen gelang es nicht, eine Erhöhung der EGF- bzw. TNF $\alpha$ -Synthese nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen und Keratinozyten in Zelllysaten und Zellkulturüberständen nachzuweisen. Dagegen wurde ein zeitabhängiger Anstieg von TGF $\alpha$  nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit einer Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> beobachtet. Eine signifikante Induktion von TGF $\alpha$ -Protein war 6 h nach UVB-Bestrahlung zu beobachten (Abb. 43).



**Abb. 43 UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen führt zu einer zeitabhängigen Induktion von TGF $\alpha$**

Die UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> führte zur zeitabhängigen Induktion von TGF $\alpha$ -Protein. Bereits 6 h nach der UVB-Bestrahlung ist ein signifikanter 1,2-facher Anstieg und nach 24 h ein 2,4-facher Anstieg von TGF $\alpha$ -Protein zu beobachten. Die Bestimmung der TGF $\alpha$ -Konzentration erfolgte mittels eines spezifischen ELISA. Konditioniertes Medium von nicht-bestrahlten Zellen diente als Kontrolle. Die TGF $\alpha$ -Synthese ist als die x-fache Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3) dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P = 0,0015; #P = 0,0057; ♦P = 0,0045 bezogen auf die unbehandelten Kontrollen; Student's *t*-Test).

In einem weiterführenden Experiment konnte durch die Verwendung neutralisierender Antikörper gegen TGF $\alpha$  in einer Konzentration von 100  $\mu$ g/ml die UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Synthese bis auf die konstitutive Expression der unbehandelten Zellen vermindert werden (Abb. 44).



**Abb. 44 Die UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression wird autokrin in HaCaT-Zellen und sekundären Keratinozyten über TGF $\alpha$  vermittelt**

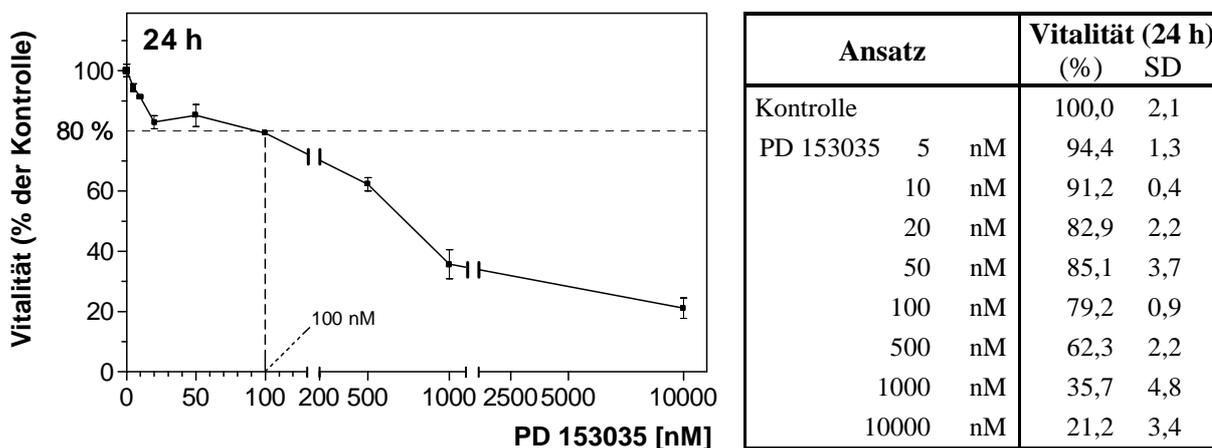
Neutralisierenden Antikörper gegen TGF $\alpha$  führen in einer Konzentration von 100 ng/ml sowohl in HaCaT-Zellen (a) als auch in sekundären Keratinozyten (b) zu einer fast vollständigen Unterdrückung der UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Expression bis auf das Basalniveau der unbestrahlten Kontrollen. Die VEGF<sub>165</sub>-Konzentration wurde mittels eines für TGF $\alpha$  spezifischen ELISA bestimmt. Die Daten sind als x-fache Induktion der unbehandelten Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3) dargestellt und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (a, \*P < 0,0001; b, \*P < 0,0012 verglichen mit der UVB-bestrahlten Kontrolle ohne Verwendung von Antikörpern; Student's *t*-Test).

Die Daten dieser beiden Versuchsansätze zeigen, daß die UVB-induzierte Synthese von VEGF<sub>165</sub> sowohl in HaCaT-Zellen als auch in sekundären Keratinozyten in einer autokrinen Schleife über UVB-induziertes TGF $\alpha$  verläuft, welches für die UVB-bedingte Induktion von VEGF<sub>165</sub> verantwortlich ist.

## 5.12 Die UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> wird durch Phosphorylierung des EGF-Rezeptors initiiert

Um die molekularen Mechanismen näher zu charakterisieren, die zur UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> führen, wurde der Frage nachgegangen, ob der Anstieg der TGF $\alpha$ -Synthese mit nachfolgender VEGF<sub>165</sub>-Expression die Folge einer UVB-bedingten Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ist. Eine Aktivierung des EGF-Rezeptors führt zur Freisetzung von TGF $\alpha$  (Coffey et al., 1987; Barnard et al., 1994), das seinerseits zu einer Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Synthese führt (Detmar et al., 1995). Desweiteren wurde von Rosette und Karin (1996) eine ligandenunabhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors durch UVB-Bestrahlung beschrieben. Um zu untersuchen, ob die Induktion von TGF $\alpha$  und VEGF<sub>165</sub> durch eine UVB-induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors vermittelt wird, wurden HaCaT-Zellen vor der Bestrahlung mit UVB mit nicht-toxischen Konzentrationen eines spezifischen Inhibitors der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase-Phosphorylierung, 4-[(bromophenyl) amino]-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035) inkubiert (Fry et al., 1994; Bridges et al., 1996).

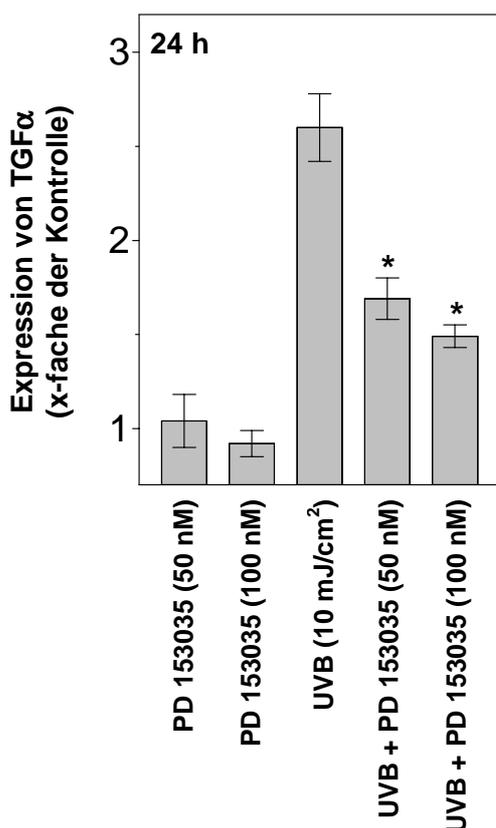
Zuvor wurde die Zytotoxizität von PD 153035 für HaCaT-Zellen in einer Vitalitätstestung (MTT-Test) ermittelt (Abb. 45).



**Abb. 45 Vitalität von HaCaT-Zellen nach Inkubation mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035**

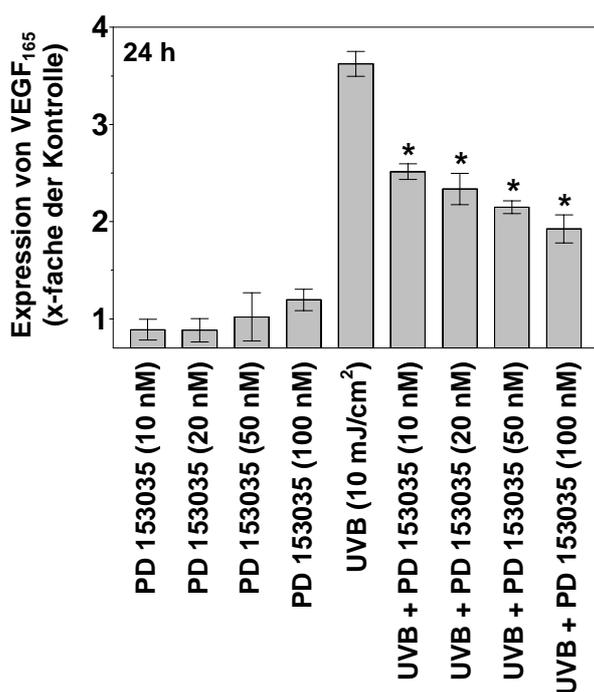
Nach subkonfluentem Wachstum und einer Inkubation für 18 h in FCS-freiem DMEM<sup>+/+</sup> wurden HaCaT-Zellen mit steigenden Konzentrationen des Tyrosinkinase-Inhibitors PD 153035 behandelt. Nach 24 h wurde die Vitalität der Zellen in einem MTT-Test bestimmt. Die Vitalität der behandelten Zellen ist im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollzellen in Prozent dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3).

Der Tyrosinkinase-Inhibitor wurde in Konzentrationen bis 100 nM verwendet, da höhere Konzentrationen nach 24 h eine zunehmende Zytotoxizität aufwiesen. Vierundzwanzig Stunden nach der UVB-Bestrahlung wurde die TGF $\alpha$ - (Abb. 46) und VEGF<sub>165</sub>-Proteinkonzentration (Abb. 47) in den Überständen von HaCaT-Zellen mittels ELISA bestimmt und auf den gesamten Proteingehalt der einzelnen Ansätze bezogen.



**Abb. 46 Die UVB-induzierte TGF $\alpha$ -Expression wird durch den EGF-R-spezifischen Inhibitor PD 153035 gehemmt**

Subkonfluente HaCaT-Zellkulturen wurden nach 18stündiger Inkubation in serumfreiem DMEM<sup>+/+</sup> für 2 h mit dem EGF-R-spezifischen Inhibitor der Tyrosinkinase-Phosphorylierung PD 153035 inkubiert. Nach UVB-Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> wurde PD 153035-haltiges DMEM<sup>+/+</sup> für 24 h auf die Zellen gegeben. Abschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung von TGF $\alpha$  und des Gesamtproteins der verschiedenen Ansätze. Die TGF $\alpha$ -Expression ist als die x-fache Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3) dargestellt und wurde in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P < 0,0001 verglichen mit der UVB-bestrahlten Kontrolle ohne Verwendung von PD 153035; ANOVA).

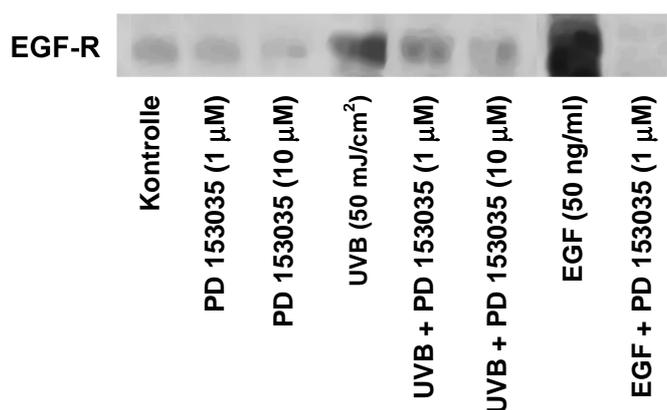


**Abb. 47 Die Verwendung des EGF-R-spezifischen Inhibitor PD 153035 vermindert die UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression**

Inkubation von HaCaT-Zellen mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035 führte 24 h nach UVB Bestrahlung der Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> zu einer Verminderung der VEGF<sub>165</sub>-Expression. Die Daten sind als die x-fache VEGF<sub>165</sub>-Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3) dargestellt und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P < 0,0001 verglichen mit der UVB-bestrahlten Kontrolle ohne Verwendung von PD 153035; ANOVA).

Vierundzwanzig h nach UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit  $10 \text{ mJ/cm}^2$  führte der EGF-R-spezifische Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035 zu einer signifikant verminderten TGF $\alpha$ - und VEGF $_{165}$ -Expression.

Eine UVB-induzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors konnte nach einer Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit  $50 \text{ mJ/cm}^2$  bereits 10 min nach der Bestrahlung nachgewiesen werden (Abb. 48).

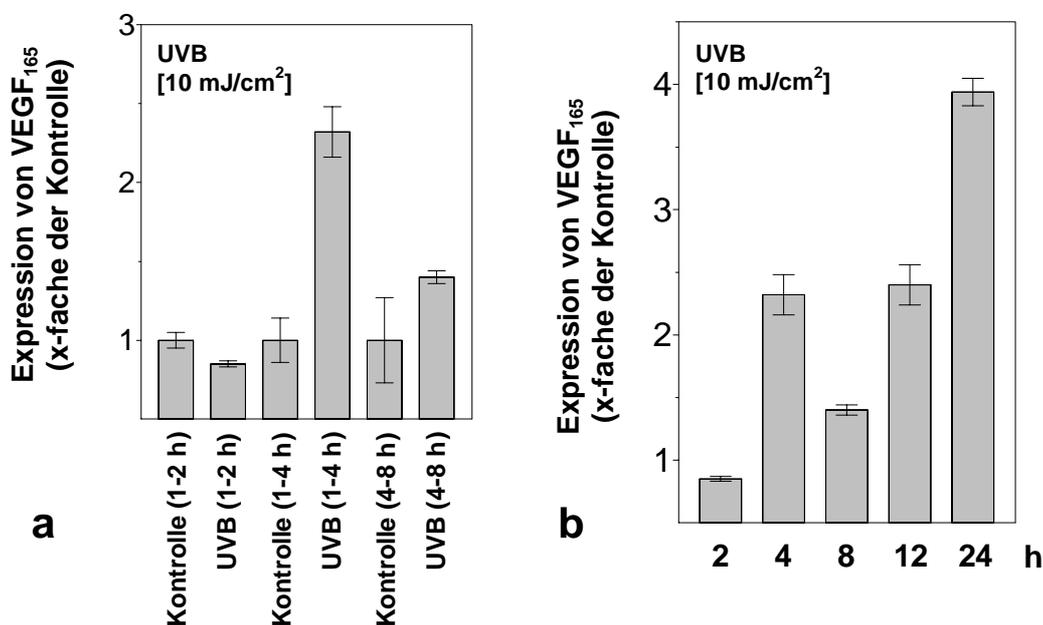


**Abb. 48 Inkubation von HaCaT-Zellen mit dem EGF-R-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035 führt zu einer Verminderung der UVB-induzierten EGF-R-Phosphorylierung**

Die UVB-induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ließ sich deutlich durch den Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035 in den angegebenen Konzentrationen vermindern. Die Stimulierung von HaCaT-Zellen mit 50 ng/ml EGF diente mit und ohne PD 153035 als Kontrolle.

Die Inkubation von HaCaT-Zellen mit PD 153035 vor und nach der Bestrahlung mit UVB führte zu einer deutlichen Verminderung der UVB-induzierten Phosphorylierung des EGF-Rezeptors und korrelierte mit der Verminderung der UVB-induzierten TGF $\alpha$ - und VEGF $_{165}$ -Expression nach Behandlung mit PD 153035. Als Kontrolle wurden HaCaT-Zellen mit 50 ng/ml EGF in der An- und Abwesenheit des Tyrosinkinase-Inhibitors stimuliert und der Phosphorylierungszustand des EGF-Rezeptors untersucht. Die Verwendung von PD 153035 führte zur Aufhebung der durch EGF stimulierten Rezeptorphosphorylierung (Abb. 48).

Eine UVB-induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors lässt sich, wie oben erwähnt, bereits 10 min nach einer UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen nachweisen. Diese UVB-spezifische Rezeptor-Aktivierung bewirkt nach 6 h auf Proteinebene eine Induktion von TGF $\alpha$  (Abb. 43) und ab 8 h nach UVB-Bestrahlung eine TGF $\alpha$ -abhängige Induktion von VEGF<sub>165</sub> (Abb. 21, 44). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors sollte jedoch auch eine unmittelbare Auswirkungen auf die Expression von VEGF<sub>165</sub> haben. Die bisherigen Experimente haben sich auf späte Zeitpunkte der VEGF-Induktion nach UVB-Bestrahlung konzentriert. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die UVB-induzierte EGF-R-Aktivierung zu einer frühen VEGF<sub>165</sub>-Expression führt.



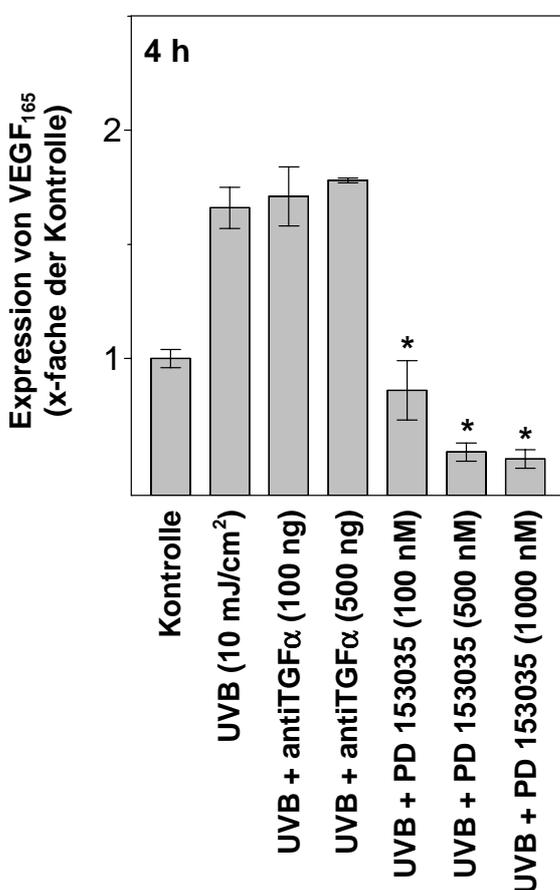
**Abb. 49 UVB-Bestrahlung führt zu einer biphasischen Expression von VEGF<sub>165</sub> in HaCaT-Zellen**

Nach UVB-Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> weisen HaCaT-Zellen einen biphasischen Verlauf der VEGF<sub>165</sub>-Expression auf mit einer frühen 2,3-fachen Induktion nach 4 h (a, b) und einer späten 4-fachen VEGF<sub>165</sub>-Induktion 24 h nach UVB (b). Die Daten sind als die x-fache VEGF<sub>165</sub>-Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3) dargestellt und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt.

Nach 2 bis 4 h führte die UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> zu einer 2,3-fachen Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression (Abb. 49a, b). Diese Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Synthese ist 8 h nach UVB-Bestrahlung rückläufig und weist nach 12 h einen zweiten Anstieg mit einer 4-fachen VEGF<sub>165</sub>-Induktion nach 24 h auf (Abb. 49b).

Bei einer direkten Wirkung der UVB-induzierten EGF-R-Aktivierung auf die VEGF<sub>165</sub>-Expression sollte der Wachstumsfaktor TGF $\alpha$  keinen Einfluß auf die frühe VEGF<sub>165</sub>-Synthese haben. Die frühe VEGF<sub>165</sub>-Expression sollte dennoch durch den EGF-R-spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035 vermindert werden.

Zur Untersuchung dieser Frage wurden HaCaT-Zellen 2 h vor einer UVB-Exposition entweder mit verschiedenen Konzentrationen eines neutralisierenden Antikörpers gegen TGF $\alpha$  oder mit verschiedenen Konzentrationen des Tyrosinkinase-Inhibitors PD 153035 inkubiert.



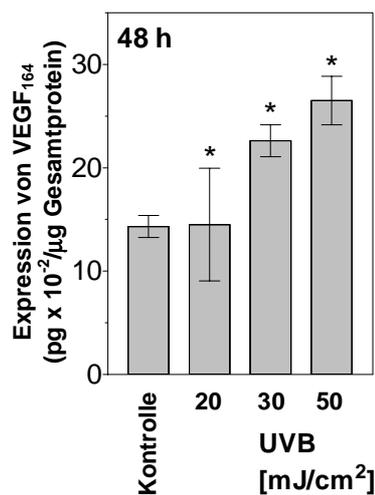
**Abb. 50 Die frühe UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression wird TGF $\alpha$ -unabhängig durch die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors vermittelt**

Zwei h vor einer UVB-Bestrahlung mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> wurden HaCaT-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen eines neutralisierenden Antikörpers gegen TGF $\alpha$  oder mit verschiedenen Konzentrationen des Tyrosinkinase-Inhibitors PD 153035 inkubiert. Vier h nach der Bestrahlung zeigten die mit 100 - 1000 nM PD 153035 inkubierten HaCaT-Zellen im Gegensatz zu HaCaT-Zellen, die mit 100 bzw. 500 ng/ml anti-TGF $\alpha$ -Antikörper behandelt wurden, eine unter das Kontrollniveau unbestrahlter Zellen supprimierte VEGF<sub>165</sub>-Expression. Die Daten sind als die x-fache VEGF<sub>165</sub>-Induktion der unbehandelten Kontrollen (Mittelwert  $\pm$  SD, n = 3) dargestellt und wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P < 0,0001 verglichen mit der UVB-bestrahlten Kontrolle ohne Verwendung von PD 153035; ANOVA).

Im Gegensatz zu PD 153035 hatten neutralisierende Antikörper gegen TGF $\alpha$  nach UVB-Bestrahlung keinen Einfluß auf die frühe VEGF<sub>165</sub>-Expression. (Abb. 50). Durch die Inkubation der Zellen mit PD 153035 in Konzentrationen von 100 bis 1000 nM ließ sich die VEGF<sub>165</sub>-Expression 4 h nach der UVB-Bestrahlung vollständig und bei 500 bis 1000 nM auf einen Wert unterhalb der VEGF<sub>165</sub>-Expression unbestrahlter Zellen vermindern.

### 5.13 Die UVB-induzierte Synthese von VEGF ist auch *in vivo* für die Angiogenese der Haut von zentraler Bedeutung

In weitere experimentellen Ansätzen sollte geprüft werden, ob die *in vitro* beobachtete UVB-abhängige Expression von VEGF in epidermalen Zellen auch *in vivo* von Bedeutung ist und die Angiogenese steigern kann.



**Abb. 51 UVB-Strahlung induziert VEGF<sub>164</sub> in muriner Haut**

Nach UVB-Bestrahlung von haarlosen Skh-1 Mäusen mit 20 bis 50 mJ/cm<sup>2</sup> ließ sich 48 h nach der Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der VEGF<sub>164</sub>-Synthese in Lysaten der Mäuseepidermis nachweisen. Die Daten sind in pg VEGF<sub>164</sub> x 10<sup>-2</sup>/µg Gesamtprotein (Mittelwert ± SD, n = 3) dargestellt und wurden in jeweils drei voneinander unabhängigen Experimenten ermittelt (\*P = 0,0029 verglichen mit unbestrahlten Kontrollmäusen; ANOVA).

Da eine wiederholte Bestrahlung mit hohen UVB-Dosen aus ethischen Gründen nicht an Menschen durchgeführt werden kann, wurden für diese Experimente haarlose Skh-1 Mäuse identischen Geschlecht und Alters verwendet. Die Maus exprimiert wie auch der Mensch mehrere VEGF-Isoformen, die lediglich um eine Aminosäure kürzer sind als die entsprechenden Isoformen des Menschen. Achtundvierzig Stunden nach UVB-Bestrahlung mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> wurde ein fast 2-facher Konzentrationsanstieg der VEGF<sub>164</sub>-Spleißvariante in der Mauhaut gemessen (Abb. 51).

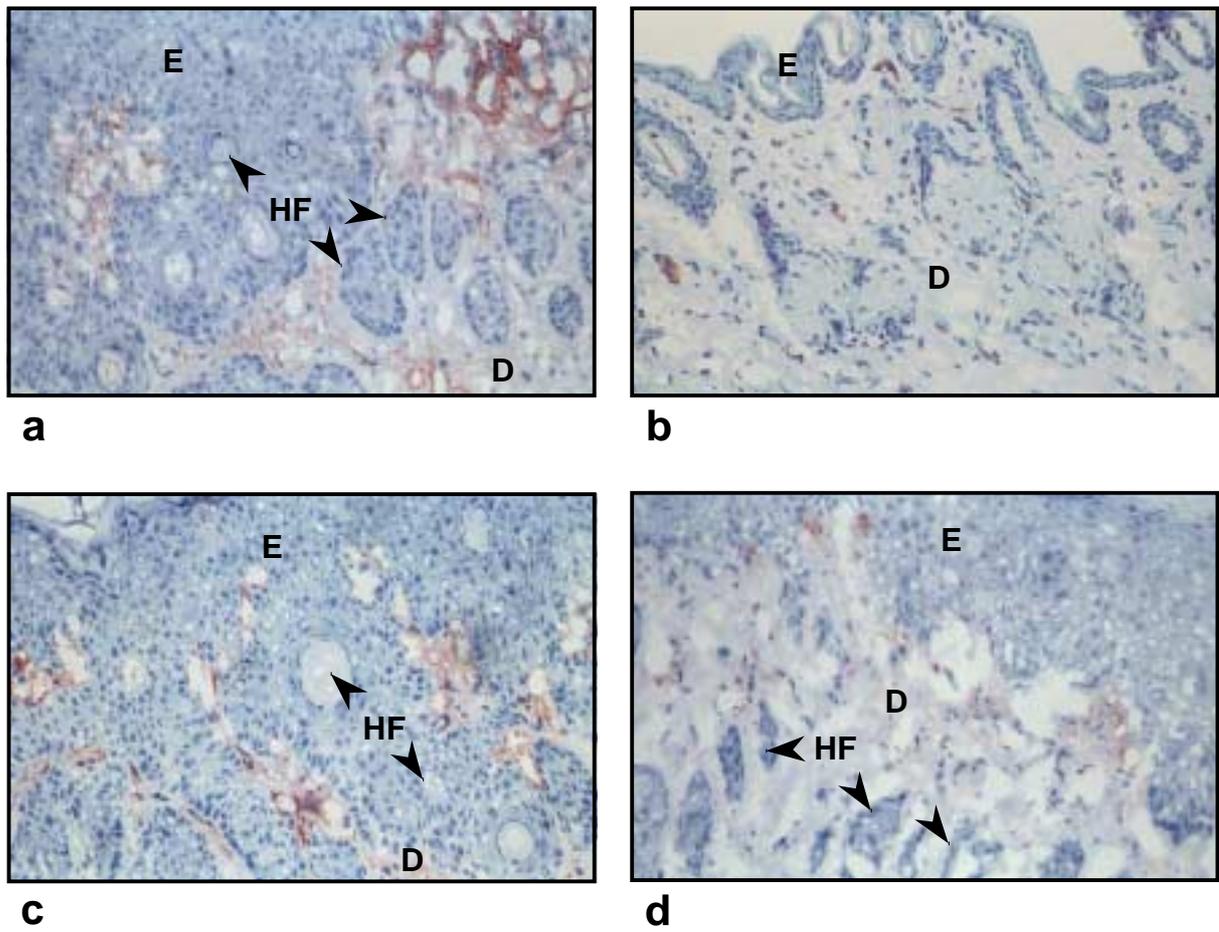
Um die kausale Bedeutung von VEGF<sub>164</sub> bei der UVB-induzierten Neoangiogenese zu bestimmen, wurden Skh-1 Mäuse an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von 24 h mit einer UVB-Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Den Mäusen wurden 24 h und 30 min vor der ersten UVB-Bestrahlung und zusätzlich 30 min vor der dritten UVB-Bestrahlung 100 µg eines in PBS gelösten neutralisierenden, monoklonalen anti-hVEGF-Antikörpers (mAb #577B11, Texas Biotechnology, Houston, TX, USA) intraperitoneal injiziert. Dieser Antikörper neutralisiert murines VEGF mit ähnlicher Wirksamkeit wie humanes VEGF (Seghezzi et al., 1998). Zur Kontrolle wurde Skh-1-Mäusen eine nicht-immunspezifische (n.i.) Isotypenkontrolle in PBS und PBS alleine intraperitoneal zum selben Zeitpunkt injiziert

Die immunohistochemische Untersuchung der Mäuse erfolgte eine Woche nach der ersten Bestrahlung. Insgesamt wurden 4 Gruppen von Mäusen gleichen Geschlechts und Alters mit je 4 Tieren pro Gruppe untersucht:

Gruppe	UVB-Bestrahlung	Injektion (i.p.)
A	unbestrahlt	PBS
B	unbestrahlt	n.i. IgG (100 µg)
C	50 mJ/cm <sup>2</sup>	n.i. IgG (100 µg)
D	50 mJ/cm <sup>2</sup>	anti-hVEGF (100 µg)

Unbestrahlte, jedoch mit PBS injizierte Mäuse dienten bei diesem Versuch als Negativkontrolle. Nach Präparation der Rückenhaut wurden 6 mm (Ø) Biopsien entnommen, mit 0,4 % Paraformaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Schnitte dieser Biopsien wurden in immunhistologischen Untersuchungen (s. Kapitel 4.4.3) hinsichtlich des Faktors VIII RAG, einem auf Endothelzellen von Blutgefäßen exprimierten Antigen, untersucht.

Im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollmäusen (Abb. 52b) mit nur geringer Anzahl Faktor VIII RAG-positiver Blutgefäße in der Dermis, führten wiederholte UVB-Bestrahlungen der haarlosen Mäuse mit 50 mJ/cm<sup>2</sup> bei intraperitonealer Injektion von PBS zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl Faktor VIII RAG-positiver dermaler Blutgefäße (Abb. 52a). Eine intraperitoneale Injektion neutralisierender Antikörper gegen VEGF führte im Gegensatz zur Injektion nicht-immunspezifischer Antikörper (n. i. IgG) (Abb. 54c) zu einer signifikanten Verminderung der UVB-induzierten Neoangiogenese (Abb. 52d). Zusätzlich führten wiederholte UVB-Bestrahlungen, wie erwartet, zu einer deutlichen Verdickung der Mausepidermis.



**Abb. 52 Einfluß von VEGF-neutralisierenden Antikörpern auf die UVB-induzierte Angiogenese *in vivo***

Repetitive UVB-Bestrahlung von Skh-1 Mäusen führte bei intraperitonealer Injektion von PBS neben einer epidermalen Verdickung der bestrahlten Haut zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl Faktor VIII RAG-positiver Blutgefäße (braune Färbung) (a), verglichen mit der Blutgefäßanzahl PBS-injektierter unbehandelter Kontrollmäuse (b). Eine Injektion nicht-immunspezifischer Antikörper (n. i. IgG) vor und während der UVB-Bestrahlung beeinflusste die UVB-abhängige Zunahme an Blutgefäßen nicht (c), während durch die Injektion neutralisierender Antikörper gegen VEGF eine deutliche Abnahme der Anzahl von Blutgefäßen bei UVB-bestrahlten Mäusen zu beobachten war (d). E, Epidermis; D, Dermis; HF, Haarfollikel (▲).

Diese immunohistologischen Beobachtungen (Abb. 52) wurden ebenfalls durch eine mikroskopische Auszählung Faktor VIII RAG-positiver Blutgefäße in der Haut mehrfach UVB-bestrahlter und unbestrahlter Mäuse bestätigt (s. Tabelle 6).

	<b>Median der Blutgefäße</b>
Unbestrahlt (PBS)	8
Unbestrahlt (n.i. IgG)	10
UVB-bestrahlt (n.i. IgG)	49
UVB-bestrahlt (anti-hVEGF)	21

]\*  
 ]#

**Tabelle 6 VEGF vermittelt die UVB-abhängige Neoangiogenese *in vivo***

Haarlose Skh-1 Mäuse (n = 4) wurden mit einer UVB-Dosis von 50 mJ/cm<sup>2</sup> repetitiv bestrahlt und intraperitoneal mit PBS, nicht-immunspezifischem IgG (n.i. IgG) oder mit neutralisierenden Antikörpern gegen VEGF vor und während der Bestrahlung injiziert. Unbestrahlte und PBS-injizierte Mäuse dienten als Negativkontrolle. Blutgefäße wurden mikroskopisch unter 160-facher Vergrößerung im Bereich von 4 Sichtfeldern gezählt. Die Zahlenwerte stellen den Median der gezählten Blutgefäße dar. Die Daten wurden durch den U-Test nach Mann und Whitney analysiert (\*, #P=0,028).

Zusammenfassend läßt sich belegen, daß VEGF im Mausmodell kausal zumindest teilweise an der UVB-induzierten Angiogenese *in vivo* beteiligt ist.

## 6. Diskussion

Die durch Ozondepletion bedingte Zunahme der UVB-Strahlung (280 bis 320 nm) auf der Erdoberfläche (Crutzen, 1992; Lloyd, 1993) stellt nicht nur eine massive Bedrohung für die globalen Ökosysteme, sondern auch eine direkte Bedrohung für die Gesundheit des Menschen dar (UNEP, 1989, 1991; SCOPE, 1992; European Commission, 1995; Slaper et al., 1996). Zielorgane der UVB-Strahlung sind beim Menschen Haut und Augen, wobei die Haut mit bis zu 2 m<sup>2</sup> Fläche das größte Organ des Menschen ist. Ihre Funktion umfaßt die Abgrenzung und den Schutz vor physikalischen (z.B. Hitze, Kälte), chemischen (z.B. Säuren und Laugen) und biologischen (z.B. Bakterien und Viren) Umwelteinflüssen. Durch zunehmende, chronische UVB-Bestrahlung ist die Haut in der Integrität ihrer Struktur und in ihrer Funktion durch die Anhäufung von UVB-bedingten Langzeitschäden gefährdet. Im Mittelpunkt der UVB-bedingten Schäden stehen hierbei eine durch UV-induzierte vorzeitige Hautalterung und ganz besonders die Photokarzinogenese (Scharffetter-Kochanek et al., 1997). Neben der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (Darr und Fridovich, 1994; Jurkiewicz und Buettner, 1994) und nachfolgender Ausbildung potentiell mutagener DNA-Schäden in den Zellen der Haut (Halliwell und Aruoma, 1991; Cerutti, 1994; Scharffetter-Kochanek et al., 1997) ist die UVB-Bestrahlung an einer veränderten Expression vieler Gene (Stein et al., 1989; Hibi et al., 1993; Keyse, 1993; Brauchle et al., 1996) beteiligt, die die Signaltransduktion der Zellzykluskontrolle, von Bindegewebsabbau und Angiogenese im Rahmen der Tumorprogression und der Hautalterung vermitteln.

Der UVB-Strahlung wurde eine kausale Bedeutung bei der vermehrten Entwicklung von erweiterten Gefäßen (Teleangiektasien) und von stark vaskularisierten nicht-melanozytären Hautkrebsarten, wie dem Basalzellkarzinom (Basaliom) und dem Plattenepithelkarzinom (spinozelluläres Karzinom) zugeschrieben (Soffen und Blum, 1961; Bielenberg et al., 1998). Die zugrundeliegenden molekularen Regulationsmechanismen dieser Prozesse sind bisher nur unzureichend bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob und über welche Mechanismen UVB an der Induktion von angiogenetisch wirksamen Faktoren in initiierten Tumorzellen und auch in normaler Haut beteiligt ist.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand die Wirkung von UVB-Bestrahlung auf die Regulation des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF), einem multifunktionalen Zytokin mit Funktionen bei Vaskularisation und Angiogenese. Im Unterschied zur Vaskularisation als Neubildung von Gefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen oder

Angioblasten versteht man unter der Angiogenese ein Abzweigen von neu gebildeten Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen (Risau und Flamme, 1995). Die Angiogenese ist ein komplexer, vielschichtiger Prozeß und beginnt mit der Extravasation von Plasmaproteinen, der Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) einer Migration und Proliferation von Endothelzellen und führt zur Ausbildung neuer Kapillaren. Eine ‚Neoangiogenese‘ wird im adulten Organismus bei bestimmten physiologischen Prozessen beobachtet, wie beispielsweise während des weiblichen Reproduktionszyklus, der Schwangerschaft oder der Wundheilung. Eine deregulierte, nicht-physiologische Angiogenese wird hingegen mit der Pathogenese verschiedener Krankheiten wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis, Retinopathien und dem gutartigen und bösartigen Tumorwachstum in Verbindung gebracht (Folkman, 1995). Bei der Vaskularisation in der Embryonalentwicklung und bei der physiologischen und pathophysiologischen Angiogenese nimmt VEGF zusammen mit seinen Rezeptoren eine zentrale Rolle im regulierenden Netzwerk der Blutgefäßbildung und -differenzierung ein (Detmar, 1996; Risau, 1996). VEGF, ein über Disulfidbrücken verbundenes Homodimer von 40-45 kDa, zählt zu der Familie der PDGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren und besitzt verschiedene Eigenschaften, welche VEGF zu einem zentralen Regulator der Angiogenese qualifizieren: (1) VEGF wird von normalen und von Tumorzellen sezerniert; (2) es stellt ein Endothelzell-spezifisches Mitogen dar; (3) es verfügt über angiogenetische Wirksamkeit in *in vivo* Testsystemen wie in der Cornea von Kaninchen; (4) es induziert in Endothelzellen die Synthese der interstitiellen Kollagenase (MMP-1) und die Produktion eines Plasminogenaktivators, wobei beide Faktoren an der proteolytischen Degradation der ECM während der Neoangiogenese beteiligt sind.

Bislang sind im menschlichen Organismus fünf verschiedene VEGF-Transkripte beschrieben worden, welche für Polypeptide von 121, 145, 165, 189 und 206 Aminosäuren kodieren (Leung et al., 1989; Claffey et al., 1992; Poltorak et al., 1997) und durch alternatives Spleißen eines einzigen Gens entstehen (Tischer et al., 1991; Park et al., 1993). Unter diesen Isoformen ist VEGF<sub>165</sub> die prädominante Form, die von vielen normalen und transformierten Zellen gebildet (Leung et al., 1989; Claffey et al., 1992) wird und welche daher im Mittelpunkt der Untersuchungen dieser Arbeit steht.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von UVB-Bestrahlung auf die Induktion von VEGF in normalen, sekundären Keratinozyten und in der spontan immortalisierten, epidermalen HaCaT-Zelllinie untersucht. Diese Zelllinie wird wegen des mutationsbedingten Verlustes beider p53 Allele und verschiedener genomischer Translokationen als eine initiierte

Tumorzelllinie angesehen und gilt entsprechend als Modellsystem für verschiedene Krebsformen, wie beispielsweise dem Plattenepithelkarzinom (Boukamp et al., 1988, 1997; Fusenig und Boukamp, 1998). *In vivo* treten bei der Entstehung von etwa 90 % aller Plattenepithelkarzinome schon sehr früh Mutationen im p53 Gen auf (Brash et al., 1991; Ziegler et al., 1994). Die immunohistologische Untersuchung verschiedener Plattenepithelkarzinome aus unterschiedlichen, sonnenexponierten Arealen zeigte im Vergleich zu normaler Haut eine starke Expression von VEGF<sub>165</sub> (Kapitel 5.1). Mit diesem Ergebnis wurden die Untersuchungen anderer Forschergruppen bestätigt (Weninger et al., 1996; Viac et al., 1997). Zudem wird VEGF von vielen Tumoren und Tumorzelllinien überexprimiert (Kolch et al., 1995; Brown et al., 1996).

UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen führte auf mRNA- und Proteinebene zu einer zeit- und dosisabhängigen Induktion von VEGF (Kapitel 5.2 und 5.3). Auf Proteinebene konnte die VEGF<sub>165</sub>-Expression von HaCaT-Zellen nach einmaliger UVB-Bestrahlung durch repetitive UVB-Bestrahlungen deutlich gesteigert werden (Kapitel 5.4). Zur Identifizierung UVB-sensitiver Elemente im Promotor des humanen VEGF-Gens wurden HaCaT-Zellen transient mit Deletionskonstrukten des VEGF-Promotors transfiziert und nachfolgend mit UVB bestrahlt (Kapitel 5.6). In diesen Untersuchungen wurde eine GC-reiche Gruppierung von 4 potentiellen SP-1- und einer überlappenden AP-2-Bindungsstellen (-1133 bis -1107) in unmittelbarer Nähe zum Transkriptionsstart als UVB-sensitives Element identifiziert, das für die UVB-spezifische Promotoraktivierung verantwortliches ist. Eine partielle Deletion dieser SP-1/AP-2-Gruppierung führte zu einem vollständigen Verlust der UVB-spezifischen Promotoraktivierung, wohingegen eine Behandlung transfizierter Zellen mit 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) zu einer signifikanten Induktion der Promotoraktivität führte (Kapitel 5.8). TGF $\alpha$  konnte als zentrales Zytokin bei der UVB-induzierten VEGF-Synthese identifiziert werden (Kapitel 5.11). Die Expression von TGF $\alpha$  wird durch eine UVB-abhängige Phosphorylierung des EGF-Rezeptors induziert und führt zu einer autokrinen Induktion von VEGF<sub>165</sub> (Kapitel 5.12). In normaler Haut ließ sich VEGF *in vivo* sowohl in Mäusen (Kapitel 5.13) als auch im Menschen (Kapitel 5.1) durch UVB-Bestrahlung induzieren. Die UVB-induzierte VEGF-Expression korrelierte in der Haut von haarlosen Mäusen nach repetitiver UVB-Bestrahlung mit einer deutlich verstärkten Angiogenese (Kapitel 5.13). Diese UVB-induzierte Angiogenese konnte in der haarlosen Maus durch neutralisierende Antikörper gegen VEGF signifikant reduziert werden.

In den folgenden Kapiteln sollen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Detail diskutiert werden.

## 6.1 UVB induziert VEGF *in vitro* und *in vivo*

Anschließend an den immunohistologischen Nachweis einer starken VEGF-Expression in Plattenepithelkarzinomen und der angrenzenden normalen Epidermis aus sonnenexponierter Hautarealen (Kapitel 5.1, Abb. 18a+b) wurden UVB-Induzierbarkeit und Basalexpression von VEGF auf Proteinebene in sekundären Keratinozyten verschiedener Spender und in HaCaT-Zellen untersucht. Zur Vermeidung einer Akkumulation von VEGF-Protein wurde 4 h vor Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit das nach der spezifischen Behandlung der Zellen konditionierte Medium durch frisches serumfreies Medium ersetzt und entsprechend die VEGF<sub>165</sub>-Expression innerhalb eines Zeitfensters von 4 h analysiert. Zum Ausschluß Spender-spezifischer Unterschiede in der Expression von VEGF wurden Keratinozyten von drei verschiedenen Spendern vergleichbaren Alters auf die Induzierbarkeit von VEGF nach UVB-Bestrahlung untersucht. Eine bis zu 2-fache Induktion von VEGF<sub>165</sub> wurde nach UVB-Bestrahlung sekundärer humaner Keratinozyten beobachtet (Kapitel 5.3, Abb. 22). Bei vergleichbarer Basalexpression zeigte die UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen eine deutlich höhere, etwa 3,5- bis 4-fache Induktion der VEGF-Expression (Kapitel 5.3, Abb. 22). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß dieser Unterschied in der UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> zwischen HaCaT-Zellen und Keratinozyten nicht durch Spender-spezifische Eigenschaften der Keratinozyten hervorgerufen wird, sondern auf andere bisher nicht geklärte molekulare Veränderungen der HaCaT-Zelllinie zurückzuführen ist.

Eine Analyse der Wellenlängenabhängigkeit der VEGF<sub>165</sub>-Induktion ergab eine maximal induzierbare VEGF-Expression im kurzwelligen, energiereichen UVB-Bereich zwischen 285 und 295 nm mit UVB-Dosen zwischen 1 und 10 mJ/cm<sup>2</sup> (Kapitel 5.5, Abb. 25). Eine maximale, 7,6-fache Induktion wurde bei 295 nm und einer Dosis von 10 mJ/cm<sup>2</sup> erreicht. Für eine Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression bei den Wellenlängenbereichen von 305 und 315 nm mußten HaCaT-Zellen mit wesentlich höheren UVB-Dosen bestrahlt werden. Bei 305 nm führte eine Bestrahlung mit 100 mJ/cm<sup>2</sup> zu einer maximalen (3,1-fachen) Induktion, wohingegen bei 315 nm eine Bestrahlung mit 200 mJ/cm<sup>2</sup> für eine vergleichbare (2,6-fache) Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Expression notwendig war. Diese Beobachtungen sind gerade in Hinsicht auf eine therapeutische Nutzung der UVB-Bestrahlung von großer Bedeutung und führen zu der Forderung einer Verwendung von UV-Quellen in der Phototherapie ohne oder mit nur geringer Induktion von VEGF. So kann beispielsweise durch eine Schmalspektrum-UVB-Therapie (311 nm) die seit langer Zeit erfolgreich durchgeführte Breitband-UVB-Therapie von Vitiligo (Koster und Wiskemann, 1990), einer häufig vorkommenden

hypomelanotischen Hauterkrankung, welche durch den Verlust oder die völlige Inaktivierung von Melanozyten gekennzeichnet ist, weitgehend ersetzt werden. Zur Behandlung der Vitiligo mit der Schmalspektrum-UVB-Therapie wird eine anfängliche UVB-Dosis von  $75 \text{ mJ/cm}^2$  bei 2-3maliger Bestrahlung pro Woche verwendet. Je nach Hautreaktion und Ausprägung der Vitiligo wird die UVB-Dosis bei folgenden Bestrahlungen um 20 % mit einer maximalen Dosis von 400 bis  $500 \text{ mJ/cm}^2$  erhöht. Die dabei erzielte Effektivität ist vergleichbar mit alternativen Behandlungsmethoden und ermöglicht sogar eine Verkürzung der Therapiedauer (Dissemond et al., 1999; Westerhof und Nieuweboer-Krobotova, 1997). Ähnliche Erfolge der Schmalspektrum-UVB-Therapie sind bisher bei der Behandlung von Psoriasis, der Schuppenflechte, zu verzeichnen (Green et al., 1992a, b; Halasz, 1999). Desweiteren besteht bei der Schmalspektrum-UVB-Therapie im Vergleich zur Breitband-UVB-Therapie wahrscheinlich ein geringeres Risiko für Langzeitschäden, da bei der Schmalspektrum-UVB-Therapie auf eine UV-Emission mit Wellenlängen, die von der DNA absorbiert werden, verzichtet wird (Stern und Laird, 1994). Neben dem verringerten Risiko UVB-induzierter DNA-Schäden, führte *in vitro* die UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen bei 315 nm erst ab  $200 \text{ mJ/cm}^2$  zu einer 2,6-fachen Induktion von VEGF<sub>165</sub> (Kapitel 5.5 Abb. 25). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich *in vitro* nach UVB-Bestrahlung sekundärer humaner Keratinozyten mit  $200 \text{ mJ/cm}^2$ . Die Bestrahlung der Keratinozyten führte zu einer 2,1-fachen Induktion von VEGF<sub>165</sub> (Longuett-Perret et al., 1998). Inwieweit die Schmalspektrum-UVB-Therapie bei einer vergleichbaren UVB-Dosen *in vivo* zu einer VEGF-Expression führt, und ob diese Induktion angiogenetisch wirksam ist, wurde bisher noch nicht untersucht. Zumindest könnten mögliche Langzeitschäden und Risiken einer Breitband-UVB-Therapie durch die Induktion mutagener DNA-Schäden durch die Schmalspektrum-UVB-Therapie minimiert werden.

Auf mRNA-Ebene zeigten HaCaT-Zellen nach UVB-Bestrahlung eine der VEGF-Proteinexpression entsprechende Induktion aller analysierter VEGF-Isoformen mit signifikanter 2,5-facher Induktion nach 8 h und einem 6-fachen Anstieg der spezifischen mRNA-Menge nach 12 h (Kapitel 5.2, Abb. 20a). Für die UVB-induzierte VEGF-mRNA-Expression in HaCaT-Zellen bestätigen diese Daten die Ergebnisse anderer Forschergruppen (Brauchle et al., 1996). Sowohl Keratinozyten als auch HaCaT-Zellen reagierten auf UVB in gleicher Weise mit einer Synthese von VEGF<sub>165</sub>-Protein. Diese Ergebnisse weisen auf gemeinsame regulatorische Reaktionswege hin. Die Ursache der signifikant erhöhten UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> in HaCaT-Zellen gegenüber der Induktion in Keratinozyten ist bisher unklar. Es ist möglich, daß die p53-Mutationen in HaCaT-Zellen bei der VEGF-Regulation

eine Rolle spielen. HaCaT-Zellen tragen UV-charakteristische C→T- und CC→TT-Transitionen in beiden Allelen des *p53*-Gens, die eine vollständige Funktionsinaktivierung von p53 zur Folge haben (Lehman et al., 1993). Untersuchungen in anderen experimentellen Modellsystemen zeigen eine Korrelation zwischen funktionellem p53-Protein und der Expression von VEGF. Die Transfektion von NIH 3T3-Zellen mit einer nicht-funktionellen *p53*-Mutante führte zu einer VEGF-Induktion und einem angiogenetischen Phänotyp (Kieser et al., 1994). Desweiteren verminderte ein adenoviraler Wildtyp-*p53*-Gentransfer die Expression von VEGF in den Zellen eines humanen Kolonkarzinoms und inhibierte die Angiogenese (Bouvet et al., 1998). Die Integrität von p53 scheint also direkten Einfluß auf die Expression von VEGF zu haben. Es sehr wahrscheinlich, daß die gesteigerte VEGF-Expression nach UVB-Bestrahlung von Hautkrebszellen (HaCaT-Zellen) eine durch UVB-Bestrahlung von Keratinozyten induzierte Angiogenese noch verstärkt.

Während sich *in vivo* eine deutliche Induktion der VEGF-Expression nach UVB-Bestrahlung in normaler Haut zeigen ließ (Kapitel 5.1, Abb. 18c), kann die Expression von VEGF in Tumoren konstitutiv erhöht sein. Beispielsweise exprimieren SCL-1-Zellen aus einem Plattenepithelkarzinom *in vitro* im Vergleich zu Keratinozyten oder HaCaT-Zellen einen bis zu 6-fach erhöhten Basallevel an VEGF, welcher bei invasiven MV3-Melanomzellen sogar 10-fach erhöht war (eigene, nicht aufgeführte Daten). In beiden Fällen ließ sich jedoch die basale VEGF-Expression durch UVB nicht verstärken, was eine Entkopplung der VEGF-Expression mit voranschreitender Tumordifferenzierung vermuten läßt. Ein weiterer Stimulus für die Freisetzung von VEGF in Tumoren vorangeschrittenen Differenzierungsgrades ist die Induktion der VEGF-Synthese durch Hypoxie, eine Verminderung der Sauerstoffzufuhr in den nekrotischen Bereichen des Tumors, welche die bereits erhöhte VEGF-Expression in den Tumorzellen noch verstärken kann (Senger et al., 1986; Dvorak et al., 1995). Das 28 bp lange Hypoxie-spezifische Element im VEGF-Promotor liegt zwischen den Nukleotiden -2218 und -1925. Dieses Element wurde als Bindungsstelle für einen durch Hypoxie induzierten Transkriptionsfaktor (HIF-1) identifiziert (Ikeda et al., 1995; Liu et al., 1995). Im 3'-untranslatierten Bereich des VEGF-Gens existiert eine Bindungsstelle für einen Hypoxie-induzierbaren RNA-Proteinkomplex, welcher nach Bindung die VEGF mRNA stabilisiert und DNA-Sequenzen im 3'-untranslatierten Bereich überdeckt, die nach der Transkription eine verminderte Stabilität des VEGF-Transkriptes hervorrufen (Levy et al., 1997).

## 6.2 Die UVB-Induktion von VEGF wird autokrin durch TGF $\alpha$ vermittelt

Zur Identifizierung UVB-sensitiver Elemente im VEGF-Promotor wurden HaCaT-Zellen mit verschiedenen Promotordeletionskonstrukte transient transfiziert. Diese Konstrukte bestanden aus einem Luciferase-Reportergen und unterschiedlichen Bereichen des VEGF-Promotors von 171 bp (VEGF.9) bis zu 3,2 kbp (VEGF.1). Zur Standardisierung der Transfektionseffizienz diente ein Vektor (pCMV- $\beta$ Gal) mit einer konstitutiven  $\beta$ -Galaktosidaseexpression. Die Kotransfektion der VEGF-Promotorkonstrukte und des  $\beta$ -Galaktosidasevektors Luciferase-Vektor wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz durchgeführt. Ein promotorloser Luciferase-Vektor (pGL-basic) diente bei diesem Experiment als Negativkontrolle.

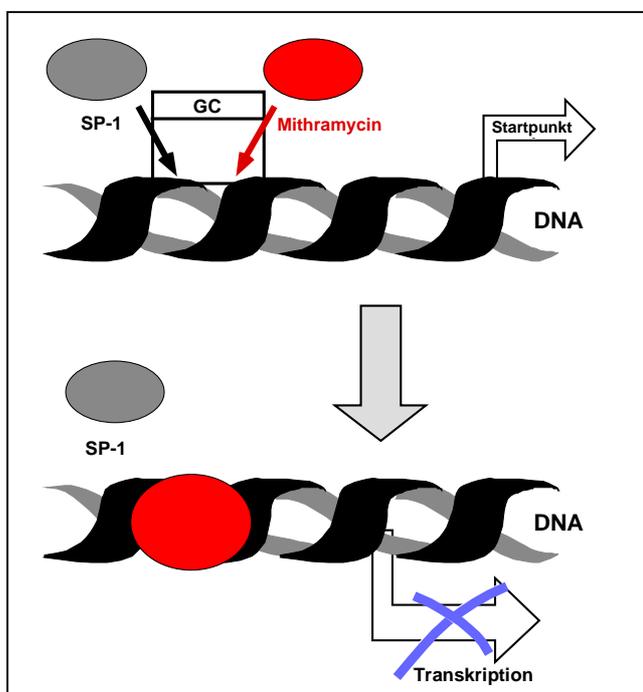
Nach UVB-Bestrahlung der transient transfizierten HaCaT-Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> zeigten alle VEGF-Promotorkonstrukte im Vergleich zum promotorlosen Luciferase-Vektor eine deutliche Induktion der Luciferaseaktivität. Dabei war zwischen den einzelnen Promotorkonstrukten kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der Luciferaseaktivität festzustellen (Kapitel 5.6, Abb. 28). Auch das kürzeste 171 bp lange VEGF-Deletionskonstrukt VEGF.9 zeigte nach UVB-Bestrahlung eine mit den übrigen Promotorkonstrukten vergleichbare Induktion der Luciferase. Diesen Daten zufolge mußte das Konstrukt VEGF.9 wie auch die anderen Promotorkonstrukte über ein UVB-sensitives Element im Promotorabschnitt -1169 bis -998 verfügen. Aus der Sequenz des humanen VEGF-Promotors (Tischer et al., 1991) wurde in diesem Abschnitt eine Gruppierung von 4 potentiellen SP-1-Bindungsstellen (-1133 bis -1107; Erkennungssequenz: CCGCCC bzw. GGGCGG) mit einer überlappenden Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-2 (-1118 bis -1109; Erkennungssequenz: GCCGGGGC) identifiziert. Die Ergebnisse der transienten Transfektion von HaCaT-Zellen mit den VEGF-Promotordeletionskonstrukten wiesen bereits darauf hin, daß diese Gruppe aus SP-1/AP-2-Bindungsstellen den UVB-Effekt auf den VEGF-Promotor vermittelt.

In humanen Gliomazellen wird die Induktion von VEGF durch TNF $\alpha$  über diese SP-1/AP-2-Gruppierung vermittelt (Ryoto et al., 1996) und in der Plattenepithelkarzinom-Zelllinie A431 verläuft die TGF $\alpha$ -induzierte VEGF-Synthese zumindest über einen Teil dieser Bindungsstellen (Gille et al., 1997). Dieser TGF $\alpha$ -spezifische Promotorabschnitt entspricht mit hoher Homologie der Konsensussequenz von AP-2 (Williams und Tjian, 1991) und überlappt in einem Bereich von 5 Nukleotiden (GGGCG) mit dem 5'-Ende der zweiten SP-1-Bindungsstelle und in 1 Nukleotid (G) mit dem 3'-Ende der dritten SP-1-Bindungsstelle in

direkter Nähe zum Transkriptionsstartpunkt (-1038). Durch Kotransfektion eines AP-2-Expressionsvektors und eines VEGF-Promotorkonstruktes mit den Promotorabschnitten -1118 bis -984 konnte eine Transaktivierung der VEGF-Promotoraktivität durch AP-2 gezeigt und das TGF $\alpha$ -spezifische Element als AP-2-Bindungsstelle identifiziert werden (Gille et al., 1997). Interessanterweise zeigte das verwendete Konstrukt mit einer AP-2-Bindungsstelle und den SP-1-Bindungsstellen 3 und 4 vor einem CAT-Reportergen eine um 60 % verminderte Promotoraktivität im Vergleich zu einem Promotorkonstrukt, das zusätzlich noch über die zweite SP-1-Bindungsstelle aus der SP-1/AP-2-Gruppe verfügte.

Die hier vorgelegte Untersuchung zeigte, daß das SP-1/AP-2-Element (-1133 bis -1090) auch für die UVB-Induzierbarkeit des VEGF-Gens verantwortlich ist. Um den maßgeblichen Einfluß der SP-1-Bindung an diese SP-1/AP-2-Gruppierung zu prüfen, wurde das Antibiotikum Mithramycin als Inhibitor verwendet.

Mithramycin besitzt eine hohe Affinität zu GC-reichen DNA-Sequenzen (Berlin et al., 1968; Van Dyke und Dervan, 1983) und inhibiert reversibel die Transkription von Genen mit GC-reichen Sequenzen im Promotorbereich (Miller et al., 1987; Ray et al., 1990; Blume et al., 1991). Durch diese Eigenschaft ist Mithramycin in der Lage, als kompetitiver Inhibitor



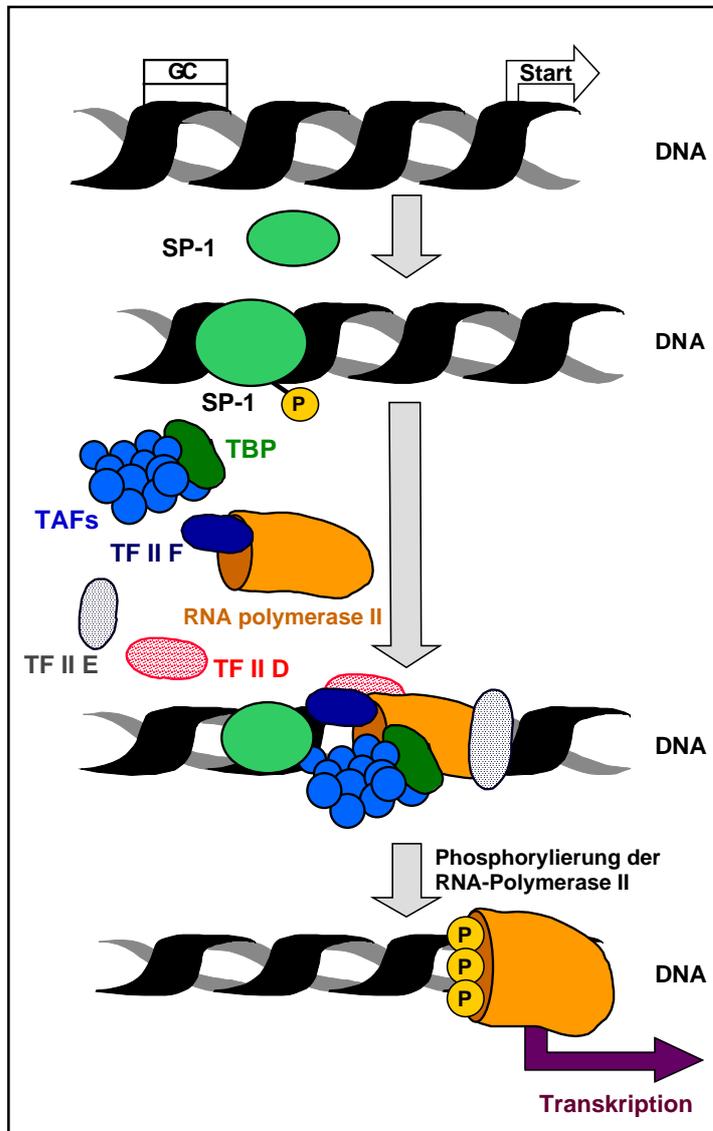
**Abb. 53 Kompetitive Inhibition der SP-1-vermittelten Transkription durch Mithramycin**

Transkriptionsfaktoren wie z. B. SP-1 (Konsensussequenz: 5'-GGGCGG-3' oder 5'-CCGCC-3') an ihrer Bindung an GC-reiche Promotorsequenzen verschiedener Gene zu hindern (Ray et al., 1989, 1990; Snyder et al., 1991; Hardenbol, 1992) (Abb. 53).

Durch die Verwendung nicht-toxischer Konzentrationen von Mithramycin war es möglich, sowohl auf Ebene der Promotoraktivität als auch auf Proteinebene den UVB-Effekt auf die VEGF-Expression bis auf das Basalniveau unbehandelter Kontrollen zu vermindern (Kapitel 5.7, Abb. 30a+b). Wenn auch die Inhibition der

UVB-induzierten VEGF-Expression durch Mithramycin einen Hinweis auf den Einfluß der

SP-1/AP-2-Gruppierung gab, mußte ausgeschlossen werden, daß Mithramycin den kompetitiven Einfluß auf die VEGF-Expression durch eine unspezifische Bindung an den VEGF-Promotor oder an Promotorsequenzen weiterer Gene mit regulatorischen Einfluß auf die VEGF-Synthese ausübte. Um die Beteiligung der SP-1/AP-2-Bindungsstellengruppe an der VEGF-Induktion nach UVB direkter zu belegen, wurde der VEGF-Promotor innerhalb dieser Bindungsstellen durch eine *in vitro*-Mutagenese modifiziert (Porgulis et al., 1996). Drei von vier SP-1-Bindungsstellen und die überlappende AP-2-Bindungsstelle wurden über eine Länge von 27 bp in den Promotorkonstrukten VEGF.9 und VEGF.1 deletiert. Die eingebrachten Deletionen wurden durch eine Sequenzanalyse bestätigt. Die Konstrukte wurden sowohl mit und ohne Deletion transient in HaCaT-Zellen transfiziert.



Die Beteiligung der SP-1/AP-2-Bindungsstellengruppe an der VEGF-Induktion nach UVB direkter zu belegen, wurde der VEGF-Promotor innerhalb dieser Bindungsstellen durch eine *in vitro*-Mutagenese modifiziert (Porgulis et al., 1996). Drei von vier SP-1-Bindungsstellen und die überlappende AP-2-Bindungsstelle wurden über eine Länge von 27 bp in den Promotorkonstrukten VEGF.9 und VEGF.1 deletiert. Die eingebrachten Deletionen wurden durch eine Sequenzanalyse bestätigt. Die Konstrukte wurden sowohl mit und ohne Deletion transient in HaCaT-Zellen transfiziert.

**Abb. 54 SP-1 ist an der Initiation der Transkription TATA-Box-loser Promotoren beteiligt**

Anschließend erfolgte eine UVB-Bestrahlung der transfizierten Zellen mit 10 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. Im Gegensatz zu einer etwa 2-fachen UVB-Induktion der Promotoraktivität des unveränderten Konstruktes VEGF.9 war die Luciferaseaktivität des mutierten Konstruktes VEGF.9 Δ3SP-1/AP-2 nach UVB-Bestrahlung vollständig aufgehoben (Kapitel 5.8, Abb. 31). Das mutierte Konstrukt VEGF.1 Δ3SP-1/AP-2 zeigte ebenfalls keinerlei Induzierbarkeit der Promotoraktivität durch UVB. Dagegen führte eine UVB-Bestrahlung der mit dem funktionellen VEGF.1-Konstrukt transfizierten Zellen zu einem 2-fachen Anstieg der Promotoraktivität (Kapitel 5.8, Abb. 32). Da jedoch gerade in TATA-Box-losen Promotoren wie dem VEGF-Promotor (Tischer et al., 1991) eine Bindung von SP-1-Transkriptionsfaktoren zur Transaktivierung und nachfolgender Genexpression notwendig ist (Azizkhan

unveränderten Konstruktes VEGF.9 war die Luciferaseaktivität des mutierten Konstruktes VEGF.9 Δ3SP-1/AP-2 nach UVB-Bestrahlung vollständig aufgehoben (Kapitel 5.8, Abb. 31). Das mutierte Konstrukt VEGF.1 Δ3SP-1/AP-2 zeigte ebenfalls keinerlei Induzierbarkeit der Promotoraktivität durch UVB. Dagegen führte eine UVB-Bestrahlung der mit dem funktionellen VEGF.1-Konstrukt transfizierten Zellen zu einem 2-fachen Anstieg der Promotoraktivität (Kapitel 5.8, Abb. 32). Da jedoch gerade in TATA-Box-losen Promotoren wie dem VEGF-Promotor (Tischer et al., 1991) eine Bindung von SP-1-Transkriptionsfaktoren zur Transaktivierung und nachfolgender Genexpression notwendig ist (Azizkhan

et al., 1993), bestand prinzipiell die Möglichkeit, daß die Deletion durch die Nähe zum Transkriptionsstart nicht nur die UVB-induzierte Transkription inhibiert, sondern generell mit der Transkriptionsinitiation interferiert. Diese Möglichkeit ergibt sich aus der Tatsache, daß der Transkriptionsfaktor SP-1 nach Erkennung und Bindung seiner GC-reichen Konsensussequenz verschiedene Faktoren des Transkriptionsinitiations-Komplexes rekrutiert, was nachfolgend zur Bindung und Aktivierung der RNA-Polymerase II und zum Start der Transkription führt (Abb. 54).

Um auszuschließen, daß die Mutation der SP-1/AP-2-Gruppe generell die Transkriptionsinitiation inhibiert, wurde das mutierte Konstrukt VEGF.1  $\Delta$ 3SP-1/AP-2 auf die Induzierbarkeit der Promotoraktivität durch 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) untersucht. Bei TPA handelt es sich um einen Tumorpromoter, der über Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und AP-2 zur Transaktivierung und zur Genexpression führt (Imagawa et al., 1987). Im Promotor von VEGF.1 befinden sich nach der Mutation der SP-1/AP-2-Gruppe noch mehrere potentielle AP-1- und AP-2-Bindungsstellen. Falls die eingeführte Mutation nicht mit der generellen Transkription interferiert, sollte durch TPA eine Induktion der Luciferaseaktivität in den VEGF.1  $\Delta$ 3SP-1/AP-2-transfizierten HaCaT-Zellen möglich sein. Im Gegensatz zur UVB-Bestrahlung führte die Stimulierung von VEGF.1  $\Delta$ 3SP-1/AP-2-transfizierter Zellen mit TPA zu einer signifikanten Induktion der Promotoraktivität (Kapitel 5.8, Abb. 32). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die Deletion in der Nähe des Transkriptionsstarts nicht mit der generellen Transkription interferierte und daß die SP-1/AP-2-Gruppe den UVB-Effekt auf den VEGF-Promotor vermittelt.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob bei der UVB-vermittelten Induktion von VEGF reaktive Sauerstoffspezies (ROS) einen direkten Einfluß auf die VEGF-Synthese ausüben, oder ob die UVB-induzierte VEGF-Expression indirekt über die Expression spezifischer Gene vermittelt wird. Eine UVB-Absorption führt in der Haut intrazellulär durch verschiedene reaktive Sauerstoffspezies zu oxidativem Streß (Sies, 1991). UVB generiert besonders Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Hydroxylradikale ( $HO^{\cdot}$ ) und Lipidhydroperoxide (Masaki et al., 1995a, b; Perez et al., 1995).

Eine intra- bzw. extrazelluläre Generierung von Superoxidanionen ( $O_2^{\cdot-}$ ) mit Hilfe der Systeme Paraquat ( $PQ^{2+}$ ) und Xanthin/ Xanthinoxidase (X/XO) führte zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Induktion von VEGF<sub>165</sub> (vgl. Kapitel 5.9, Abb. 35 und 37). Die VEGF-Induktion durch Paraquat- (Abb. 35) oder durch Xanthinoxidase (Abb. 37) entwickelte sich mit einer von der UVB-Induktion unterschiedlichen Zeitabhängigkeit. Die Induktion von

VEGF<sub>165</sub> erfolgte durch Paraquat und X/XO deutlich früher als durch UVB, wodurch eine indirekte Induktion von VEGF<sub>165</sub> nach UVB über auto- oder parakrine Mechanismen wahrscheinlich erschien. Aufschluß darüber sollte die Verwendung spezifischer Inhibitoren zelleigener ROS-detoxifizierender Enzyme mit einer intrazellulären Anreicherung reaktiver Sauerstoffspezies geben. Die Inhibitoren Aminotriazol (ATZ), Buthioninsulfoximin (BSO), Diethyldithiocarbamat (DDC) und Desferrioxamin (DFO) inhibieren auf unterschiedliche Weise (vgl. Kapitel 5.9, Abb. 33) den Abbau von ROS durch Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase und durch die Fe<sup>3+</sup>-vermittelte Fenton-Reaktion (Tyrrell, 1991; Inoue et al., 1992; Maitre et al., 1993; Singh und Hider, 1994). ATZ und BSO führen nach UVB-Bestrahlung durch Inhibition von Katalase und GSHPx zu einer intrazellulären Anreicherung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, während DDC den Abbau von O<sub>2</sub><sup>•-</sup> durch die Superoxiddismutase (SOD) hemmt. Wie in Kapitel 5.9, Abb. 40 gezeigt ist, veränderte die Inkubation von HaCaT-Zellen mit ATZ, BSO und DDC die UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression nicht. Überraschenderweise stieg nach kombinierter Behandlung der Zellen mit UVB und Desferrioxamin die VEGF-Expression signifikant an. Anders als bei der Induktion von MMP-1 durch UVB, bei der DFO als Eisenchelator zu einer Verminderung der MMP-1-Expression führt, indem die (Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup>)-abhängige Erzeugung von Hydroxylradikalen (Fenton-Reaktion) und Lipidperoxiden inhibiert wurde (Brenneisen et al., 1998), scheinen andere Mechanismen für die UVB-Induktion von VEGF<sub>165</sub> verantwortlich zu sein. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte in der Struktur und Funktion eines postulierten Regulators der VEGF-Induktion unter Sauerstoffmangelbedingungen (Hypoxie) begründet sein (Ikeda et al., 1995; Faller, 1999; Zhu und Bunn, 1999). In anderen Fällen wurde eine sauerstoffabhängige Regulation von Genen beschrieben. Hypoxie führte in Hepatoma-Zelllinien zur Aktivierung der Genexpression von Erythropoietin, VEGF, PlGF und der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette von PDGF (Gleadle et al., 1997). Außerdem ließen sich diese Gene fast ohne Ausnahme durch Inkubation mit Kobalt und Mangan induzieren, während Kohlenmonoxid einer Hypoxie-induzierten Genexpression entgegenwirkte (Goldberg et al., 1988; Kourembanas et al., 1993; Goldberg et al., 1994; Levy et al., 1995; Gleadle et al., 1997). Diese Beobachtungen sprechen sehr für ein Häm-Motiv in der Struktur des postulierten Sauerstoffsensors mit Fe<sup>2+</sup> als Zentralion. Kobalt und Mangan verfügen über das Potential, Eisen in einem Eisen-(II)-Protoporphyrinkomplex zu ersetzen und die Sauerstoffbindung stark zu behindern (Goldberg et al., 1988; Levy et al., 1997). Der Sauerstoffsensor wird in einer „Deoxy-Konformation“ fixiert, was eine hypoxieartige Induktion der Zielgene zur Folge hat.

Eine DFO-abhängige Induktion der VEGF-Synthese wurde in Hepatomazellen und C6-Gliomazellen berichtet (Beerepoot et al., 1996; Gleadle et al., 1997). Da Häm-gebundenes Eisen nicht ohne weiteres durch Eisenchelatoren freigesetzt und gebunden werden kann (Grasso et al., 1985), wird postuliert, daß der regulierende Sauerstoffsensoren über ein labiles Eisenmotiv mit Ähnlichkeit zu nicht-Häm-haltigen Eisenproteinsensoren verfügt (Spiro et al., 1989; Klausner et al., 1993). Eine Induktion der VEGF-Expression in HaCaT-Zellen durch eine alleinige DFO-Behandlung mit 50 µM konnte nicht beobachtet werden (Kapitel 5.9, Abb. 40). Levy et al. (1997) konnte in 2 von 4 Zelllinien eine Induktion von VEGF durch Inkubation mit 100 µM DFO erzielen während Beerepoot et al. (1996) eine DFO-induzierte VEGF-Expression in allen getesteten Zelllinien bei einer Konzentration von 50-100 µM beschrieb. Diese Ergebnisse zeigen, daß DFO zellspezifisch unterschiedlich wirken kann, wodurch die ausbleibende Reaktion von HaCaT-Zellen auf eine Inkubation mit DFO zu erklären ist. Da es *in vivo* durch UVB-Bestrahlung von Maushaut zu einem Anstieg von nicht Häm-gebundenen Eisen kommt (Bissett et al., 1991) und UVB Fe(II) aus Eisen-bindenden Proteinen freisetzt (Biemond et al., 1988), ist es vorstellbar, daß Fe<sup>2+</sup> durch UVB aus dem Eisen-(II)-Protoporphyrinkomplex eines Häm-haltigen Sauerstoffsensors freigesetzt und dann durch den Eisenchelator DFO gebunden wird, was eine Bindung von Sauerstoff verhindert. Das Sensormolekül signalisiert Sauerstoffmangelbedingungen, was zu einer Induktion von VEGF<sub>165</sub> führen könnte. Um diese Hypothese experimentell belegen zu können, wäre in Zukunft die Identifizierung und Analyse des postulierten Sauerstoffsensors eine wesentliche Voraussetzung.

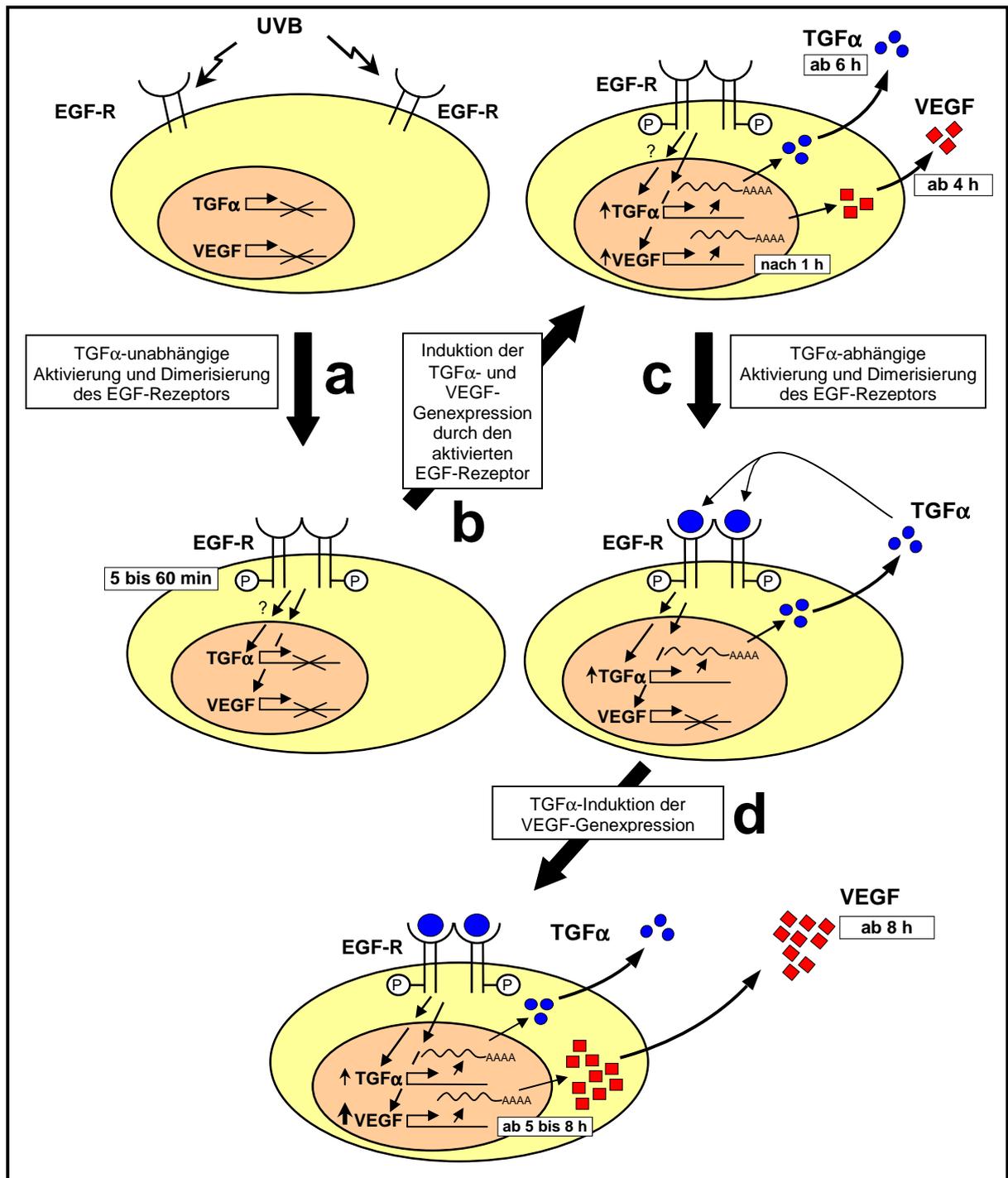
Da ein direkter Einfluß von UVB-induzierten ROS auf die Expression von VEGF nicht nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob UVB-Strahlung die Synthese von VEGF indirekt über einen autokrinen Mechanismus induziert. Unterschiedliche Wachstumsfaktoren sind als Induktoren von VEGF in humanen epidermalen Zellen bekannt (Coffey et al., 1987; Detmar et al., 1995). Mit Zellkulturüberständen von UVB-bestrahlten HaCaT-Zellen konnte ein signifikanter Anstieg der VEGF-Proteinkonzentration in den Zellkulturüberständen nicht-bestrahlten Zellen gezeigt werden (Kapitel 5.10, Abb. 42a). Mit Suramin, einem unspezifischen Inhibitor verschiedener Wachstumsfaktoren wie bFGF, EGF, TGF $\alpha$  und - $\beta$  und PDGF (Piva et al., 1996) und einem Inhibitor der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion aktivierter Zelloberflächen-Rezeptoren (Baghdiguian und Fantini, 1997), konnte die VEGF-Expression nach UVB vollständig inhibiert werden (Kapitel 5.10, Abb. 42b). Diese Experimente belegen eine autokrine Beteiligung sezernierter Faktoren bei

der UVB-vermittelten Induktion von VEGF<sub>165</sub>. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, daß eine repetitive UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen wahrscheinlich durch die Sekretion autokrin wirksamer Zytokine zu einem kumulativen Anstieg der VEGF-Syntheserate führte (Kapitel 5.4, Abb. 23).

TGF $\alpha$  konnte als autokriner Wachstumsfaktor identifiziert werden, der die UVB-bedingte VEGF-Induktion vermittelt. Zusammenfassend lieferten verschiedene Experimente Hinweise auf die zentrale Rolle von TGF $\alpha$  bei der autokrinen Vermittlung der UVB-Antwort: (1) Das UVB-sensitive Element im VEGF-Promotor (-1133 bis -1090), welches eine SP-1/AP-2-Gruppierung in direkter Nähe zum Transkriptionsstartpunkt enthält, entspricht einem TGF $\alpha$ -spezifischen Element im VEGF-Promotor (Gille et al., 1997). (2) UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen führt zu einer zeitabhängigen Induktion von TGF $\alpha$ , die der UVB-abhängigen Synthese von VEGF<sub>165</sub> vorausgeht (Kapitel 5.11, Abb. 43). (3) Durch die Verwendung neutralisierender Antikörper gegen TGF $\alpha$  wird eine UVB-induzierte VEGF<sub>165</sub>-Expression vollständig inhibiert (Kapitel 5.11, Abb. 44a+b).

### **6.3 Die UVB-Induktion von TGF $\alpha$ und VEGF ist Folge einer UVB-bedingten Phosphorylierung des EGF-Rezeptors**

Unter physiologischen Umständen wird die Synthese von TGF $\alpha$  durch die Aktivierung des EGF-Rezeptors, eines 170 kDa großen, transmembranen Oberflächenrezeptors, induziert (Coffey et al., 1987). Zudem führt die UVB-Bestrahlung von humanen Keratinozyten zu einer ligandenunabhängigen Rezeptor-Multimerisierung (Zheng et al., 1993; Rosette und Karin, 1996; Peus et al., 1998), die eine Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinase des Rezeptors nach sich zieht. Diese UVB-induzierte Aktivierung führt zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors und zu einer Phosphorylierung von zellulären Regulatorproteinen (Heldin, 1995). Die Blockade der EGF-R-Aktivität durch 4-[(3-Bromophenol)amino]-6,7-Dimethoxyquinazolin (PD 153035), einem spezifischen Inhibitor der EGF-R-Tyrosinkinase-Aktivität (Fry et al., 1994; Bridges et al., 1996), hat eine Hemmung der UVB-induzierten EGF-R-Phosphorylierung (Kapitel 5.12, Abb. 48), der TGF $\alpha$ - (Kapitel 5.12, Abb. 46) und der VEGF-Synthese (Kapitel 5.12, Abb. 47) zur Folge. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Annahme, daß die UVB-induzierte Aktivierung des EGF-Rezeptors einen initialen frühen Schritt in einer Abfolge komplexer Signaltransduktionsereignisse darstellt, die der Freisetzung von TGF $\alpha$  und VEGF vorangehen. Eine UVB-spezifische Phosphorylierung des EGF-Rezeptors ist bereits 10 min nach der Bestrahlung zu beobachten und führt zu einer biphasischen Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Synthese (Kapitel 5.12, Abb. 32a+b). Die UVB-Bestrahlung von HaCaT-Zellen führte bereits nach 2 h zu einem ersten Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Synthese. Diese erste VEGF<sub>165</sub>-Induktion verläuft unabhängig von TGF $\alpha$ . Neutralisierende Antikörper gegen TGF $\alpha$  zeigten bei dem ersten Konzentrationsanstieg von VEGF<sub>165</sub> keinen Effekt, während die Verwendung des Tyrosinkinase-Inhibitor PD 153035 eine vollständige Inhibition der UVB-induzierten VEGF<sub>165</sub>-Synthese bewirkte (Kapitel 5.12, Abb. 50). Bei dem zweiten durch UVB induzierten Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Konzentration konnte TGF $\alpha$  sowohl in sekundären Keratinozyten als auch in HaCaT-Zellen als zentraler, die UVB-Antwort vermittelnder Wachstumsfaktor identifiziert werden.



**Abb. 55 Die UVB-induzierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors führt zu einer ersten TGFα-unabhängigen und zu einer späteren TGFα-abhängigen Aktivierung der VEGF<sub>165</sub>-Synthese in HaCaT-Zellen**

UVB-Bestrahlung führt zu einer TGFα-unabhängigen Phosphorylierung und Aktivierung des EGF-Rezeptors (a). Die Aktivierung des EGF-Rezeptors hat 2 bis 4 h nach der UVB-Bestrahlung eine frühe VEGF<sub>165</sub>-Synthese und ab 6 h eine Synthese von TGFα zur Folge (b). Sekretisiertes TGFα führt nach Bindung an den EGF-Rezeptor zu einer ligandenabhängigen Rezeptor-Aktivierung (c). Die TGFα-abhängige Aktivierung des EGF-Rezeptors führt 8 h nach der UVB-Bestrahlung zu einer zweiten, stärkeren Induktion der VEGF<sub>165</sub>-Proteinsynthese (d).

Die Induktion von TGFα erfolgte 6 h nach UVB-Bestrahlung (Kapitel 5.11, Abb. 43) und ist der zweiten Phase der VEGF<sub>165</sub>-Expression zeitlich vorangeschaltet. Durch die Verwendung

neutralisierender Antikörper konnte diese späte Expressionsphase von VEGF<sub>165</sub> in HaCaT-Zellen und in sekundären Keratinozyten auf die Basalexpression unbestrahlter Kontrollzellen reduziert werden (Kapitel 5.11, Abb. 44a+b). Diese Ergebnisse lassen sich in folgendem Modell zusammenfassen (Abb. 55): UVB führt zu einer TGF $\alpha$ -unabhängigen Aktivierung und Dimerisierung des EGF-Rezeptors, was 2 bis 4 h nach der UVB-Bestrahlung zu einem ersten Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Synthese und nach 6 h zur TGF $\alpha$ -Genexpression führt. Über einen autokrinen Mechanismus bewirkt TGF $\alpha$  die Aktivierung des EGF-Rezeptors und induziert 8 h nach UVB-Bestrahlung einen zweiten Anstieg der VEGF<sub>165</sub>-Proteinsynthese. Durch die Verwendung des Tyrosinkinase-Inhibitors PD 153035 konnte die Induktion von TGF $\alpha$  und VEGF (Kapitel 5.12, Abb. 46, 47) nicht völlig auf das Basalniveau der unbehandelten Kontrollen vermindert werden. Dieses Ergebnis könnte auf zusätzliche Wachstumsfaktoren bei der EGF-R-Phosphorylierung oder auf eine Involvierung bislang unbekannter Rezeptoren bei der UVB-induzierten Expression von TGF $\alpha$  deuten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern eine detaillierte molekulare Beschreibung des durch TGF $\alpha$  vermittelten autokrinen Mechanismus in einem Modellsystem, das vermutlich kritische Schritte bei der UV-induzierten Angiogenese physiologischer und pathologischer Situationen der Haut reflektiert. Tatsächlich wurden der Wachstumsfaktor TGF $\alpha$  und der EGF-Rezeptor in nicht-melanozytären Hautkrebsarten vermehrt bzw. aktiviert nachgewiesen (King et al., 1990).

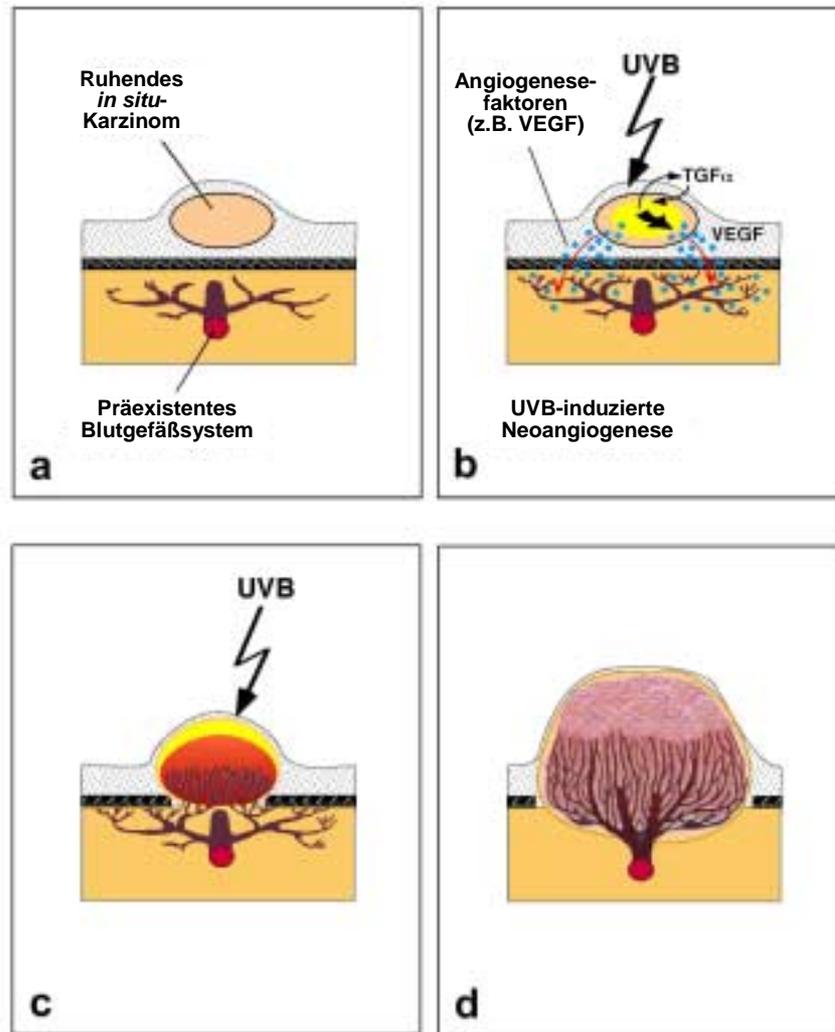
#### **6.4 VEGF ist bei der Induktion angiogenetischer Prozesse in der Haut nach UVB-Bestrahlung von zentraler Bedeutung**

Die bisher dargestellten Untersuchungen weisen darauf hin, daß VEGF bei der Entstehung von Teleangiektasien und der verstärkten Neoangiogenese in der Haut eine kausale Rolle spielen könnte. Folgende experimentelle Hinweise unterstützen eine kausale Beteiligung von VEGF an der Neoangiogenese in chronisch UVB-bestrahlter Haut: (1) VEGF wird in Plattenepithelkarzinomen aus sonnenexponierten Arealen stark exprimiert (Kapitel 5.1, Abb. 1a+b). Derartige Tumoren sind häufig von einem ausgedehnten Kapillarsystem infiltriert. (2) Durch UVB-Bestrahlung konnte VEGF nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* sowohl in muriner (Kapitel 5.13, Abb. 34) als auch in humaner Haut (Kapitel 5.1, Abb. 1c) induziert werden. (3) Die Expression von TGF $\alpha$  wird in normaler Haut durch UVB induziert

und ist in vielen Hauttumoren stark erhöht; (4) Transgene Mäuse, welche VEGF epidermal überexprimieren, weisen eine erhöhte mikrovaskuläre Dichte in dermalen Bereichen der Haut auf (Detmar et al., 1998).

In der hier vorgelegten Arbeit gelang der Nachweis der parakrinen Rolle von VEGF in der UVB-induzierten Angiogenese letztlich in einer repetitiven UVB-Bestrahlung von haarlosen Skh-1-Mäusen unter Verwendung neutralisierender Antikörper gegen VEGF. Eine durch dreifache UVB-Bestrahlung induzierte Zunahme dermalen Blutgefäße auf das 6-fache der Blutgefäßanzahl unbestrahlter Kontrollmäuse (Kapitel 5.13, Abb. 52a) konnte durch die wiederholte intraperitoneale Injektion neutralisierender Antikörper gegen humanes VEGF signifikant gehemmt werden (Kapitel 5.13, Abb. 52d; Kapitel 5.13; Tabelle 6). Auch wenn durch die Verwendung des neutralisierenden Antikörpers gegen VEGF die UVB-induzierte Angiogenese nicht vollständig auf das Basalniveau der Blutgefäßzahl unbestrahlter Kontrollmäuse reduziert werden konnte, zeigen diese Ergebnisse im Mausmodell eindeutig eine Beteiligung von VEGF an der UVB-induzierten Neoangiogenese.

Zusätzlich zur bekannten mutagenen Schädigung durch UVB-Strahlung konnte in dieser Arbeit ein weiterer Mechanismus beschrieben werden, der durch Auslösung zellulärer Genkaskaden eine angiogenetische Wirkung der UVB-Strahlung zur Folge hat. Im folgenden soll das aus den hier vorliegenden Untersuchungen abgeleitete Modell (Abb. 56) zusammengefaßt werden:



**Abb. 56 Die UVB-bedingte autokrine Stimulierung von Tumorwachstum und Vaskularisierung fördert den Übergang eines ruhenden *in situ*-Karzinoms in sich schnell ausbreitende Malignität**

(a) Direkte UVB-induzierte DNA-Schäden in Proto-Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen resultieren in der Initiation der Photokarzinogenese und der Ausbildung eines ruhenden *in situ*-Karzinoms. (b) Eine kontinuierliche UVB-Bestrahlung führt zu einer Anhäufung von DNA-Mutationen. Zusätzlich wird durch UVB-induziertes TGF $\alpha$  nicht nur die Versorgung und Wachstumsförderung des *in situ*-Karzinoms gewährleistet, sondern auch der UVB-Effekt indirekt vermittelt, indem die Synthese des Angiogenesefaktors VEGF über ein UVB-spezifisches Element im VEGF-Promotor ausgelöst wird. (c) Durch die UVB-induzierte Freisetzung von VEGF kommt es entlang des VEGF-Konzentrationsgradienten zur Ausbildung von Kapillaren nahegelegener Blutgefäße, welche den Tumor infiltrieren und direkt mit Nährstoffen versorgen. (d) Ist erst einmal der Tumor an das Blutgefäßsystem angeschlossen, folgen schnelles Tumorwachstum, Tumordinvasion und die Ausbildung von Metastasen (modifiziert nach Martin 1996; in: Molecular Oncology).

Die Entwicklung eines durch UVB-Strahlung induzierten Tumors beginnt mit einer Schädigung von DNA, die Auswirkungen auf die Proliferationseigenschaften betroffener Zellen haben kann. Beispielsweise kann eine Mutation in Proto-Onkogenen oder in Tumorsuppressorgenen eine ruhende, teilungsinaktive Zelle zu einer verstärkten Proliferation anregen, was zu einem lokalen Zellwachstum führt. Die veränderte Zelle und ihre

Tochterzellen sind zwar morphologisch unverändert, vermehren sich jedoch stark. Zusätzlich zur ersten Mutation kann es durch wiederholte UVB-Exposition der Epidermis zu weiteren Mutationen in initiierten Tumorzellen kommen. Durch die Anhäufung von DNA-Mutationen entsteht ein ruhendes *in situ*-Karzinom, das jedoch noch keine invasiven Eigenschaften besitzt und ohne einen Anschluß an das Blutgefäßsystem in seinem Wachstum auf wenige mm<sup>3</sup> beschränkt ist (Abb. 56a). Zusätzlich wird durch UVB-Strahlung das Wachstum von dermalen Blutgefäßen angeregt, indem Angiogenesefaktoren wie VEGF nach UVB-abhängiger Aktivierung von Oberflächenrezeptoren (EGF-Rezeptor) direkt oder indirekt über TGF $\alpha$  vermittelt von den epidermalen Zellen des *in situ*-Karzinoms exprimiert und sezerniert werden (Abb. 56b). TGF $\alpha$  wirkt in diesem Fall nicht nur als Mediator der UVB-induzierten VEGF-Expression, sondern fördert auch ein weiteres Wachstum des *in situ*-Karzinoms. Nach der UVB-induzierten Freisetzung von VEGF entsteht ein Konzentrationsgradient bis in Bereiche der Dermis, wonach es zu einer Ausbildung von Kapillaren nahegelegener Blutgefäße entlang dieses VEGF-Gradienten kommt. Nach einer Zerstörung der Basalmembran durch den Tumor können die neugebildeten Blutgefäße den Tumor infiltrieren und diesen nun direkt mit Nährstoffen versorgen (Abb. 56c). Der Anschluß des Tumors an das körpereigene Blutgefäßsystem hat ein stark beschleunigtes Tumorstadium zur Folge und ermöglicht außerdem die Invasion von einzelnen Tumorzellen in das Blutgefäßsystem und die Ausbildung von Metastasen bis in entfernt liegende Körperregionen (Abb. 56d).

Zusammenfassend konnten molekulare Mechanismen der UVB-bedingten Angiogenese mit Bedeutung für ein Verständnis der UVB-induzierten Pathogenese der Haut von der Ausbildung kutaner Blutgefäße in chronisch lichtgeschädigter Haut bis zur Vaskularisation invadierender und metastasierender Hauttumoren charakterisiert werden. Eine Aufschlüsselung der molekularen Mechanismen einer UVB-induzierten Angiogenese kann zu entscheidenden Fortschritten in der Behandlung von Hautkrebstumoren führen. Außerdem kann ein besseres Verständnis der UV-abhängigen Tumorentstehung und Tumorausbreitung eine Bewußtseinsänderung der Bevölkerung erleichtern, die immer noch eine sonnengebräunte Haut als äußeres Zeichen von Gesundheit und Dynamik ansieht.

## 7. Literatur

- Ananthaswamy, H.N. und Pierceall W.E. (1990) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol*, **52**, 1119-36.
- Andley, U.P. (1987) Photodamage to the eye. *Photochem Photobiol*, **46**, 1057-66.
- Autier, P. und Dore J.F. (1998) Influence of sun exposures during childhood and during adulthood on melanoma risk. EPIMEL and EORTC Melanoma Cooperative Group. European Organisation for Research and Treatment of Cancer. *Int J Cancer*, **77**, 533-7.
- Azizkhan, J.C., Jensen D.E., Pierce A.J. und Wade M. (1993) Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **3**, 229-54.
- Babbs, C.F. und Steiner M.G. (1990) Simulation of free radical reactions in biology and medicine: a new two-compartment kinetic model of intracellular lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*, **8**, 471-85.
- Baghdiguian, S. und Fantini J. (1997) Suramin: a molecule with a broad spectrum of biological and therapeutic properties. *The Cancer Journal*, **10**, 31-37.
- Bandyopadhyay, S., Chattopadhyay D., Ghosh S.K. und Chakrabarti B. (1992) Studies on human lenses: II. Distribution and solubility of fluorescent pigments in cataractous and non-cataractous lenses of Indian origin. *Photochem Photobiol*, **55**, 765-72.
- Barnard, J.A., Graves-Deal R., Pittelkow M.R., Du Bois R., Cook P., Ramsey G.W., Bishop P.R., Damstrup L. und Coffey R.J. (1994) Auto- and cross-induction within the mammalian epidermal growth factor-related peptide family. *J Biol Chem*, **269**, 22817-22.
- Beerepoot, L.V., Shima D.T., Kuroki M., Yeo K.T. und Voest E.E. (1996) Up-regulation of vascular endothelial growth factor production by iron chelators. *Cancer Res*, **56**, 3747-51.
- Berlin, Y.U., Kiseleva O.A., Kolosov M.N., Shemyakin M.M. und Soifer V.S. (1968) Aureolic acid group of anti-tumour antibiotics. *Nature*, **218**, 193-4.
- Berman, E.R. (1991) *Biochemistry of the eye*. Plenum, New York.
- Berse, B., Brown L.F., Van de Water L., Dvorak H.F. und Senger D.R. (1992) Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, **3**, 211-20.
- Bielenberg, D.R., Bucana C.D., Sanchez R., Donawho C.K., Kripke M.L. und Fidler I.J. (1998) Molecular regulation of UVB-induced cutaneous angiogenesis. *J Invest Dermatol*, **111**, 864-72.
- Biamond, P., Swaak A.J., van Eijk H.G. und Koster J.F. (1988) Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. *Free Radic Biol Med*, **4**, 185-98.
- Bissett, D.L., Hannon D.P. und Orr T.V. (1987) An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol*, **46**, 367-78.
- Bissett, D.L., Hannon D.P. und Orr T.V. (1989) Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol*, **50**, 763-9.
- Bissett, D.L., Chatterjee R. und Hannon D.P. (1990) Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **7**, 56-62.

- Bissett, D.L., Chatterjee R. und Hannon D.P. (1991) Chronic ultraviolet radiation-induced increase in skin iron and the photoprotective effect of topically applied iron chelators. *Photochem Photobiol*, **54**, 215-23.
- Black, H.S. (1987) Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem Photobiol*, **46**, 213-21.
- Blood, C.H. und Zetter B.R. (1990) Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta*, **1032**, 89-118.
- Blum, H. (1959) *Carcinogenesis by ultraviolet light*. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ.
- Blume, S.W., Snyder R.C., Ray R., Thomas S., Koller C.A. und Miller D.M. (1991) Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene in vitro and in vivo. *J Clin Invest*, **88**, 1613-21.
- Boukamp, P., Petrussevska R.T., Breitkreutz D., Hornung J., Markham A. und Fusenig N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, **106**, 761-71.
- Boukamp, P., Popp S., Altmeyer S., Hulsen A., Fasching C., Cremer T. und Fusenig N.E. (1997) Sustained nontumorigenic phenotype correlates with a largely stable chromosome content during long-term culture of the human keratinocyte line HaCaT. *Genes Chromosomes Cancer*, **19**, 201-14.
- Bouvet, M., Ellis L.M., Nishizaki M., Fujiwara T., Liu W., Bucana C.D., Fang B., Lee J.J. und Roth J.A. (1998) Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res*, **58**, 2288-92.
- Boyer, B., Fourtanier A., Kern P. und Labat-Robert J. (1992) UVA- and UVB-induced changes in collagen and fibronectin biosynthesis in the skin of hairless mice. *J Photochem Photobiol B*, **14**, 247-59.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Brash, D.E., Rudolph J.A., Simon J.A., Lin A., McKenna G.J., Baden H.P., Halperin A.J. und Ponten J. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10124-8.
- Brash, D.E., Ziegler A., Jonason A.S., Simon J.A., Kunala S. und Leffell D.J. (1996) Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion. *J Investig Dermatol Symp Proc*, **1**, 136-42.
- Brauchle, M., Funk J.O., Kind P. und Werner S. (1996) Ultraviolet B and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem*, **271**, 21793-7.
- Brawn, K. und Fridovich I. (1980) Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol Scand Suppl*, **492**, 9-18.
- Breitkreutz, D., Bohnert A., Herzmann E., Bowden P.E., Boukamp P. und Fusenig N.E. (1984) Differentiation specific functions in cultured and transplanted mouse keratinocytes: environmental influences on ultrastructure and keratin expression. *Differentiation*, **26**, 154-69.

- Brenneisen, P., Wenk J., Klotz L.O., Wlaschek M., Briviba K., Krieg T., Sies H. und Scharffetter-Kochanek K. (1998) Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts. *J Biol Chem*, **273**, 5279-87.
- Bridges, A.J., Zhou H., Cody D.R., Rewcastle G.W., McMichael A., Showalter H.D., Fry D.W., Kraker A.J. und Denny W.A. (1996) Tyrosine kinase inhibitors. 8. An unusually steep structure-activity relationship for analogues of 4-(3-bromoanilino)-6,7-dimethoxyquinazoline (PD 153035), a potent inhibitor of the epidermal growth factor receptor. *J Med Chem*, **39**, 267-76.
- Brown, L.F., Yeo K.T., Berse B., Yeo T.K., Senger D.R., Dvorak H.F. und Van de Water L. (1992) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med*, **176**, 1375-9.
- Brown, L.F., Harrist T.J., Yeo K.T., Stahle-Backdahl M., Jackman R.W., Berse B., Tognazzi K., Dvorak H.F. und Detmar M. (1995) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in bullous pemphigoid, dermatitis herpetiformis, and erythema multiforme. *J Invest Dermatol*, **104**, 744-9.
- Brown, L.F., Tognazzi K., Dvorak H.F. und Harrist T.J. (1996) Strong expression of kinase insert domain-containing receptor, a vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptor in AIDS-associated Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. *Am J Pathol*, **148**, 1065-74.
- Brown, L.F., Detmar M., Claffey K., Nagy J.A., Feng D., Dvorak A.M. und Dvorak H.F. (1997) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *Exs*, **79**, 233-69.
- Cadet, J., Anselmino C., Douki T. und Voituriez L. (1992) Photochemistry of nucleic acids in cells. *J Photochem Photobiol B*, **15**, 277-98.
- Cavenee, W.K. und White, R.L. (1995) The genetic basis of cancer. *Sci Am*, **272**(3), 72-9.
- Cejkova, J. und Lojda Z. (1994) The damaging effect of UV rays (with the wavelength shorter than 320 nm) on the rabbit anterior eye segment. I. Early changes and their prevention by catalase-aprotinin application. *Acta Histochem*, **96**, 281-6.
- Cerutti, P.A. (1994) Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, **344**, 862-3.
- Charnock-Jones, D.S., Sharkey A.M., Boocock C.A., Ahmed A., Plevin R., Ferrara N. und Smith S.K. (1994) Vascular endothelial growth factor receptor localization and activation in human trophoblast and choriocarcinoma cells. *Biol Reprod*, **51**, 524-30.
- Chatterjee, R., Benzinger M.J., Ritter J.L. und Bissett D.L. (1990) Chronic ultraviolet B radiation-induced biochemical changes in the skin of hairless mice. *Photochem Photobiol*, **51**, 91-7.
- Chaudhri, G. und Clark I.A. (1989) Reactive oxygen species facilitate the in vitro and in vivo lipopolysaccharide-induced release of tumor necrosis factor. *J Immunol*, **143**, 1290-4.
- Chen, T.R. (1977) In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res*, **104**, 255-62.
- Cheng, L., Fu J., Tsukamoto A. und Hawley R.G. (1996) Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol*, **14**, 606-9.

- Christofori, G. und Hanahan D. (1994) Molecular dissection of multi-stage tumorigenesis in transgenic mice. *Semin Cancer Biol*, **5**, 3-12.
- Claffey, K.P., Wilkison W.O. und Spiegelman B.M. (1992) Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem*, **267**, 16317-22.
- Claffey, K.P., Senger D.R. und Spiegelman B.M. (1995) Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim Biophys Acta*, **1246**, 1-9.
- Cleaver, J.E., Jen J., Charles W.C. und Mitchell D.L. (1991) Cyclobutane dimers and (6-4) photoproducts in human cells are mended with the same patch sizes. *Photochem Photobiol*, **54**, 393-402.
- Coffey, R.J.J., Derynck R., Wilcox J.N., Bringman T.S., Goustin A.S., Moses H.L. und Pittelkow M.R. (1987) Production and auto-induction of transforming growth factor- $\alpha$  in human keratinocytes. *Nature*, **328**, 817-20.
- Cohen, T., Gitay-Goren H., Sharon R., Shibuya M., Halaban R., Levi B.Z. und Neufeld G. (1995) VEGF<sub>121</sub>, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J Biol Chem*, **270**, 11322-6.
- Coldiron, B.M. (1992) Thinning of the ozone layer: facts and consequences. *J Am Acad Dermatol*, **27**, 653-62.
- Conn, G., Bayne M.L., Soderman D.D., Kwok P.W., Sullivan K.A., Palisi T.M., Hope D.A. und Thomas K.A. (1990) Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 2628-32.
- Connolly, D.T., Olander J.V., Heuvelman D., Nelson R., Monsell R., Siegel N., Haymore B.L., Leimgruber R. und Feder J. (1989a) Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem*, **264**, 20017-24.
- Connolly, D.T., Heuvelman D.M., Nelson R., Olander J.V., Eppley B.L., Delfino J.J., Siegel N.R., Leimgruber R.M. und Feder J. (1989b) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest*, **84**, 1470-8.
- Creed, D. (1984a) The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids-I. Tryptophan and its simple derivatives. *Photochem Photobiol*, **39**, 537.
- Creed, D. (1984b) The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids-II. Tyrosine and its simple derivatives. *Photochem Photobiol*, **39**, 563.
- Creed, D. (1984c) The photophysics and photochemistry of the near-UV absorbing amino acids-III. Cystine and its simple derivatives. *Photochem Photobiol*, **39**, 577.
- Crutzen, P.J. (1992) Ozone depletion: Ultraviolet on the increase. *Nature*, **356**, 104-5.
- D'Errico, M., Calcagnile A. und Dogliotti E. (1996) Genetic alterations in skin cancer. *Ann Ist Super Sanita*, **32**, 53-63.
- Dalle-Carbonare, M. und Pathak M.A. (1989) Photoaging and the role of UV (290-400 nm) and reactive oxygen species in collagen cross-linking. *J Invest Dermatol*, **92**, 410.
- Darr, D., Combs S., Murad S. und Pinnell S. (1993) Studies on the inhibition of collagen synthesis in fibroblasts treated with paraquat. *Arch Biochem Biophys*, **306**, 267-71.

- Darr, D. und Fridovich I. (1994) Free radicals in cutaneous biology. *J Invest Dermatol*, **102**, 671-5.
- Daya-Grosjean, L., Robert C., Drougard C., Suarez H. und Sarasin A. (1993) High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res*, **53**, 1625-9.
- de Gruijl, F.R. und Van der Leun J.C. (1994) Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of a stratospheric ozone depletion. *Health Phys*, **67**, 319-25.
- de Gruijl, F.R. (1996) Photobiology of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol*, **63**, 372-5.
- de Vries, C., Escobedo J.A., Ueno H., Houck K., Ferrara N. und Williams L.T. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, **255**, 989-91.
- DeFabo, E.C. und Noonan F.P. (1983) Mechanism of immune suppression by ultraviolet irradiation in vivo. I. Evidence for the existence of a unique photoreceptor in skin and its role in photoimmunology. *J Exp Med*, **158**, 84-98.
- DeForge, L.E., Preston A.M., Takeuchi E., Kenney J., Boxer L.A. und Remick D.G. (1993) Regulation of interleukin 8 gene expression by oxidant stress. *J Biol Chem*, **268**, 25568-76.
- Detmar, M., Brown L.F., Claffey K.P., Yeo K.T., Kocher O., Jackman R.W., Berse B. und Dvorak H.F. (1994) Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis. *J Exp Med*, **180**, 1141-6.
- Detmar, M., Yeo K.T., Nagy J., Van de Water L., Brown L.F., Berse B., Elicker B.M., Ledbetter S. und Dvorak H.F. (1995) Keratinocyte-derived vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) is a potent mitogen for dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, **105**, 44-50.
- Detmar, M. (1996) Molecular regulation of angiogenesis in the skin [editorial]. *J Invest Dermatol*, **106**, 207-8.
- Detmar, M., Brown L.F., Schon M.P., Elicker B.M., Velasco P., Richard L., Fukumura D., Monsky W., Claffey K.P. und Jain R.K. (1998) Increased microvascular density and enhanced leukocyte rolling and adhesion in the skin of VEGF transgenic mice. *J Invest Dermatol*, **111**, 1-6.
- Diplock, A.T. (1994) Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects Med*, **15**, 293-376.
- Dissemond, J., Hinrichs R. und Scharffetter-Kochanek K. (1999) Vitiligo-Mehr als nur weiße Flecken (Vitiligo-More than just white spots). *H+G*, **74**, 75-9.
- Docherty, A.J., O'Connell J., Crabbe T., Angal S. und Murphy G. (1992) The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue diseases. *Trends Biotechnol*, **10**, 200-7.
- Drobetsky, E.A., Turcotte, J. und Chateauneuf, A. (1995) A role for ultraviolet A in solar mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(6), 2350-4.
- Dvorak, H.F., Dvorak A.M., Manseau E.J., Wiberg L. und Churchill W.H. (1979b) Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. *J Natl Cancer Inst*, **62**, 1459-72.

- Dvorak, H.F., Detmar M., Claffey K.P., Nagy J.A., Van de Water L. und Senger D.R. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*, **107**, 233-5.
- Elwood, J.M., Gallagher R.P., Hill G.B. und Pearson J.C. (1985b) Cutaneous melanoma in relation to intermittent and constant sun exposure--the Western Canada Melanoma Study. *Int J Cancer*, **35**, 427-33.
- Elwood, J.M. und Jopson J. (1997) Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer*, **73**, 198-203.
- European Commission (1995) The effects of environmental UV-B radiation on health & ecosystems. Ecosystems Research Report 13.
- Faller, D.V. (1999) Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **26**, 74-84.
- Farman, J.C., Gardiner B.G. und Shanklin J.D. (1985) Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub>/NO<sub>x</sub> interaction. *Nature*, **315**, 207-10.
- Ferrara, N. und Henzel W.J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **161**, 851-8.
- Fisher, D.E. (1994) Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell*, **78**, 539-42.
- Fleischmajer, R., Olsen B.R. und Kühn K. (1990) Structure, molecular biology, and pathophysiology of collagen. *Annals of the New York Academy of Science*.
- Flohé, L. (1982) Glutathione peroxidase brought into focus. In: *Free Radicals in Biology*. Pryor, W. (ed.), Vol. 5. Academic Press, New York, pp. 223.
- Folkman, J. (1972) Angiogenesis in psoriasis: therapeutic implications. *J Invest Dermatol*, **59**, 40-3.
- Folkman, J. (1984) What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest*, **51**, 601-4.
- Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid und other disease. *Nat Med*, **1**, 27-31.
- Forbes, P.D. (1981) Photocarcinogenesis: an overview. *J Invest Dermatol*, **77**, 139-43.
- Fornace, A.J.J. (1992) Mammalian genes induced by radiation; activation of genes associated with growth control. *Annu Rev Genet*, **26**, 507-26.
- Frank, S., Hubner G., Breier G., Longaker M.T., Greenhalgh D.G. und Werner S. (1995) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, **270**, 12607-13.
- Fry, D.W., Kraker A.J., McMichael A., Ambroso L.A., Nelson J.M., Leopold W.R., Connors R.W. und Bridges A.J. (1994) A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science*, **265**, 1093-5.
- Fusenig, N.E. und Boukamp P. (1998) Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog*, **23**, 144-58.
- Gilchrest, B.A. (1989) Skin aging and photoaging: an overview. *J Am Acad Dermatol*, **21**, 610-3.
- Gilchrest, B.A. (1990) Actinic injury. *Annu Rev Med*, **41**, 199-210.

- Gille, J., Swerlick R.A. und Caughman S. (1997) Transforming growth factor-alpha-induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *Embo J*, **16**, 750-9.
- Gitay-Goren, H., Halaban R. und Neufeld G. (1993) Human melanoma cells but not normal melanocytes express vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, **190**, 702-8.
- Gleadle, J.M. und Ratcliffe P.J. (1997) Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia: evidence against a regulatory role for Src kinase. *Blood*, **89**, 503-9.
- Goldberg, M.A., Dunning S.P. und Bunn H.F. (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, **242**, 1412-5.
- Goldberg, M.A. und Schneider T.J. (1994) Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem*, **269**, 4355-9.
- Grasso, J.A., Hillis T.J. und Mooney-Frank J.A. (1985) Mobilization of ferritin iron in erythroblasts by chelating agents. *Biochim Biophys Acta*, **845**, 109-18.
- Green, L.M., Reade J.L. und Ware C.F. (1984) Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines. *J Immunol Methods*, **70**, 257-68.
- Green, C., Lakshmi pathi T., Johnson B.E. und Ferguson J. (1992) A comparison of the efficacy and relapse rates of narrowband UVB (TL-01) monotherapy vs. etretinate (re-TL-01) vs. etretinate-PUVA (re-PUVA) in the treatment of psoriasis patients. *Br J Dermatol*, **127**, 5-9.
- Green, C., Diffey B.L. und Hawk J.L. (1992) Ultraviolet radiation in the treatment of skin disease. *Phys Med Biol*, **37**, 1-20.
- Greenblatt, M.S., Bennett W.P., Hollstein M. und Harris C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, **54**, 4855-78.
- Grossweiner, L.I. (1984) Photochemistry of proteins: a review. *Curr Eye Res*, **3**, 137-44.
- Halasz, C.L. (1999) Narrowband UVB phototherapy for psoriasis: results with fixed increments by skin type (as opposed to percentage increments). *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **15**, 81-4.
- Halliwell, B. (1981) The biological effects of the superoxide radical and its products. *Bull Eur Physiopathol Respir*, **17** (Suppl), 21-9.
- Halliwell, B. und Aruoma O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, **281**, 9-19.
- Hanahan, D. und Folkman J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, **86**, 353-64.
- Hansen, M.B., Nielsen S.E. und Berg K. (1989) Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, **119**, 203-10.
- Hardenbol, P. und Van Dyke M.W. (1992) In vitro inhibition of c-myc transcription by mithramycin. *Biochem Biophys Res Commun*, **185**, 553-8.

- Hardingham, T.E. und Fosang A.J. (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J*, **6**, 861-70.
- Hayek, A., Culler F.L., Beattie G.M., Lopez A.D., Cuevas P. und Baird A. (1987) An in vivo model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **147**, 876-80.
- Häder, D.P. und Tevini M. (1987) *General Photobiology*. Pergamon, Oxford.
- Heldin, C.H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. *Cell*, **80**, 213-23.
- Herrmann, G., Wlaschek M., Lange T.S., Prenzel K., Goerz G. und Scharffetter-Kochanek K. (1993) UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol*, **2**, 92-7.
- Herzinger, T., Funk J.O., Hillmer K., Eick D., Wolf D.A. und Kind P. (1995b) Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene*, **11**, 2151-6.
- Hibi, M., Lin A., Smeal T., Minden A. und Karin M. (1993) Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*, **7**, 2135-48.
- Hightower, K.R., McCready J.P. und Borchman D. (1994) Membrane damage in UV-irradiated lenses. *Photochem Photobiol*, **59**, 485-90.
- Houck, K.A., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B. und Leung D.W. (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, **5**, 1806-14.
- Houck, K.A., Leung D.W., Rowland A.M., Winer J. und Ferrara N. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, **267**, 26031-7.
- Hruza, L.L. und Pentland A.P. (1993) Mechanisms of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol*, **100**, 35S-41S.
- Ikeda, E., Achen M.G., Breier G. und Risau W. (1995) Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem*, **270**, 19761-6.
- Imagawa, M., Chiu R. und Karin M. (1987) Transcription factor AP-2 mediates induction by two different signal-transduction pathways: protein kinase C and cAMP. *Cell*, **51**, 251-60.
- Inoue, S., Ito K., Yamamoto K. und Kawanishi S. (1992) Caffeic acid causes metal-dependent damage to cellular and isolated DNA through H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation. *Carcinogenesis*, **13**, 1497-502.
- Jung, E. (1992) Photokarzinogenese der Haut. In: *Licht und Haut*. Macher, E., Bröcker, E.B. und Kolde, G. (eds), Biermann, Zülpich, pp. 179.
- Jurkiewicz, B.A. und Buettner G.R. (1994) Ultraviolet light-induced free radical formation in skin: an electron paramagnetic resonance study. *Photochem Photobiol*, **59**, 1-4.
- Jurkiewicz, B.A. und Buettner G.R. (1996) EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human. *Photochem Photobiol*, **64**, 918-22.
- Kahari V.M. und Saarialho-Kere U. (1997) Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol*, **6**(5), 199-213.

- Kamb, A. (1994) Cancer. Sun protection factor p53 [news; comment]. *Nature*, **372**, 730-1.
- Keck, P.J., Hauser S.D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J. und Connolly D.T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, **246**, 1309-12.
- Keyse, S.M. (1993) The induction of gene expression in mammalian cells by radiation. *Semin Cancer Biol*, **4**, 119-28.
- Kiefer, J. (1990) *Biological Radiation Effects*. Springer, Berlin.
- Kiefer, J., Zölzer F., Schall M., Brieden K., Heil B., Al-Talibi A., Rase S. und Weber K.K.J. (1990) *Zelluläre Wirkungen mono- und polychromatischer UV-B-Strahlung*. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München.
- Kieser, A., Weich H.A., Brandner G., Marme D. und Kolch W. (1994) Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene*, **9**, 963-9.
- Kielty C.M. und Shuttleworth C.A. (1997) Microfibrillar elements of the dermal matrix. *Microsc Res Tech*, **38**(4), 413-27.
- Kim, K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H.S. und Ferrara N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, **362**, 841-4.
- King, L.E.J., Gates R.E., Stoscheck C.M. und Nanney L.B. (1990) The EGF/TGF alpha receptor in skin. *J Invest Dermatol*, **94**, 164S-170S.
- Klagsbrun, M. und Soker S. (1993) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF). The angiogenesis factor found? *Current Biology*, **3**, 699-702.
- Klausner, R.D., Rouault T.A. und Harford J.B. (1993) Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. *Cell*, **72**, 19-28.
- Kligman, L.H., Akin F.J. und Kligman A.M. (1982) Prevention of ultraviolet damage to the dermis of hairless mice by sunscreens. *J Invest Dermatol*, **78**, 181-9.
- Kligman, L.H. und Kligman A.M. (1986) The nature of photoaging: its prevention and repair. *Photodermatol*, **3**, 215-27.
- Kligman, L.H. und Gebre M. (1991) Biochemical changes in hairless mouse skin collagen after chronic exposure to ultraviolet-A radiation. *Photochem Photobiol*, **54**, 233-7.
- Kligman, L.H. (1991) The hairless mouse and photoaging. *Photochem Photobiol*, **54**, 1109-18.
- Kligman, A.M. und Leyden J.J. (1993) Treatment of photoaged skin with topical tretinoin. *Skin Pharmacol*, **1**, 78-82.
- Kolch, W., Martiny-Baron G., Kieser A. und Marme D. (1995) Regulation of the expression of the VEGF/VPS and its receptors: role in tumor angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat*, **36**, 139-55.
- Koster, W. und Wiskemann A. (1990) Phototherapy with UV-B in vitiligo. *Z Hautkr*, **65**, 1022-4.
- Kourembanas, S., McQuillan L.P., Leung G.K. und Faller D.V. (1993) Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest*, **92**, 99-104.

- Kugler, A. (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res*, **19**(2C), 1589-92.
- Koivukangas, V., Kallioinen, M., Autio-Harminen, H. und Oikarinen, A. (1994) UV irradiation induces the expression of gelatinases in human skin in vivo. *Acta Derm Venereol*, **74**(4), 279-82.
- Larcher, F., Robles A.I., Duran H., Murillas R., Quintanilla M., Cano A., Conti C.J. und Jorcano J.L. (1996) Up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in mouse skin carcinogenesis correlates with malignant progression state and activated H-ras expression levels. *Cancer Res*, **56**, 5391-6.
- Lehman, T.A., Modali R., Boukamp P., Stanek J., Bennett W.P., Welsh J.A., Metcalf R.A., Stampfer M.R., Fusenig N. und Rogan E.M. (1993) p53 mutations in human immortalized epithelial cell lines [published erratum appears in *Carcinogenesis* 1993 Jul; 14(7):1491]. *Carcinogenesis*, **14**, 833-9.
- Leung, D.W., Cachianes G., Kuang W.J., Goeddel D. und Ferrara N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306-9.
- Levy, A.P., Levy N.S., Loscalzo J., Calderone A., Takahashi N., Yeo K.T., Koren G., Colucci W.S. und Goldberg M.A. (1995) Regulation of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes. *Circ Res*, **76**, 758-66.
- Levy, N.S., Goldberg M.A. und Levy A.P. (1997) Sequencing of the human vascular endothelial growth factor (VEGF) 3' untranslated region (UTR): conservation of five hypoxia-inducible RNA-protein binding sites. *Biochim Biophys Acta*, **1352**, 167-73.
- Levy, A.P., Levy N.S., Iliopoulos O., Jiang C., Kaplin W.G.J. und Goldberg M.A. (1997) Regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia and its modulation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Kidney Int*, **51**, 575-8.
- Leyden, J.J. (1990) Clinical features of ageing skin. *Br J Dermatol*, **35**, 1-3.
- Liotta, L.A., Kleinerman J. und Saidel G.M. (1974) Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, **34**, 997-1004.
- Liu, Y., Cox S.R., Morita T. und Kourembanas S. (1995) Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res*, **77**, 638-43.
- Lloyd, S.A. (1993) Stratospheric ozone depletion. *Lancet*, **342**, 1156-8.
- Longstreth, J., de Grujil F.R., Kripke M.L., Abseck S., Arnold F., Slaper H.I., Velders G., Takizawa Y. und Van der Leun J.C. (1998) Health risks. *J Photochem Photobiol B*, **46**, 20-39.
- Longuet-Perret, I., Schmitt D. und Viac J. (1998) Tumour necrosis factor-alpha is involved in the contrasting effects of ultraviolet B and ultraviolet A1 radiation on the release by normal human keratinocytes of vascular permeability factor. *Br J Dermatol*, **138**, 221-4.
- Lowry, O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-75.
- Luca, M., Huang, S., Gershenwald, J.E., Singh, R.K., Reich, R. und Bar-Eli, M. (1997) Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis. *Am J Pathol*, **151**(4), 1105-13.

- Madronich, S. und de Gruijl F.R. (1994) Stratospheric ozone depletion between 1979 and 1992: implications for biologically active ultraviolet-B radiation and non-melanoma skin cancer incidence. *Photochem Photobiol*, **59**, 541-6.
- Mai, S., Stein B., Van den Berg S., Kaina B., Lucke-Huhle C., Ponta H., Rahmsdorf H.J., Kraemer M., Gebel S. und Herrlich P. (1989) Mechanisms of the ultraviolet light response in mammalian cells. *J Cell Sci*, **94**, 609-15.
- Maitre, B., Jornot L. und Junod A.F. (1993) Effects of inhibition of catalase and superoxide dismutase activity on antioxidant enzyme mRNA levels. *Am J Physiol*, **265**, 636-43.
- Margelin, D., Fourtanier A., Thevenin T., Medaisko C., Breton M. und Picard J. (1993) Alterations of proteoglycans in ultraviolet-irradiated skin. *Photochem Photobiol*, **58**, 211-8.
- Marmé, D. (1996) Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol*, **14**, 166-74.
- Martin, G.S. (1996) Normal cells and cancer cells. In: *Molecular Oncology*. Bishop, J.M. und Weinberg, R.A. (eds), Scientific American, New York, pp. 13.
- Masaki, H., Atsumi T. und Sakurai H. (1995) Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation. *Biochem Biophys Res Commun*, **206**, 474-9.
- Matrisian, L.M. (1992) The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*, **14**, 455-63.
- Matsumoto, K., Sugiyama M. und Ogura R. (1991) Non-dimer DNA damage in Chinese hamster V-79 cells exposed to ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol*, **54**, 389-92.
- Millauer, B., Wизigmann-Voos S., Schnurch H., Martinez R., Moller N.P., Risau W. und Ullrich A. (1993) High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*, **72**, 835-46.
- Millauer, B., Shawver L.K., Plate K.H., Risau W. und Ullrich A. (1994) Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature*, **367**, 576-9.
- Miller, D.M., Polansky D.A., Thomas S.D., Ray R., Campbell V.W., Sanchez J. und Koller C.A. (1987) Mithramycin selectively inhibits transcription of G-C containing DNA. *Am J Med Sci*, **294**, 388-94.
- Mitchell, D.L. und Nairn R.S. (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem Photobiol*, **49**, 805-19.
- Mitchell, D.L., Jen J. und Cleaver J.E. (1991) Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol*, **54**, 741-6.
- Moan, J. und Peak M.J. (1989) Effects of UV radiation of cells. *J Photochem Photobiol B*, **4**, 21-34.
- Molina, M.J. und Rowland F.S. (1974) Stratospheric Sink for Chlorofluoromethanes: Chlorine-Atom Catalyzed Destruction of the Ozone. *Nature*, **249**, 810-14.
- Monboisse, J.C. und Borel J.P. (1992) Oxidative damage to collagen. *Exs*, **62**, 323-7.
- Morlière, P., Moysan A., Santus R., Huppe G., Maziere J.C. und Dubertret L. (1991) UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, **1084**, 261-8.

- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.
- Mukhtar, H. und Elmets C.A. (1996) Photocarcinogenesis: mechanisms, models and human health implications. *Photochem Photobiol*, **63**, 356-7.
- Oikarinen, A., Karvonen J., Uitto J. und Hannuksela M. (1985) Connective tissue alterations in skin exposed to natural and therapeutic UV-radiation. *Photodermatol*, **2**, 15-26.
- Oikarinen, A. (1990) The aging of skin: chronoaging versus photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **7**, 3-4.
- Oxholm, A., Oxholm P., Staberg B. und Bendtzen K. (1988) Immunohistological detection of interleukin I-like molecules and tumour necrosis factor in human epidermis before and after UVB-irradiation in vivo. *Br J Dermatol*, **118**, 369-76.
- Park, J.E., Keller G.A. und Ferrara N. (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, **4**, 1317-26.
- Parks, D.A. und Granger D.N. (1986) Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl*, **548**, 87-99.
- Pathak, M.A., Dalle-Carbonare M. und Mobilio S. (1990) The role of reactive oxygen ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\cdot\text{OH}$ ) in collagen-crosslinking and photoaging. *J Invest Dermatol*, **94**, 564.
- Pathak, M.A. und Dalle-Carbonare M. (1992) Reactive oxygen species in photoaging and biochemical studies in the amelioration of photoaging changes. In: *Biological responses to ultraviolet A radiation*. Urbach, F. (ed.), Valenmar Publishing Company, Overland Park, Kansas, pp. 189.
- Paul, B.S., Larkö O., Swanbeck G. und Parrish J.A. (1993) Therapeutic photomedicine: Phototherapy. In: *Dermatology in general medicine*. Fitzpatrick, T., Eisen, A.Z., Wolff, K., Freedberg, I.M. and Austen, K.F. (eds), McGraw-Hill, New York, pp. 1717.
- Peak, M.J., Peak J.G. und Carnes B.A. (1987) Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far- and near-ultraviolet radiations: action spectrum and mechanisms. *Photochem Photobiol*, **45**, 381-7.
- Peak, M.J. und Peak J.G. (1989) Solar-ultraviolet-induced damage to DNA. *Photodermatol*, **6**, 1-15.
- Pepper, M.S., Ferrara N., Orci L. und Montesano R. (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 824-31.
- Perez, S., Sergent O., Morel P., Chevanne M., Dubos M.P., Cillard P. und Cillard J. (1995) [Kinetics of lipid peroxidation induced by UV beta rays in human keratinocyte and fibroblast cultures]. *C R Seances Soc Biol Fil*, **189**, 453-65.
- Petersen, M.J., Hansen C. und Craig S. (1992) Ultraviolet A irradiation stimulates collagenase production in cultured human fibroblasts. *J Invest Dermatol*, **99**, 440-4.
- Peus, D., Vasa R.A., Meves A., Pott M., Beyerle A., Squillace K. und Pittelkow M.R. (1998)  $\text{H}_2\text{O}_2$  is an important mediator of UVB-induced EGF-receptor phosphorylation in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol*, **110**, 966-71.
- Phillips, P.G., Birnby L.M. und Narendran A. (1995) Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells. *Am J Physiol*, **268**, 789-800.

- Picot, E., Meunier L., Picot-Debeze M.C., Peyron J.L. und Meynadier J. (1992) Treatment of psoriasis with a 311-nm UVB lamp. *Br J Dermatol*, **127**, 509-12.
- Piva, M., Flieger O. und Rider V. (1996) Growth factor control of cultured rat uterine stromal cell proliferation is progesterone dependent. *Biol Reprod*, **55**, 1333-42.
- Plaza, S., Boullard A., Pele D., Cornelis J.J., Rommelaere J., Giacomoni P.U. und Prunieras M. (1991) Unscheduled DNA synthesis: a quantitative indicator of residual immunodetectable pyrimidine dimers in human fibroblasts after ultraviolet-B irradiation. *Photochem Photobiol*, **53**, 217-27.
- Pogulis, R.J., Vallejo A.N. und Pease L.R. (1996) In vitro recombination and mutagenesis by overlap extension PCR. *Methods Mol Biol*, **57**, 167-76.
- Poltorak, Z., Cohen T., Sivan R., Kandelis Y., Spira G., Vlodavsky I., Keshet E. und Neufeld G. (1997) VEGF<sub>145</sub>, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J Biol Chem*, **272**, 7151-8.
- Quinn, T.P., Peters K.G., De V.C., Ferrara N. und Williams L.T. (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 7533-7.
- Raab, W.P. (1990) Photodamaged skin: a medical or a cosmetic concern? *J Int Med Res*, **18**, 2C-7C.
- Ray, R., Snyder R.C., Thomas S., Koller C.A. und Miller D.M. (1989) Mithramycin blocks protein binding and function of the SV40 early promoter. *J Clin Invest*, **83**, 2003-7.
- Ray, R., Thomas S. und Miller D.M. (1990) Mithramycin selectively inhibits the transcriptional activity of a transfected human c-myc gene. *Am J Med Sci*, **300**, 203-8.
- Risau, W. und Flamme I. (1995) Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**, 73-91.
- Risau, W. (1996) What, if anything, is an angiogenic factor? *Cancer Metastasis Rev*, **15**, 149-51.
- Rosette, C. und Karin M. (1996) Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*, **274**, 1194-7.
- Ross, R. (1975) Connective tissue cells, cell proliferation and synthesis of extracellular matrix-a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **271**(912), 247-59.
- Rowe, D.E., Carroll R.J. und Day C.L.J. (1992) Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol*, **26**, 976-90.
- Rusch, H.P. und Bauman C.A. (1939) Tumor production in mice with ultraviolet irradiation. *Am J Cancer*, **35**, 55.
- Ryuto, M., Ono M., Izumi H., Yoshida S., Weich H.A., Kohno K. und Kuwano M. (1996) Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP-1. *J Biol Chem*, **271**, 28220-8.
- Sage, E. (1993) Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochem Photobiol*, **57**, 163-74.
- Salmon, S., Maziere J.C., Santus R., Morliere P. und Bouchemal N. (1990) UVB-induced photoperoxidation of lipids of human low and high density lipoproteins. A possible role of tryptophan residues. *Photochem Photobiol*, **52**, 541-5.

- Scharffetter, K., Heckmann M., Hatamochi A., Mauch C., Stein B., Riethmuller G., Ziegler-Heitbrock H.W. und Krieg T. (1989) Synergistic effect of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on collagen synthesis of human skin fibroblasts in vitro. *Exp Cell Res*, **181**, 409-19.
- Scharffetter, K., Wlaschek M., Hogg A., Bolsen K., Schothorst A., Goerz G., Krieg T. und Plewig G. (1991) UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res*, **283**, 506-11.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek M., Bolsen K., Herrmann G., Lehman P., Goerz C., Mauch C. und Plewig G. (1992) Mechanisms of cutaneous photoaging. In: *The environmental threat to the skin*. Plewig, G., Marks, R. und Martin, R. (eds), Dunitz Publishers, London, pp. 72.
- Scharffetter-Kochanek, K. und Schwarz T. (1996) *Wirkung von UV-B Strahlung auf den Menschen*. GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek M., Brenneisen P., Schauen M., Blanduschun R. und Wenk J. (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol Chem*, **378**, 1247-57.
- Schmidt, J., Schmitt C., Kojima M. und Hockwin O. (1992) Biochemical and morphological changes in rat lenses after long-term UV B irradiation. *Ophthalmic Res*, **24**, 317-25.
- Schwartz, E., Feinberg, E., Lebowitz, M., Mariani, T.J. und Boyd, C.D. (1995) Ultraviolet radiation increases tropoelastin accumulation by a post-transcriptional mechanism in dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol*, **105**(1), 65-9.
- SCOPE (1992) Increased Ultraviolet Radiation on Biological Systems. Scientific Committee on Problems of the Environment, Budapest.
- Seghezzi, G., Patel S., Ren C.J., Gualandris A., Pintucci G., Robbins E.S., Shapiro R.L., Galloway A.C., Rifkin D.B. und Mignatti P. (1998) Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J Cell Biol*, **141**, 1659-73.
- Sen, A.C., Ueno N. und Chakrabarti B. (1992) Studies on human lens: I. Origin and development of fluorescent pigments. *Photochem Photobiol*, **55**, 753-64.
- Senger, D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S. und Dvorak H.F. (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, **219**, 983-5.
- Senger, D.R., Perruzzi C.A., Feder J. und Dvorak H.F. (1986) A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res*, **46**, 5629-32.
- Senger, D.R., Connolly D.T., Van d.W.L., Feder J. und Dvorak H.F. (1990) Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*, **50**, 1774-8.
- Shindo, Y., Witt E., Han D. und Packer L. (1994) Dose-response effects of acute ultraviolet irradiation on antioxidants and molecular markers of oxidation in murine epidermis and dermis. *J Invest Dermatol*, **102**, 470-5.
- Sies, H. (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr*, **69**, 965-8.

- Singh, S. und Hider R.C. (1994) Therapeutic iron-chelating agents. In: *Free radical damage and its control*. Rice-Evans, C.A. und Burdon, R.H. (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 189.
- Singh, R.K., Gutman, M., Reich, R. und Bar-Eli, M. (1995) Ultraviolet B irradiation promotes tumorigenic and metastatic properties in primary cutaneous melanoma via induction of interleukin 8. *Cancer Res*, **55**(16), 3669-74.
- Skobe, M., Rockwell P., Goldstein M.A., Vosseler S. und Fusenig N.E. (1997) Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. *Nat Med*, **3**, 1222-7.
- Slaper, H., Velders G.J., Daniel J.S., de Gruijl F.R. und Van der Leun J.C. (1996) Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna Convention achievements. *Nature*, **384**, 256-8.
- Smith, K.C. (1989) *The Science of Photobiology* (2nd edn). Plenum, New York.
- Snyder, R.C., Ray R., Blume S. und Miller D.M. (1991) Mithramycin blocks transcriptional initiation of the c-myc P1 and P2 promoters. *Biochemistry*, **30**, 4290-7.
- Soffen, G.A. und Blum H.F. (1961) Quantitative measurements of changes in mouse skin following a single dose of ultraviolet light. *J Cell Compar Physiol*, **58**, 81-96.
- Sorber, A.J., Rhodes A.R., Mihm M.C. und Fitzpatrick T.B. (1987) Malignant melanoma. In: *Dermatology in general medicine*. Fitzpatrick, T.B., Eizen, A.Z. und Wolff, K. (eds), McGraw-Hill, Austen, pp. 947.
- SORG (1990) United Kingdom Stratospheric Ozone Review Group Third Report. *London: HMSO*.
- Spiro, S., Roberts R.E. und Guest J.R. (1989) FNR-dependent repression of the ndh gene of Escherichia coli and metal ion requirement for FNR-regulated gene expression. *Mol Microbiol*, **3**, 601-8.
- Starcher, B., Pierce, R. und Hinek, A. (1999) UVB irradiation stimulates deposition of new elastic fibers by modified epithelial cells. *J Invest Dermatol*, **112**(4), 450-5.
- Stein, B., Rahmsdorf H.J., Steffen A., Litfin M. und Herrlich P. (1989) UV-induced DNA damage is an intermediate step in UV-induced expression of human immunodeficiency virus type 1, collagenase, c-fos, and metallothionein. *Mol Cell Biol*, **9**, 5169-81.
- Stern, R.S. und Laird N. (1994) The carcinogenic risk of treatments for severe psoriasis. Photochemotherapy Follow-up Study. *Cancer*, **73**, 2759-64.
- Stipek, S., Novak L., Crkovska J., Zima T. und Platenik J. (1994) Xanthine oxidoreductase. Biochemical, biological and pathogenic functions. *Sb Lek*, **95**, 289-95.
- Tada-Oikawa, S., Oikawa, S., Kawanishi, S. (1998) Role of ultraviolet A-induced oxidative DNA damage in apoptosis via loss of mitochondrial membrane potential and caspase-3 activation. *Biochem Biophys Res Commun*, **247**(3), 693-6.
- Taira, J., Mimura K., Yoneya T., Hagi A., Murakami A. und Makino K. (1992) Hydroxyl radical formation by UV-irradiated epidermal cells. *J Biochem*, **111**, 693-5.
- Tanaka, H., Okada T., Konishi H. und Tsuji T. (1993) The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res*, **285**, 352-5.
- Terman, B.I., Dougher-Vermazen M., Carrion M.E., Dimitrov D., Armellino D.C., Gospodarowicz D. und Bohlen P. (1992a) Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **187**, 1579-86.

- Terman, B.I., Jani-Sait S., Carrion M.E. und Shows T.B. (1992b) The KDR gene maps to human chromosome 4q31.2---q32, a locus which is distinct from locations for other type III growth factor receptor tyrosine kinases. *Cytogenet Cell Genet*, **60**, 214-5.
- Tischer, E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J.C. und Abraham J.A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, **266**, 11947-54.
- Trautinger, F., Trenz A., Raff M. und Kokoschka E.M. (1989) Influence of radiation on dermal collagen content in hairless mice. *Arch Dermatol Res*, **281**, 144.
- Trautinger, F., Gruenwald C., Trenz A., Pittermann W. und Kokoschka E.M. (1991) Influence of natural vitamin E and UV radiation on dermal collagen content in hairless mice. *Arch Dermatol Res*, **282**, 39.
- Tyrrell, R.M. (1991) UVA (320-380 nm) radiation as an oxidative stress. In: *Oxidative stress, Oxidants and antioxidants*. Sies, H. (ed.), Academic Press, London, pp. 57.
- Uitto, J., Matsuoka L.Y. und Kornberg R.L. (1986) Elastic fibers in cutaneous elastoses. Biological causes and clinical solutions. In: *Problems in Aesthetic surgery*. Rudolf, R. und Mosby, C.V. (eds), Co, St Louis, pp. 307.
- UNEP (1989) Environmental effects panel report. United Nations Environment Programme, Nairobi, KENYA.
- UNEP (1991) Environmental effects of ozone depletion (update). United Nations Environment Programme, Nairobi, KENYA.
- Urbach, F. und Gange R.W. (1986) *The biological effects of UV-A radiation*. Praeger, New York.
- Van der Leun, J.C. und Van Weelden H. (1986) UVB phototherapy: principles, radiation sources, regimens. *Curr Probl Dermatol*, **15**, 39-51.
- Van der Rest, M. und Garrone R. (1991) Collagen family of proteins. *Faseb J*, **5**, 2814-23.
- Van Dyke, M.W. und Dervan P.B. (1983) Chromomycin, mithramycin, and olivomycin binding sites on heterogeneous deoxyribonucleic acid. Footprinting with (methidiumpropyl-EDTA)iron(II). *Biochemistry*, **22**, 2373-7.
- Viac, J., Palacio S., Schmitt D. und Claudy A. (1997) Expression of vascular endothelial growth factor in normal epidermis, epithelial tumors and cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res*, **289**, 158-63.
- Vitaliano, P.P. und Urbach F. (1980) The relative importance of risk factors in nonmelanoma carcinoma. *Arch Dermatol*, **116**, 454-6.
- Vogelstein, B. und Kinzler K.W. (1992b) p53 function and dysfunction. *Cell*, **70**, 523-6.
- Webb, A.R. und Holick M.F. (1988) The role of sunlight in the cutaneous production of vitamin D3. *Annu Rev Nutr*, **8**, 375-99.
- Weidner, N., Folkman J., Pozza F., Bevilacqua P., Allred E.N., Moore D.H., Meli S. und Gasparini G. (1992) Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **84**, 1875-87.
- Wendel, A., Niehörster M. und Tiegs G. (1991) Interactions between reactive oxygen and mediators of sepsis and shock. In: *Oxidative stress*. Sies, H. (ed.), Academic Press, London, pp. 585.

- Weninger, W., Uthman A., Pammer J., Pichler A., Ballaun C., Lang I.M., Plettenberg A., Bankl H.C., Sturzl M. und Tschachler E. (1996) Vascular endothelial growth factor production in normal epidermis and in benign and malignant epithelial skin tumors. *Lab Invest*, **75**, 647-57.
- Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A., Briviba, K., Oberley, T.D., Scharffetter-Kochanek, K. (1999) Stable overexpression of manganese superoxide dismutase in mitochondria identifies hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degrading metalloprotease-1. *J Biol Chem*, **274**(36), 25869-76.
- Werner, S., Peters K.G., Longaker M.T., Fuller-Pace F., Banda M.J. und Williams L.T. (1992) Large induction of keratinocyte growth factor expression in the dermis during wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 6896-900.
- West, M.D. (1994) The cellular and molecular biology of skin aging. *Arch Dermatol*, **130**, 87-95.
- Westerhof, W. und Nieuweboer-Krobotova L. (1997) Treatment of vitiligo with UV-B radiation vs topical psoralen plus UV-A. *Arch Dermatol*, **133**, 1525-8.
- Williams, T. und Tjian R. (1991) Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2. *Genes Dev*, **5**, 670-82.
- Wlaschek, M., Bolsen K., Herrmann G., Schwarz A., Wilmroth F., Heinrich P.C., Goerz G. und Scharffetter-Kochanek K. (1993) UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived-collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage? *J Invest Dermatol*, **101**, 164-8.
- Wlaschek, M., Heinen G., Poswig A., Schwarz A., Krieg T. und Scharffetter-Kochanek K. (1994) UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase/MMP-1 by interrelated loops of interleukin-1 and interleukin-6. *Photochem Photobiol*, **59**, 550-6.
- Wlaschek, M., Briviba K., Stricklin G.P., Sies H. und Scharffetter-Kochanek K. (1995) Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase. *J Invest Dermatol*, **104**, 194-8.
- Wlaschek, M., Wenk, J., Brenneisen, P., Briviba, K., Schwarz, A., Sies, H. und Scharffetter-Kochanek, K. (1997) Singlet oxygen is an early intermediate in cytokine-dependent ultraviolet-A induction of interstitial collagenase in human dermal fibroblasts in vitro. *FEBS Lett*, **413**(2), 239-42.
- Young, A.R., Plastow S.R., Harrison J.A., Walker S.L. und Hawk J.C.M. (1992) UV-A-induced changes in mouse skin collagen. In: *Biological responses to ultraviolet A radiation*. Urbach, F. (ed.), Academic Press, London, pp. 217.
- Zhu, H. und Bunn H.F. (1999) Oxygen sensing and signaling: impact on the regulation of physiologically important genes. *Respir Physiol*, **115**, 239-47.
- Ziegler, A., Jonason A.S., Leffell D.J., Simon J.A., Sharma H.W., Kimmelman J., Remington L., Jacks T. und Brash D.E. (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, **372**, 773-6.
- Zölzer, F. und Kiefer J. (1989) Zelluläre Wirkungen der ultravioletten Komponente des Sonnenlichts. *Naturwissenschaften*, **76**, 489.

## 8. Abkürzungen

Ø	Durchmesser
%	Prozent
A	Absorption
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivierendes Protein 1
AP	Alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATZ	Aminotriazol
BCC	Basal cell carcinoma (engl.), Basaliom
bFGF	Basic fibroblast growth factor (engl.), Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
bp	Basenpaar(e)
β-Gal	β-Galactosidase
BCC	Basal cell carcinoma (engl.), Basalzellkarzinom (Basaliom)
BSA	Bovine serum albumin (engl.), Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CM	Cutaneous melanoma (engl.), Kutanes Melanom
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CTP	Cytosin-5'-triphosphat
d	Dichte
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
DDC	Diethyldithiocarbamat
DFO	Desferrioxamin

---

dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
dH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	Doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
ECM	Extracellular matrix (engl.), Extrazelluläre Matrix
E. coli	Escherichia coli
EcoR I	Restriktionsendonuklease aus E. coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor (engl.), Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (engl.)
FCS	Fetal calf serum (engl.), Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor (engl.), Fibroblasten-Wachstumsfaktor
g	Gramm
xg	Erdbeschleunigung
GSHPx	Glutathionperoxidase
h	Stunde
h	Plancksches Wirkungsquantum ( $h = 6,62608 \times 10^{-34}$ Js)
Hind III	Restriktionsendonuklease aus Haemophilus influenza
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
J	Joule
kbp	Kilobasenpaare
l	Liter
LB	Luria broth
M	Molarität, Stoffmengenkonzentration
min	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloproteinase

---

MnSOD	Mangansuperoxiddismutase
mol	Stoffmenge
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
n.i. IgG	Nicht-immunspezifisches IgG
NMSC	Non-melanoma skin cancer (engl.), Nicht-melanozytärer Hautkrebs
v	Frequenz einer elektromagnetischen Welle (Einheit: Hertz [Hz])
OD	Optische Dichte
OD <sub>260</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Plateled derived growth factor (engl.), Plättchen-Wachstumsfaktor
PEG	Polyethylenglykol
pH	Pondus hydrogenii
PHGPx	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase
PIGF	Placenta growth factor (engl.), Plazenta-Wachstumsfaktor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SCC	Squamous cell carcinoma (engl.), Plattenepithelkarzinom
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
Skh1	Haarloser Mausstamm
SOD	Superoxiddismutase
ss	Einzelsträngig
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBA	Thiobarbitursäure
TBE	Trisbase mit Borsäure und EDTA

---

TBS	Tris buffered saline, Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylendiamin
TGF $\alpha$	Transforming growth factor alpha (engl.), Transformierender Wachstumsfaktor alpha
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha (engl.), Tumor-Nekrose-Faktor alpha
U	Unit = Enzymeinheit
üN	Über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
VEGF	Vascular endothelial growth factor (engl.), Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VPF	Vascular permeability factor (engl.), Vaskulärer Permeabilitätsfaktor
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	-fache Erdbeschleunigung
Xho I	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas campestris</i>

Es wurden folgende Fachtermini verwendet, deren Übersetzung ins Deutsche schwierig und in der molekularbiologischen Literatur auch nicht üblich ist:

Blot	Übertragung von RNA, DNA oder Proteinen auf Nitrozellulose- oder Nylonmembranen
Primer	Kurzer, komplementärer DNA- oder RNA-Abschnitt, an dessen 3'-Ende eine DNA-Polymerase die Verlängerung beginnen kann
RNase Protection Assay	Sensitives Verfahren zum RNA-Nachweis. Dieses Verfahren beruht auf der Ausbildung doppelsträngiger, vor einem Abbau durch RNAsen geschützter RNA-Bereiche und dem Abbau einzelsträngiger RNA durch RNAsen und erfolgt vor der Übertragung von RNA auf Nitrozellulose- oder Nylonmembranen.

## **Danksagung**

Frau Professor Karin Scharffetter-Kochanek möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas, für ihren Beistand und ihre Unterstützung besonders danken. Ihre stetige Diskussionsbereitschaft hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Professor Renate Renkawitz-Pohl danke ich für die Betreuung dieser Dissertation und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Herzlichen Dank an Jutta Wenk, Peter Brenneisen und Meinhard Wlaschek, die mir mit vielen wertvollen Tips und Ratschlägen und ständiger Diskussionsbereitschaft zur Seite standen.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und ein ausgezeichnetes Arbeitsklima. Dieser Dank gilt besonders Christina Hommel und Gudrun Quel, die mich mit viel Geduld in neue Methoden eingeführt haben.

Herrn Professor Michael Bölker und Herrn Professor Gerhard Heldmaier danke ich ebenfalls für die Begutachtung dieser Arbeit.

Meiner Frau danke ich für die viele Geduld und liebevolle Unterstützung während meiner Dissertationszeit in Köln.

## **Erklärung**

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

**Die UVB-abhängige Induktion des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) wird in epidermalen Zellen autokrin durch den Transformierenden Wachstumsfaktor alpha (TGF $\alpha$ ) reguliert:  
Bedeutung für die UVB-induzierte Angiogenese**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

# Lebenslauf

## R A L F B L A U D S C H U N

### PERSÖNLICHE ANGABEN:

---

Geburtsdatum: 15.09.1970  
Geburtsort: Vechta  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: verheiratet

### AUSBILDUNG

---

1976 - 1980 Alexander-Grundschule Vechta.  
1980 - 1982 Orientierungsschule Ludgerus-Schule Vechta.  
1982 – 1989 Gymnasium Antonianum Vechta.  
*Abschluß:* Allgemeine Hochschulreife  
1989 - 1996 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg.  
Schwerpunkte: Genetik, Mikrobiologie, Biochemie und Immunologie.  
Nov. 1994 Beginn der Diplomarbeit im Labor von Frau Prof. Renkawitz-Pohl, Philipps-Universität Marburg.  
Thema: Analyse Apodem-spezifisch exprimierter Gene in der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*  
Nov. 1994 bis Nov. 1995 Studentische Hilfskraft im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, Abt. Entwicklungsgenetik.  
Feb. 1996 *Studienabschluss* mit Diplom  
Feb. 1996 bis Juli 1996 Wissenschaftlicher Angestellter an der Frauenklinik der Philipps-Universität Marburg, Abt. Zellkulturlabor.  
Juli 1996 bis März 2000 Anfertigung der vorliegenden Dissertation zu dem Thema „Die UVB-abhängige Induktion des Vaskulären Endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) wird in epidermalen Zellen autokrin durch den Transformierenden Wachstumsfaktor alpha (TGF $\alpha$ ) reguliert: Bedeutung für die UVB-induzierte Angiogenese“ in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Scharffetter-Kochanek in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie der Universität zu Köln.