

Modulatoren der Hyaluronsäurematrix im Rahmen der extrinsischen Hautalterung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Katharina Röck
aus Neuss

Datum der Abgabe (Februar 2012)

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. J.W. Fischer

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Andrea Vortkamp

3. Gutachter: Frau Prof. Elke Winterhager

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Perihant Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2012

1	INHALTSVERZEICHNIS	
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
3	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
4	TABELLENVERZEICHNIS	12
5	EINLEITUNG	
5.1	DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX DER HAUT	14
5.1.1	HYALURONSÄURE	15
5.1.2	VERSICAN	16
5.2	DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX WÄHREND DER HAUTALTERUNG	16
5.2.1	INTRINSISCHE HAUTALTERUNG	16
5.2.1.1	DIE ROLLE VON ESTRADIOL IM PROZESS DER HAUTALTERUNG	17
5.2.2	EXTRINSISCHE HAUTALTERUNG	18
5.2.2.1	ALTERUNGSBEDINGTE VERÄNDERUNGEN DER HYALURONSÄURE-MATRIX	19
5.2.2.2	VERSICAN	20
5.3	ZIELSETZUNG	21
6	MATERIAL UND METHODEN	22
6.1	ZELLVERSUCHE	23
6.1.1	ZELLKULTUR	23
6.1.2	HERSTELLUNG DER KOLLAGENFRAGMENTE	24
6.1.3	3-D KULTUREN	25
6.1.4	SYNTHESE DERMALER ÄQUIVALENTE	25
6.1.5	BESTRAHLUNG DER ZELLKULTUR	25
6.2	TIERVERSUCHE	26
6.2.1	VERSUCHSGRUPPEN UND VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	26
6.2.2	OPERATIVE ENTFERNUNG DER EIERSTÖCKE (OVAREKTOMIE)	27
6.2.3	SUBKUTANE IMPLANTATION DER HORMONFREISETZENDEN PELLETS	27
6.2.4	UVB BESTRAHLUNG	28
6.2.5	ENTNAHME DER HAUTBIOPSIEN	28
6.3	HA-GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE	28
6.4	HA-EXTRAKTION AUS DER MURINEN HAUT	29
6.5	HA-BESTIMMUNG	29

6.6	EGF ELISA	30
6.7	[³H]-THYMIDIN-INKORPORATION ZUR BESTIMMUNG DER PROLIFERATION	30
6.8	PROTEINBESTIMMUNG	30
6.9	AFFINITÄTSZYTOCHEMIE	31
6.10	IMMUNOZYTOCHEMIE	31
6.11	IMMUNOHISTOCHEMIE	32
6.11.1	ANFERTIGUNG DER KRYOSCHNITTE	32
6.11.2	IMMUNOHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN.....	32
6.11.3	QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER IMMUNOHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN	33
6.11.4	QUANTIFIZIERUNG MAC2- UND KI-67-POSITIVER ZELLEN DURCH ZELLZÄHLUNG.....	34
6.12	GESAMT-RNA-ISOLATION UND MESSUNG DER MRNA-KONZENTRATION	34
6.13	cDNA SYNTHESE UND QUANTITATIVE REALTIME-RT-PCR (qRT-PCR)	34
6.14	SDS-PAGE	35
6.14.1	PROTEINE	35
6.14.2	PROTEOGLYKANE	35
6.15	WESTERN-BLOT	36
6.16	FACS (FLUORESCENT ACTIVATED CELL SORTING)-ANALYSE	37
6.17	LENTIVIRALE AUSSCHALTUNG DER HAS3-MRNA-EXPRESSION	37
6.17.1	VERMEHRUNG DER PLASMIDE	37
6.17.2	PRODUKTION DER LENTIVIREN.....	38
6.17.3	INFEKTION DER ZELLEN.....	38
6.18	STATISTISCHE AUSWERTUNG	38
7	ERGEBNISSE	39
7.1	NEGATIVE MODULATION DER HA-MATRIX: KOLLAGENFRAGMENTE	40
7.1.1	EINFLUSS VON KOLLAGENFRAGMENTEN AUF APOPTOSE UND PROLIFERATION	40
7.1.2	MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DURCH KF	41
7.1.3	VERÄNDERUNG DER HA-MATRIX DURCH KF.....	42
7.1.4	A _v B ₃ -INTEGRIN-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION REDUZIERT DIE HAS2-MRNA-EXPRESSION	44
7.1.5	EINFLUSS DER SIGNALMOLEKÜLE ROCK UND ERK AUF DIE KF-VERMITTELTE HAS2-MRNA-REGULATION	45
7.1.6	DURCH UVB-BESTRAHLUNG ENTSTANDENE KF UND DEREN SIGNALTRANSDUKTION	49
7.1.7	DURCH UVB-STRABLUNG HERVORGERUFENE KOLLAGENFRAGMENTIERUNG UND A _v B ₃ -AKTIVIERUNG REDUZIERT DIE HAS2-EXPRESSION IN DERMALEN ÄQUIVALENTEN.	50
7.1.8	DIFFERENTIELLE REGULATION DER HAS1-GENEXPRESSION	52

7.2	POSITIVE MODULATION DER HA-MATRIX: ESTRADIOL	55
7.2.1	E ₂ VERHINDERT DEN UVB-BEDINGTEN VERLUST VON HA IN DER DERMIS	55
7.2.2	MRNA-REGULATION VON HA-ASSOZIIERTEN MOLEKÜLEN	57
7.2.3	E ₂ FÜHRT ZU EINER INDUKTION VON HAS3 IN DER HAUT VON UVB-BESTRAHLTEN MÄUSEN	60
7.2.4	E ₂ UND UVB FÜHREN ZU EINER INDUKTION VON VERSICAN IN DER PAPILLÄREN DERMIS	61
7.2.5	E ₂ HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE REGULATION VON HAS3 UND VERSICAN IN DERMALEN FIBROBLASTEN IN VITRO	62
7.2.6	DIE DURCH E ₂ VERMITTELTE ERHÖHTE SEKRETION VON EGF IN KERATINOZYTEN FÜHRT ZUR PARAKRINEN REGULATION VON HAS3 UND VERSICAN IN FIBROBLASTEN	65
7.2.7	DIFFERENZIELLE EFFEKTE VON E ₂ AUF PROLIFERATION UND INFLAMMATION DER DERMIS IN VIVO	71
7.2.8	DIFFERENZIELLE EFFEKTE VON E ₂ AUF PROLIFERATION UND INFLAMMATION DER DERMIS IN VIVO	73
8	DISKUSSION	76
8.1	NEGATIVE MODULATION DER HA-MATRIX: KOLLAGENFRAGMENTE	77
8.2	POSITIVE MODULATION DER HA-MATRIX: ESTRADIOL	82
8.3	AUSBLICK	87
9	ZUSAMMENFASSUNG	88
10	SUMMARY	89
11	LITERATURVERZEICHNIS	90
12	APPENDIX	96
12.1	LÖSUNGEN	96
12.1.1	ELUTIONSPUFFER	96
12.1.2	QUELLPUFFER	96
12.1.3	LAUFPUFFER	96
12.1.4	PRONASE PUFFER	96
12.1.5	PBS	96
12.1.6	TBST	96
12.1.7	RIPA	97
12.1.8	2X LÄMMLI	97
12.1.9	BLOCKIERLÖSUNG	97
12.1.10	MEDIUM 1	97
12.1.11	MEDIUM 2	97
12.1.12	MEDIUM 3	98
12.2	PRIMER	98

13 DANKSAGUNG	101
14 LEBENSLAUF	102
14.1 VERÖFFENTLICHUNGEN	139
14.1.1 FACHZEITSCHRIFTEN	139
14.1.2 REVIEWS	139
14.1.3 VERÖFFENTLICHTE KONGRESSBEITRÄGE	140
14.1.4 PATENTE	140
14.2 AUSGEWÄHLTE ORIGINALARBEITEN UND MANUSKRIPTE	140
15 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

2 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
bAK	Blockierender Antikörper
cDNA	Kodierende DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
COX2	Cyclo-Oxygenase 2
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
E₂	Estradiol
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extrazellulär regulierte Kinase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence assisted cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunden
HA	Hyaluronsäure
HAS	Hyaluronsäuresynthase
HYAL	Hyaluronidase
IL6	Interleukin6
K	Kontrolle
KF	Kollagen Fragmente
LPS	Lysophosphatische Säure
MAC2	Galektin 3
MCP1	Monocytne chemotaktisches Protein 1
MEK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Min	Minuten
Mio	Millionen
MMP	Matrix Metalloproteinase
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> , Verhältnis zwischen Viren und Zielzellen
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsure
NHEK	Normale humane epidermale Keratinozyten
OVX	Ovariectomie

P	Placebo
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
qRT-PCR	Quantitative echtzeit, reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RHAMM	Rezeptor für HA Mediierte Mobilität
ROCK	Rho Kinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S	<i>Sham</i>
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i> , kleine Haarnadel RNA
St	Staurosporin
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TGFβ	Transforming Growth Factor
UVB	Ultraviolett B
VSV.G	Vesikuläres Stromatitis Virus G-Protein
X	Ovariectomie

3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung	Titel	Seite
1	Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix.	14
2	Strukturelle Darstellung des HA-Disaccharids.	15
3	Schematische Darstellung des Einflusses von E ₂ auf funktionelle Hautparameter und Komponenten der extrazellulären Matrix.	17
4	Veränderungen der Hyaluronsäure-Matrix durch akute und chronische UV-Exposition.	18
5	Zeitliche Darstellung der Versuchsdurchführung.	16
6	Apparatur zur Bestrahlung der Mäuse	28
7	Konzentrationsabhängige Induktion der Apoptose dermalen Fibroblasten durch KF.	40
8	Einfluss von KF auf die Proliferation dermalen Fibroblasten.	41
9	Morphologische Veränderungen nach KF Stimulation.	41
10	Veränderungen der HA-Matrix durch KF.	42
11	Veränderung der mRNA-Expression der HAS-Isoenzyme.	43
12	$\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Aktivierung reguliert die veränderte HAS-Expression durch KF.	44
13	KF verändern das Aktin-Zytoskelett.	45
14	Hemmung von ROCK reguliert die HAS-Expression.	46
15	KF hemmen die Cofilin-Phosphorylierung.	46
16	Zeitliche Korrelation der Suppression von HAS2 und der Cofilin Phosphorylierung	47
17	Reduktion der HAS2-mRNA-Expression durch ERK1/2-Inhibition.	47
18	Hemmung der nukleären ERK1/2-Aktivität durch KF	48
19	Hemmung der nukleären Translokation von pERK1/2 durch UVB-Strahlung.	49
20	Durch UVB-Strahlung hervorgerufene KF hemmen HAS2 via $\alpha_v\beta_3$ -Integrine.	50
21	UVB-induzierte KF hemmen die HAS2-Expression in dermalen Äquivalenten.	51

22	Einfluss von MMP-Inhibition und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Blockade auf UVB-vermittelte HAS2-mRNA-Reduktion in der 3D-Kultur.	52
23	p38-Inhibition hebt die KF-Induktion der HAS1-mRNA auf.	52
24	Zeitliche Korrelation der HAS1-mRNA-Erhöhung und p38-Phosphorylierung.	53
25	KF-vermittelte Induktion der p38-Phosphorylierung ist $\alpha_v\beta_3$ -Integrin abhängig.	53
26	Anstieg des HA-Gehaltes der papillären Dermis durch E_2 in vivo.	56
27	Genexpressionsprofil HA assoziierter Moleküle in Hautbiopsien nach E_2 - und UVB-Behandlung.	57
28	Genexpressionsprofil der Versican Spleiß-Varianten in Hautbiopsien nach E_2 - und UVB-Behandlung.	58
29	Genexpressionsprofil von $E_2R\alpha$ in Hautbiopsien nach E_2 - und UVB-Behandlung.	59
30	Induktion von Versican in Antwort auf UVB-Strahlung und E_2 in vivo.	60
31	Induktion von Versican in Antwort auf UVB-Strahlung und E_2 in vivo.	61
32	HAS3- und Versican-Expression in humanen dermalen Fibroblasten nach UVB- und E_2 -Behandlung.	62
33	Dosis-Wirkungsbeziehung dermalen Fibroblasten in Antwort auf E_2 .	63
34	Dosis-Wirkungsbeziehung dermalen Fibroblasten in Antwort auf UVB-Strahlung.	64
35	Zytokin-Expressionsprofil muriner Hautbiopsien in Antwort auf UVB und E_2 .	64
36	EGF-Expression in dermalen Hautbiopsien in Antwort auf UVB und E_2 .	65
37	HAS3- und Versican-Expression dermalen Fibroblasten nach EGF-Stimulation.	66
38	EGF-Freisetzung durch Keratinozyten nach UVB- und E_2 -Behandlung.	67
39	Einfluss von konditionierten Keratinozyten-Medien auf Fibroblasten.	68

40	Einfluss von konditionierten Keratinozyten-Medien auf die Proliferationsrate von Fibroblasten.	69
41	HAS3 Ausschaltung in Fibroblasten hemmt den proliferationssteigernden Effekt von konditionierten Keratinozyten-Medien.	70
42	Proliferation der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E ₂ .	71
43	Ki-67 und TPX-2 mRNA Expression der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E ₂ .	72
44	Mac-2 Expression in der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E ₂ .	73
45	Mac-2 Expression in der Haut von skh-1 Mäusen nach 10 wöchiger Behandlung mit UVB und E ₂	74
46	Genexpression Inflammations-assoziiierter Proteine der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E ₂ .	74
47	Expression von COX2 in der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E ₂ .	75
48	Durch UV-Strahlung hervorgerufene Kollagenfragmentierung.	78
49	Schematische Zeichnung des vorgeschlagenen Mechanismus der verminderten HAS2-mRNA-Expression.	80
50	UVB und E ₂ führen zu Veränderungen der dermalen Matrix.	85

4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle	Titel	Seite
1	In der Zellkultur verwendete Stimulantien und Konzentrationen.	24
2	Behandlungsschema der einzelnen Versuchsgruppen.	26
3	Verwendete Antikörper und Konzentrationen in der Immunhistochemie	33
4	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.	35
5	Zusammensetzung von Trenn- und Gradientengel (4-12%).	36
6	Für die Western-Blot-Analyse verwendete Antikörper.	36

5 EINLEITUNG

5.1 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX DER HAUT

Die Haut, das größte Sinnesorgan des Menschen, ist in drei wesentliche Schichten gegliedert: Epidermis, Dermis und Subcutis. Bei der Epidermis handelt es sich um ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel, dessen Aufgabe es ist, eine mechanische und chemische Barriere gegenüber der Umwelt zu errichten. Die Epidermis besitzt dem entsprechend sehr enge Zellzwischenräume, in denen nur geringe Mengen an extrazellulärer Matrix (EZM) akkumulieren. Im Gegensatz dazu ist die darunter liegende Dermis relativ zellarm und dafür reich an EZM.

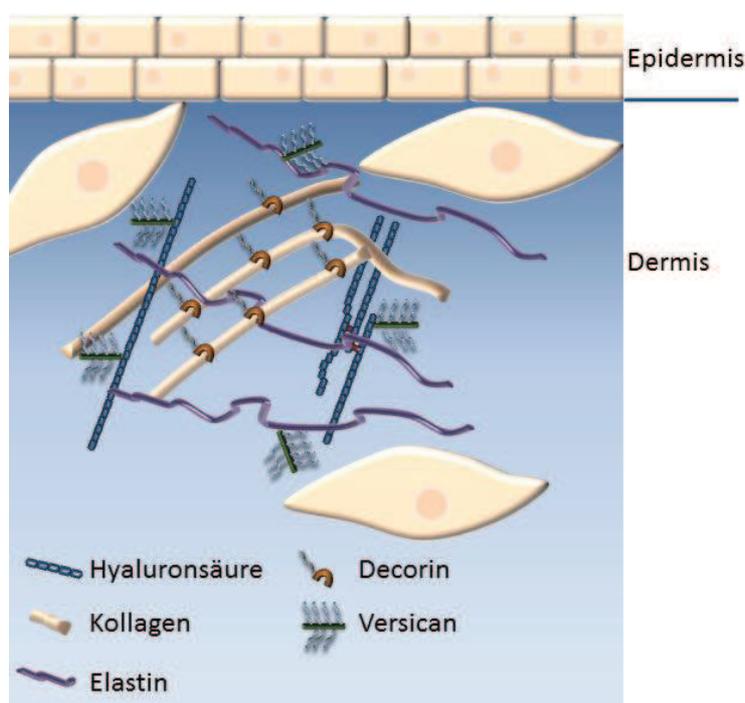


Abbildung 1 Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix. Die extrazelluläre Matrix der Dermis ist zusammengesetzt aus einer Vielzahl von Makromolekülen, von denen Kollagen, Elastin, Hyaluronsäure und die Proteoglykane Decorin und Versican die wichtigsten Bestandteile darstellen. Neben ihrer strukturgebenden Funktion besitzen die Komponenten der EZM zahlreiche physiologische Funktionen und regulieren unter anderem die Zelladhäsion, -migration und -proliferation. Die Degeneration der EZM im Rahmen der aktinischen Alterung ist kausal für phänotypische und funktionelle Veränderungen der Haut [74].

Die EZM stellt ein komplexes Netzwerk von Makromolekülen dar, die neben ihrer mechanisch stabilisierenden Funktion eine große Rolle bei der Regulation zahlreicher zellulärer Mechanismen wie der Proliferation, Adhäsion, Migration und Genregulation spielt [9, 38]. Die EZM der Haut besteht im Wesentlichen aus fibrillären Komponenten (z.B. Typ 1 und Typ 3 Kollagen, Elastin) und Proteoglykanen, die Glykosaminoglykanseitenketten (GAG, z.B. Dermatansulfat Chondroitinsulfat) tragen (z.B. Versican, Biglykan)(Abbildung 1). Ein weiterer funktionell und quantitativ bedeutender Bestandteil der dermalen EZM ist die Hyaluronsäure (HA). Im Folgenden sollen die beiden funktionell wichtigen Moleküle Hyaluronsäure (HA) und Versican detailliert dargestellt werden.

5.1.1 HYALURONSÄURE

HA, ein lineares Glykosaminoglykan, zeichnet sich durch eine recht einfache chemische Struktur, jedoch außergewöhnliche physiologische Eigenschaften aus. Im Gegensatz zu den anderen dermalen GAGs erfolgt die Biosynthese nicht im Golgi-Apparat. HA entsteht über eine glykosidische Verknüpfung von N-Acetyl-D-Glukosamin und Glukuronsäure durch drei transmembranäre HA-Synthasen (HAS1-3), die das wachsende HA-Polymer direkt in den extrazellulären Raum extrudieren (Abbildung 2) [33, 100]. Typischerweise erreicht ein HA-Strang eine Anzahl von 250 bis 30.000 Disaccharid-Einheiten (10^5 - 10^7 kDa) mit einer Polymerlänge von 2-25 μm [100]. Untersuchungen an dermalen Fibroblasten konnten zeigen, dass die unterschiedlichen HA-Isoenzyme unterschiedlich große HA-Moleküle synthetisieren (HAS1 $2 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ Da; HAS2 $> 2 \times 10^6$ Da; HAS3 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Da) [48, 73]. Dies ist von großem Interesse, da unterschiedlich langen HA-Polymeren unterschiedliche biologische Funktionen zugesprochen werden. Während von dem humanen HAS3-Isoenzym die beiden Spleiß-Varianten HAS3v1 und HAS3v2 bekannt sind, existiert HAS3v2 in Mäusen nicht.

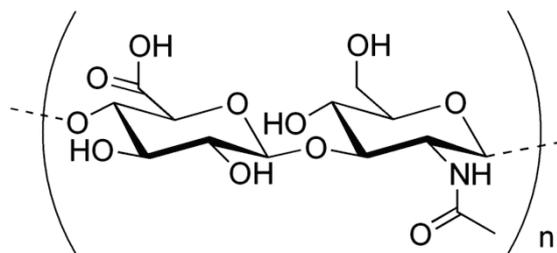


Abbildung 2 Strukturelle Darstellung des HA-Disaccharids [51].

Mit einer durchschnittlichen Erneuerungsrate von ein bis zwei Tagen unterliegt HA einem raschen Metabolismus, bei dem katabole Prozesse über Säure-aktive Enzyme, Hyaluronidasen (HYAL1-2), vermittelt werden [87].

Circa 50% der im gesamten menschlichen Körper befindlichen HA-Menge (etwa 14 g) befinden sich in der Haut [89]. Während HA in der Epidermis nur im Stratum spinosum und Stratum basale vorliegt, ist im Besonderen die papilläre Dermis sehr reich an HA [95]. Wegen ihrer außergewöhnlichen hydrodynamischen Merkmale spielt HA eine bedeutende Rolle in der Hydratisierung und biomechanischen Integrität der Haut [99]. Auf zellulärer Ebene interagiert HA mit den Rezeptoren CD44 und dem Rezeptor für HA-medierte Mobilität (RHAMM) und führt hierdurch zur Aktivierung spezifischer Signalwege, die unter anderem die Proliferation und Migration von Fibroblasten fördern [95], Apoptose und Adhäsion hemmen [117], sowie zu einer Induktion der Regeneration von Keratinozyten [86] führen.

5.1.2 VERSICAN

Versican ist ein großes Proteoglykan der EZM und gehört zur Familie der HA-Adhärine [53]. Durch alternatives Spleißen der mRNA können vier unterschiedliche Isoformen (V0, V1, V2 und V3) mit einem Molekulargewicht von 370-73 kDa entstehen [26]. Versican besteht aus drei Molekül-Domänen, die sehr unterschiedliche zellbiologische Funktionen ausüben können. Die G1-Domäne, welche für die Bindung von HA verantwortlich ist, ist N-terminal lokalisiert und besteht aus einem Immunglobulin-ähnlichen Motiv [125]. Über die beiden weiteren Domänen ist es Versican möglich unter anderem an Fibulin, Fibrillin und Chondroitinsulfat zu binden. In der Haut ist Versican hauptsächlich in der Basallamina der Epidermis und der Dermis, assoziiert mit dem elastischen Fasersystem, lokalisiert. Dort spielt es unter anderem eine wichtige Rolle bei der Regulation von zellulären Prozessen, wie der Zell-Adhäsion, -Proliferation und -Migration [121].

5.2 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX WÄHREND DER HAUTALTERUNG

Die demographischbedingte Erhöhung des durchschnittlichen Lebensalters der Weltbevölkerung und die hiermit verbundenen Herausforderungen führen zu einem vermehrten wissenschaftlichen Bestreben, die der Alterung zugrundeliegenden Mechanismen zu erforschen. Das Modell der Hautalterung hat hierbei zunehmend an Bedeutung gewonnen, da es bereits makroskopische Veränderungen des Gewebes deutlich darstellt. Ursächlich werden zwei unterschiedliche Mechanismen der Hautalterung unterschieden: Die intrinsische, von äußeren Faktoren unabhängige, und die extrinsische, durch Umwelteinflüsse hervorgerufene Hautalterung. Beide Prozesse werden kausal mit histologischen und ultrastrukturellen Veränderungen der EZM verknüpft.

5.2.1 INTRINSISCHE HAUTALTERUNG

Die intrinsische Hautalterung ist nur beeinflusst von endogenen Faktoren und entsteht kontinuierlich im Laufe der Zeit. Bestimmt wird sie unter anderem durch genetische Einflüsse aber auch durch weitere Faktoren wie den natürlichen Hormonhaushalt [37]. Im Verlauf der intrinsischen Hautalterung kommt es zu einer progredienten Abnahme der Zellzahl in Epidermis und Dermis. Hierdurch bedingt reduziert sich die Anzahl an aktiven Fibroblasten und es kommt zu einem Verlust von Bestandteilen der EZM. Besonders deutlich wird dieser Verlust im verminderten Gehalt von Typ 1 und Typ 3 Kollagen. Insgesamt liegt der Verlust des Hautkollagens mit zunehmendem Alter bei etwa 1% pro Jahr wobei sich zusätzlich das Verhältnis von Typ 1 und Typ 3 Kollagen verschiebt [78, 83]. Äußerlich manifestiert sich diese Abnahme bei der intrinsischen Alterung durch charakteristische feine Fältchen und Ausdünnung der Haut.

5.2.1.1 DIE ROLLE VON ESTRADIOL IM PROZESS DER HAUTALTERUNG

In diversen klinischen Studien und experimentellen Modellen konnte gezeigt werden, dass Estradiol (E_2) den Status der Haut während der intrinsischen aber auch als intrinsischer Faktor bei der extrinsischen Hautalterung auf vielfältige Weise verbessert [110]. Hierbei zu erwähnende, das Hautbild verbessernde Effekte von E_2 sind vor allem ein erhöhter Hydratisierungsgrad [34], verbesserte Elastizität [69], eine verstärkte Barrierefunktion durch die gesteigerte Produktion von Sphingolipiden [24] und eine Reduktion der Faltentiefe [27] (Abbildung 3). Unterstützt werden diese Beobachtungen durch zahlreiche klinische Studien an postmenopausalen Frauen. Ein Absinken des E_2 -Plasmaspiegels korrelierte in diesen Untersuchungen mit einer beschleunigten intrinsischen als auch extrinsischen Hautalterung [75]. Auch im tierexperimentellen Modell wurde durch operative Ovariectomie die spontane Alterung beschleunigt und die aktinische Alterung verschlimmert, was sich durch eine reduzierte Elastizität und Widerstandskraft bemerkbar machte [102].

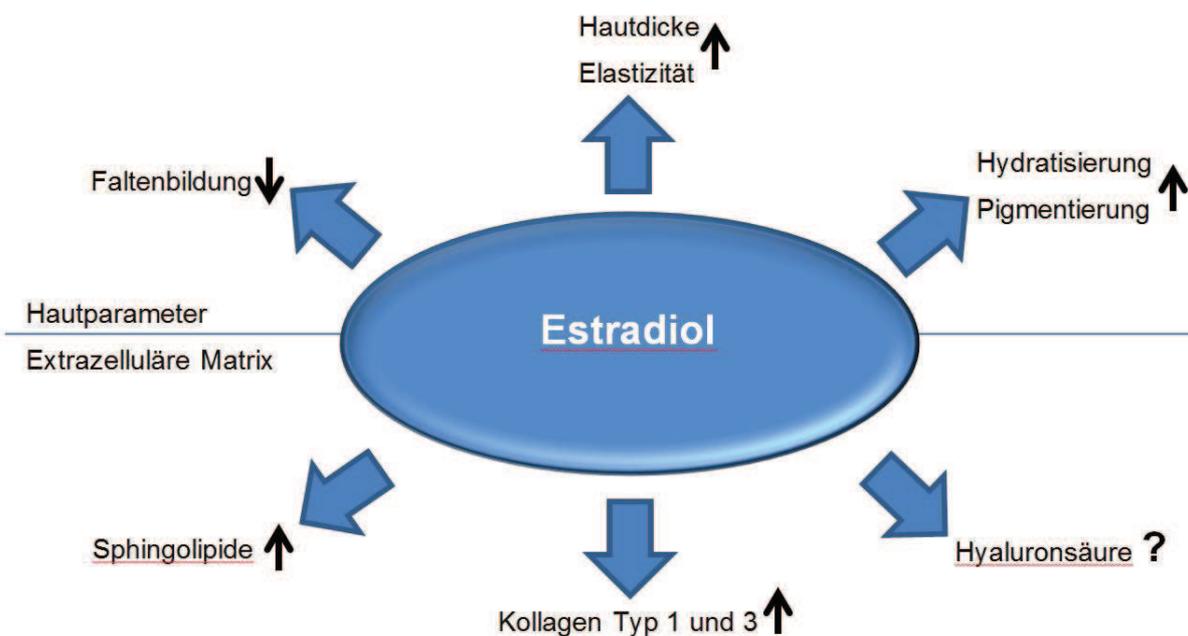


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Einflusses von E_2 auf funktionelle Hautparameter und Komponenten der extrazellulären Matrix. Estradiol beeinflusst eine Vielzahl von molekularen Zielmolekülen. In Bezug auf die extrazelluläre Matrix sind dies vor allem Typ 1 und 3 Kollagen und Sphingolipide. Zu Effekten von E_2 auf Hyaluronsäure liegen z.T. widersprüchliche Ergebnisse vor. Die Umgestaltung der extrazellulären Matrix durch E_2 könnten ursächlich sein für Veränderungen von funktionellen Hautparametern.

Vor allem komplexe Veränderungen der extrazellulären Matrix werden als grundlegender Mechanismus der alterungsbedingten Modifikationen der Haut durch E_2 betrachtet [35]. E_2 ist in der Lage die postmenopausale oder an Tieren durch Ovariectomie hervorgerufene Reduktion von dermale Typ 1 und Typ 3 Kollagen zu antagonisieren [11, 16]. Es besteht dabei eine enge Korrelation zwischen dem Kollagengehalt der Dermis, der Hautdicke als

einem Indikator der Hautalterung und dem Zeitraum der E₂-Suppression bzw. -Substitution [1, 57]. Die Substitution mit E₂ führte in einigen Studien zu einem erhöhten HA-Gehalt der Dermis [49, 65], was unter anderem mit einer verbesserten Hydratisierung der Haut in Verbindung gebracht wird [65]. Die molekularen Grundlagen des Einflusses von E₂ auf die EZM sind jedoch bislang unbekannt.

5.2.2 EXTRINSISCHE HAUTALTERUNG

Die extrinsische Hautalterung wird allein durch äußere Umwelteinflüsse hervorgerufen und ist für etwa 80% aller sichtbaren Hautalterungsprozesse verantwortlich [103]. Neben zahlreichen Faktoren, wie diversen Umwelttoxinen, der Ernährung und dem Lebenswandel ist die UV-Strahlung der potenteste exogene Stimulus des beschleunigten Alterungsprozesses [59]. Im Gegensatz zur chronologisch, intrinsisch gealterten Haut führen aktinische Schäden zu einer ledrigen Erscheinung, unregelmäßigen Pigmentierung und tiefen Falten [123]. Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass UVB-Strahlung zu einem DNA-Schaden hervorruft [101], und zum anderen die Entstehung von aktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien induziert [101]. ROS können diverse zelluläre Funktionen ausüben und sind unter anderem bekannt dafür, dass sie EZM-Bestandteile unmittelbar schädigen können [118]. Des Weiteren werden durch ROS Matrix degradierende Matrixmetalloproteinasen (MMP) aktiviert und deren Inhibitoren gehemmt [10]. Vor allem Typ 1 Kollagen unterliegt dem enzymatischen Abbau durch MMPs, der im nativen Zustand jedoch äußerst langsam vollzogen wird [112]. Im Rahmen der aktinischen Hautalterung wird dieser Prozess jedoch stark beschleunigt. Dabei werden die sich mit jeder UV-Bestrahlung wiederholenden Schädigungen nur unzureichend repariert und zusätzliche Vernetzungen mit Zuckern geknüpft [36, 106]. Wichtig hierbei ist vor allem, dass diese Vernetzungen im Rahmen des normalen Umsatzes nicht degradiert werden können und somit den Abbau von entstandenen Kollagenfragmenten (KF) verhindern [72]. Es kommt zu einer Akkumulation von KF die vor allem bedingt durch die langsame Umsatzrate des Typ 1 Kollagens maßgeblich zur Entstehung funktioneller Störungen des Kollagens beiträgt [109], welche sich in der vermehrten Ausbildung von Falten manifestiert. Abgesehen von den durch die Kollagenspaltung bedingten strukturellen Veränderungen, werden durch die Degradation RGD-Sequenzen des Kollagens freigesetzt. Dies führt zur Ausprägung völlig neuer biologischer Attribute. So konnte kürzlich in glatten Muskelzellen gezeigt werden, dass KF über die Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen apoptotische Vorgänge hemmen [113]. Bislang ist jedoch nicht bekannt, welchen Stellenwert KF und durch KF hervorgerufene Veränderungen auf zellulärer Ebene bei der Hautalterung haben.

5.2.2.1 ALTERUNGSBEDINGTE VERÄNDERUNGEN DER HYALURONSÄURE-MATRIX

Die Ergebnisse histologischer und biochemischer Untersuchungen des HA-Metabolismus nach chronischer suberythemaler UV-Bestrahlung der Haut sind widersprüchlich und Abhängig von der Intensität, Dauer und Häufigkeit der Bestrahlung. In Mäusen wurde berichtet, dass nach 10-wöchiger UVB-Bestrahlung der HA-Gehalt der Haut erhöht ist [80], während längere Bestrahlungszeiträume zu einer Abnahme von HA führten [18].

Ursächlich für die vermehrte HA-Synthese nach akuter UVB-Bestrahlung in humaner Haut scheint eine Induktion der HAS3 zu sein (Abbildung 4) [93]. Das Auftreten von Entzündungsreaktionen und die vermehrte Expression von entzündlichen Zytokinen konnte bereits in früheren Studien mit einer Induktion von HAS3 in Zusammenhang gebracht werden [6]. Wie bereits unter Abschnitt 1.1.1 dargestellt synthetisiert HAS3 die niedermolekularste HA der drei Isoenzyme mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1×10^5 – 1×10^6 Da. Zusätzlich führen UVB-induzierte Radikale sowie HYAL1 und HYAL2 zu einer weiteren Fragmentierung der HA [88]. Diese HA-Fragmente können ihrerseits Toll-like Rezeptoren aktivieren und modulieren somit Entzündungsreaktionen [97].

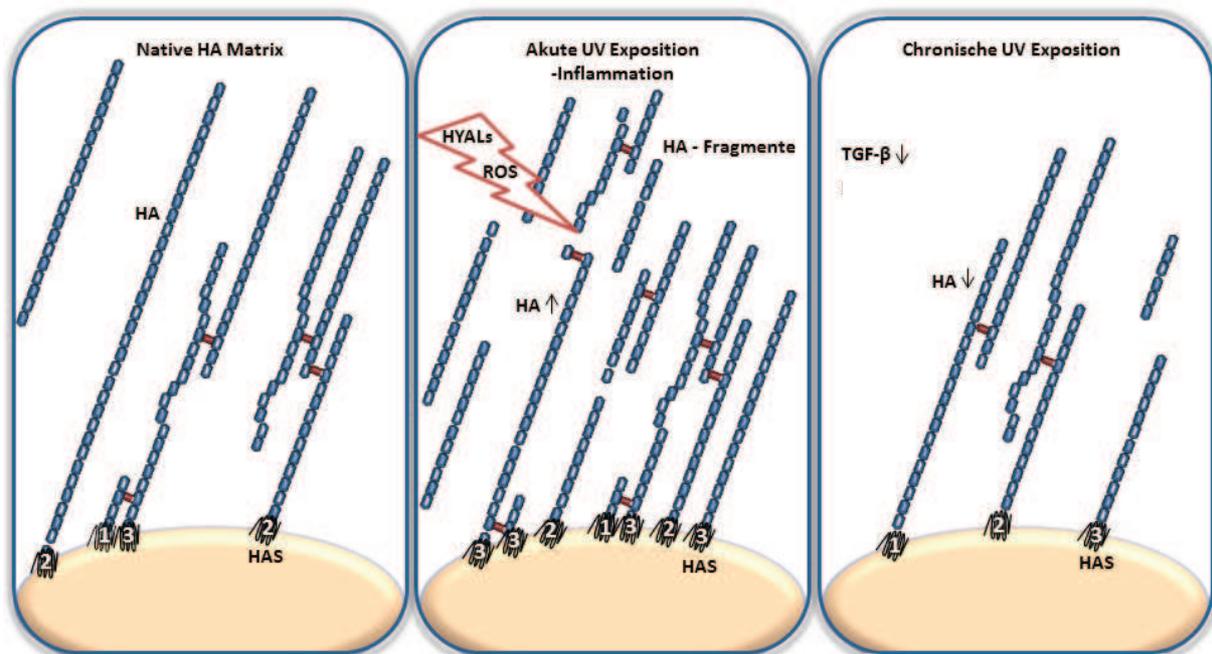


Abbildung 4 Veränderungen der Hyaluronsäure-Matrix durch akute und chronische UV-Exposition. **(A)** Die native HA-Matrix ist gekennzeichnet durch HA-Stränge mit mittlerer bis hoher molekularer Größe, welche durch die HAS1-3 in den Extrazellulärraum extrudiert werden. **(B)** Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen kommt es als direkte Folge von UV-Strahlung zu einer Aufregulation von HAS3 und einer vermehrten HA-Synthese. Zur gleichen Zeit entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Hyaluronidasen (HYALs), die zu einer Fragmentierung der HA führen. HA-Fragmente sind ihrerseits bekannte Modulatoren von Entzündungsreaktionen. **(C)** Im Gegensatz zur akuten Reaktion auf UV-Strahlung kommt es im Verlauf von chronischer UV-Bestrahlung zu einer Reduktion des HA-Gehalts in der Dermis. Verantwortlich hierfür ist unter anderem die verminderte Expression des HA stimulierenden Zytokins TGF- β [74].

Chronisch extrinsischen Faktoren ausgesetzte humane und murine Haut ist gekennzeichnet durch eine Reduktion des HA-Gehalts und einer damit einhergehenden Abnahme des Feuchtigkeitsgehalts der Dermis [94]. Ein möglicher Mechanismus, der für den verminderten HA-Gehalt in der aktinisch gealterten Haut verantwortlich sein könnte, ist eine Reduktion der TGF- β -Konzentration mit dem Alter. Ein geringer Teil von etwa 5% der UVB-Strahlung erreicht *in vivo* die obere Dermis [12]. In Folge dessen sollten nicht nur direkte Einflüsse der UV-Strahlung auf Fibroblasten der papillären Dermis berücksichtigt werden, sondern auch indirekte Auswirkungen von UV-verursachten Veränderungen in der Epidermis wie eine veränderte Zytokinausschüttung der Keratinozyten [6]. TGF- β ist ein starker Induktor der HA-Synthese in dermalen Fibroblasten [44]. Da TGF- β und der TGF- β -Rezeptor II nach chronischer Bestrahlung reduziert vorliegen, könnten sie somit potentiell zu einer verminderten HA-Synthese beitragen [18].

Weitere Faktoren die eventuell kausal zu einer direkten Inhibition der HA-Synthese führen, sind bislang nicht bekannt.

5.2.2.2 VERSICAN

Nach akuter UV-Bestrahlung kann eine Hochregulation von Versican beobachtet werden. Diese Erhöhung des Versican-Gehalts dient der Etablierung eines Mikromilieus, welches Reparatur- und Remodellierungsprozessen begünstigt. Hierbei werden Fibroblasten vor der Apoptose geschützt und zur Proliferation angeregt, um die Gewebsreparatur zu unterstützen [8]. Über einen erhöhten Gewebswassergehalt wird zudem die Migration von inflammatorischen Zellen und der Austausch von Mikronährstoffen unterstützt [15].

In aktinisch gealterter Haut akkumuliert Versican in den Bereichen der solaren Elastose [51]. Dies scheint vor allem positive Aspekte zu haben, da hohe Versican-Konzentrationen Zellen vor oxidativen Veränderungen schützen [124]. So konnte für die Spleiß-Variante V₁ ein protektiver Effekt gegen Apoptose gezeigt werden [81]. Funktionell konnte des Weiteren kürzlich gezeigt werden, dass Versican im Verlauf der aktinischen Alterung molekularen Veränderungen unterliegt, die zu einer verminderten Bindungskapazität mit anderen Molekülen der extrazellulären Matrix führen [15].

5.3 ZIELSETZUNG

Die Erhöhung des durchschnittlichen Lebensalters der Weltbevölkerung und hiermit verbundene Herausforderungen führen zu einem vermehrten wissenschaftlichen Bestreben, die der Alterung zugrundeliegenden Mechanismen zu erforschen. Das Modell der Hautalterung gewinnt hierbei zunehmend an Bedeutung, da es makroskopische Veränderungen des Gewebes bereits deutlich darstellt und für Untersuchungen gut zugänglich ist. Bei der Hautalterung unterscheidet man zwischen zwei ursächlichen Prozessen: Der intrinsischen und der extrinsischen Alterung. Letztere wird als Hauptursache für die vorzeitige Hautalterung angesehen, jedoch können intrinsische Faktoren wie die Abnahme des Plasma-Estradiolgehalts im Alter als zusätzliche Katalysatoren fungieren. Beide Prozesse konnten in den letzten Jahren in engen Zusammenhang mit Remodellierungsvorgängen der EZM gebracht werden. Strukturelle Veränderungen der Kollagen-Matrix standen hierbei lange im Mittelpunkt der Untersuchungen und gelten als gut charakterisiert. Weitere Fragen bleiben jedoch ungeklärt. So konnte erst kürzlich gezeigt werden, dass durch MMP-Fragmentierung entstandene Kollagenfragmente selbst, über die Aktivierung von Integrinen, biologisch aktiv sind. Bislang ist jedoch nicht untersucht, welchen Einfluss die Akkumulation von biologisch aktiven Kollagenfragmenten während der Alterung auf zelluläre Prozesse und die EZM hat. Weitgehend umstritten bleibt auch, wie die für zahlreiche physiologische Prozesse der Haut essentielle HA-Matrix sich im Verlauf der Alterung verändert und vor allem welche Regulatoren und Mechanismen an diesen Vorgängen beteiligt sind. Zwar konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass der HA-Gehalt nach chronischer UV-Exposition abnimmt, welchen regulatorischen Mechanismen dieser Prozess jedoch unterliegt und ob es direkte Regulatoren der HA-Matrix während der Alterung gibt, bleibt bislang ungeklärt.

Im Nachfolgenden sollte daher untersucht werden, welchen genauen strukturellen Veränderungen die HA-Matrix während der extrinsischen Hautalterung unterliegt und potentielle Modulatoren - Kollagenfragmente und Estradiol – identifiziert und mechanistisch untersucht werden.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 ZELLVERSUCHE

6.1.1 ZELLKULTUR

Humane, dermale Fibroblasten von weiblichen und männlichen Spendern (Promocell, Heidelberg) wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma Steinheim), welches mit 10% hitzeinaktiviertem, fetalem Kälberserum (FKS, Pan Biotech, Aidenbach), 2 mmol/l Glutamin (Invitrogen, Karlsruhe) und Antibiotika (100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin-G, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt wurde, kultiviert. Die Untersuchungen zum Einfluss von Estradiol wurden mit DMEM ohne Zusatz von Phenolrot (Sigma, Steinheim) und mit Aktivkohle behandeltem FKS durchgeführt. Die Zellen wurden als subkonfluenten Monolayer bei 37°C und 5% CO₂ in feuchter Atmosphäre gehalten. Zum weiteren Passagieren wurden die Zellen mit PBS (Dako, Hamburg) gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (Biochrom, Berlin) von der Kulturschale gelöst. Die Trypsinierung wurde nach 5 Minuten durch die Zugabe einer äquivalenten Menge DMEM mit 10% FKS abgestoppt und die Zellsuspension bei 1.000 rpm zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Anzahl der lebensfähigen Zellen mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Für weitere Versuche wurden die Zellen mit einer Dichte von 5.000 Zellen/cm² Kulturschale ausgesät. Die Bestimmung der [³H]-Thymidin-Inkorporation, Affinitäts- und Immunocytochemie erfolgte bei einer Zelldichte von 3.000 Zellen/cm². Normale humane epidermale Keratinozyten (NHEK, PromoCell, Heidelberg) wurden in *Keratinocyte Growth Medium 2* (PromoCell, Heidelberg), welches mit 0,06 mM CaCl₂, 2 mmol/ L-Glutamin und Antibiotika (100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin-G, Invitrogen, Karlsruhe) versetzt wurde, kultiviert.

Falls nicht anders im Text vermerkt, wurden die Zellen 24 Stunden nach der Aussaat für 24 Stunden durch Serumentzug synchronisiert und anschließend für weitere 24 Stunden mit den in Tabelle 1 dargestellten Stoffen stimuliert.

Tabelle 1 In der Zellkultur verwendete Stimulantien und Konzentrationen.

Stoffname	Firma	Eingesetzte Konzentration
Anisomycin (p38 Aktivator)	Sigma, Steinheim	10 μ M
EGF neutralisierender Antikörper	Abcam, Cambridge, UK	0,35 μ g/ml
Epidermal growth factor	Sigma, Steinheim	10 μ M
Erlotinib	LC Laboratories, Woburn, USA	3 μ M
Estradiol (E₂)	Sigma, Steinheim	100 nM
IgG Isotyp Kontrollantikörper (LM609)	Millipore, Schwalbach	5 μ g/ml
IgG Isotyp Kontrollantikörper (EGF)	Abcam, Cambridge, UK	0,35 μ g/ml
Latrunculin A	Sigma, Steinheim	3 & 10 μ M
Lysophosphatidische Säure (LPS, Rock Aktivator)	Sigma, Steinheim	300 nM
MMP Inhibitor I	Sigma, Steinheim	300 nM
PD98059?	Merck, Darmstadt	1 μ M
RGDS	Peptides International, Louisville, USA	10 μ g/ml
SB203580 (p38 Inhibitor)	Merck, Darmstadt	1 μ M
SP 600125 (JNK Inhibitor)	Sigma, Steinheim	10 μ M
Y27632 (Rock Inhibitor)	Sigma, Steinheim	10 μ M
$\alpha_v\beta_3$ blockierender Antikörper (LM609)	Millipore, Schwalbach	5 μ g/ml

6.1.2 HERSTELLUNG DER KOLLAGENFRAGMENTE

Typ 1 Kollagengele wurden wie folgt hergestellt [114]. Kollagenlösung (1 ml) (PureCol[®], Advanced Biomatrix, San Diego, USA, 3,0 mg/ml aus boviner Haut gewonnenes Kollagen Typ 1) wurde in einer d35er Schale mit 460 μ l 7-fach DMEM (Invitrogen, Darmstadt) und 1,54 ml steril filtriertem Wasser neutralisiert und bei 37°C für 24 Stunden bis zur vollständigen Polymerisation im Brutschrank inkubiert. Zur Spaltung des Kollagens in KF, wurde das polymerisierte Gel mit 2 mg/ml Kollagenase 3 (Worthington, Lakewood, USA) bei 37°C für 30 Minuten verdaut. Die Kollagenaseaktivität wurde anschließend durch die Zugabe eines äquivalenten Volumens DMEM mit 10% FKS inhibiert und die Lösung auf eine Endkonzentration von 125 μ g/ml KF mit DMEM verdünnt.

6.1.3 3-D KULTUREN

3-D Kulturen der Fibroblasten wurden hergestellt, indem 100.000 Zellen in 500 µl der oben beschriebenen, neutralisierten Kollagenlösung eingesät wurden. Um eine Anhaftung der Gele an der Kulturschale zu verhindern, wurde die Zellsuspension für 24 Stunden in Mineralöl (Sigma, Steinheim) gehalten und nach erfolgter Polymerisation in DMEM mit 10% FKS überführt.

6.1.4 SYNTHESE DERMALER ÄQUIVALENTE

Die Synthese dermalen Äquivalente erfolgte wie beschrieben [58]. 4,4 ml Medium 3 (Appendix 6.1.12) wurden auf Eis in einem Erlenmeyerkolben mit 0,5 ml Zellsuspension (1 Mio. Zellen in Medium 2, Appendix 6.1.11) und 2,0 ml Kollagen (PureCol®) homogenisiert. Anschließend wurde die Lösung in eine 60 mm große Zellkulturschale überführt und für 4 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Folgenden wurde das Gel auf ein Metallgitter überführt, mit FKS-haltigem Kulturmedium unterschichtet und bei regelmäßigem Austausch des Mediums für bis zu 6 Wochen im Brutschrank kultiviert.

6.1.5 BESTRAHLUNG DER ZELLKULTUR

Die UVB-Bestrahlung der Zellen erfolgte mit dem Bio-Sun Bestrahlungssystem (Vilbert Lourmat, München, Deutschland). Für den Bestrahlungsvorgang wurden die Zellen der Monolayerkultur und der 3-D Kulturen in warmes PBS überführt und mit 10-100 mJ/cm² bestrahlt. Der Bestrahlungsvorgang dauerte je nach Bestrahlungsdosis zwischen 3 und 45 Sekunden. Direkt im Anschluss an die Bestrahlung wurde das PBS durch DMEM mit 10% FKS in An- beziehungsweise Abwesenheit entsprechender Stimulantien und Inhibitoren (Tabelle 1) ersetzt.

6.2 TIERVERSUCHE

Für die beschriebenen Tierversuche wurden ausschließlich weibliche Nacktmäuse (Skh:Hr1) (Charles-River) verwendet, welche unter Standardbedingungen in einem klimatisierten Raum gehalten wurden.

6.2.1 VERSUCHSGRUPPEN UND VERSUCHSDURCHFÜHRUNG

Die endogene ovarielle Steroidhormon-Produktion weiblicher Mäuse wurde durch operative Entfernung der Ovarien (Ovariectomie, OVX, X) im Alter von 7 Wochen unterbunden (Abbildung 5).

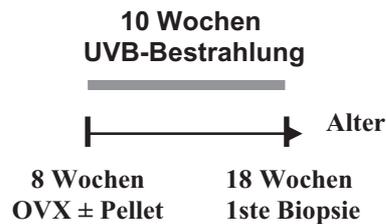


Abbildung 5 Zeitliche Darstellung der Versuchsdurchführung. Skh-1 Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen ovariectomiert (OVX) und erhielten ein Estradiol-freisetzendes oder Placebo-Pellet. Im Anschluss erfolgte die Bestrahlung der Tiere über einen Zeitraum von 10 Wochen und abschließend eine Biopsie Entnahme.

Hierzu wurden die Mäuse randomisiert einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet und entweder ovariectomiert (OVX) oder *sham* (S) operiert. OVX operierte Mäuse wurden in zwei weitere Versuchsgruppen unterteilt, welche entweder Estradiol-(E₂) oder Placebo-(P) Pellets implantiert bekamen. Die so entstandenen drei Versuchsgruppen wurden anschließend in zwei weitere Gruppen unterteilt, von denen eine Gruppe für 10 Wochen mit UVB-Licht bestrahlt wurde. Es entstand somit eine Gesamtzahl von sechs Gruppen (Tabelle 2)

Tabelle 2 Behandlungsschema der einzelnen Versuchsgruppen. Weibliche skh-1 Nacktmäuse wurden im Alter von 8 Wochen ovariectomiert (X) oder *sham* operiert (S). Im weiteren Verlauf erhielten die Tiere ein Estradiol-freisetzendes (E₂) oder wirkstofffreies(P) Pellet. Es folgte die Aufteilung der Gruppen in jeweils eine nicht bestrahlte und eine UVB-bestrahlte (UVB) Gruppe, so dass sich eine Gesamtgruppenanzahl von sechs ergab.

Gruppe	OVX	Placebo Pellet	E ₂ Pellet
S,P	-	+	-
X,P	+	+	-
X,E ₂	+	-	+
S,P UVB	-	+	-
X,P UVB	+	+	-
X,E ₂ UVB	+	-	+

6.2.2 OPERATIVE ENTFERNUNG DER EIERSTÖCKE (OVAREKTOMIE)

Vor der operativen Entfernung der Ovarien wurden die Mäuse gewogen und mit einer Kombination aus 100 mg/kg Esketaminhydrochlorid (Pfizer, Parke-Davis GmbH, Karlsruhe) und 5 mg/kg Xylazin (Bayer, Leverkusen) durch intraperitoneale Injektion anästhesiert. Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte anhand des Lid- und Zwischenzehreflexes. Bei ausreichender Narkosetiefe wurden die Tiere auf dem Operationstisch fixiert. Der operative Zugang erfolgte über einen etwa 1,5 cm langen Flankenschnitt, der beidseitig unweit der unteren Extremitäten durchgeführt wurde. Das Peritoneum wurde eröffnet, die Ovarien mit einer Pinzette vorgelagert und am Übergang zum Uterushorn abgetrennt. Das Uterushorn wurde in die Bauchhöhle reponiert und das Peritoneum beidseitig mit einem resorbierbaren Faden der Stärke 5.0 (Johnson & Johnson, Norderstedt) verschlossen. Die äußere Naht erfolgte mit resorbierbaren Fäden der Stärke 4.0 (Johnson & Johnson, Norderstedt). Zur postoperativen Analgesie wurden 5 mg/kg Carprofen (Pfizer, Berlin) s.c. injiziert.

6.2.3 SUBKUTANE IMPLANTATION DER HORMONFREISETZENDEN PELLETS

Die Substitution mit Estradiol wurde via subkutaner Implantation von hormonfreisetzenden Pellets (Innovative Research of America, Sarasota, USA), eine Woche nach der Ovariectomie, in Narkose durchgeführt. Die Freisetzung des 17β -Estradiols aus den 2-3 mm großen Pellets erfolgte mit einer Rate von 1,1 $\mu\text{g}/\text{Tag}$ [28]. Als Kontrolle wurden wirkstofffreie Placebo-Pellets implantiert, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte in Zusammenhang mit anderen Inhaltsstoffen der Pellets stehen, oder durch den chirurgischen Eingriff bedingt sind. Nach erfolgter Anästhesie der Tiere wurde die Haut zwischen Ohr und Nacken eröffnet und subkutan eine etwa 1 cm tiefe Tasche geformt, in die jeweils ein Pellet gelegt wurde. Anschließend wurden Subkutis und Kutis durch Einzelknopfnähte mit resorbierbarem Faden der Stärke 4.0 verschlossen.

6.2.4 UVB BESTRAHLUNG

Die UVB-Exposition der weiblichen Nacktmäuse erfolgte in einer eigens hierzu angefertigten Apparatur (Abbildung 6). Als UVB-Quelle dienten vier UV-Lampen der Firma Phillips (280 bis 320 nm Wellenlänge, TL 20W/12, Phillips, Eindhoven, Niederlande), welche mit einem Dosimeter (Waldmann, Villingen-Schwenningen) vermessen wurden. Die Bestrahlung erfolgte dreimal wöchentlich mit einer Dosis von 80 mJ/cm^2 , entsprechend einer minimalen erythemalen Dosis von Eins, über einen Zeitraum von 10 Wochen. Die Bestrahlungszeit betrug 1 min 36 Sekunden.

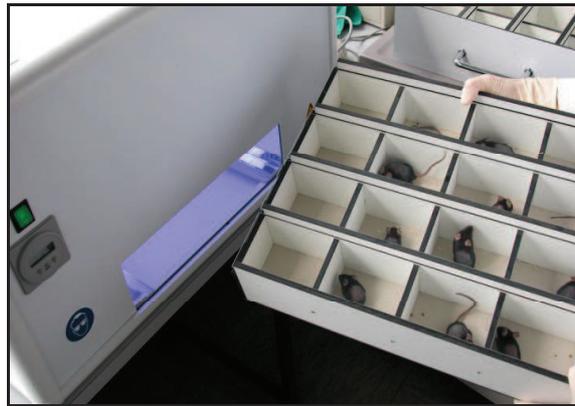


Abbildung 6 Apparatur zur Bestrahlung der Mäuse.

6.2.5 ENTNAHME DER HAUTBIOPSIEN

Die Entnahme der Hautbiopsien erfolgte in anästhesiertem Zustand nach einem minimalen bestrahlungsfreien Intervall von 24 Stunden, um mögliche akute Entzündungsreaktionen durch die Bestrahlung auszuschließen. Dazu wurde am Rücken der Maus, lateral der Wirbelsäule, ein etwa 1 cm großes spindelförmiges Gewebestück asserviert. Subkutis und Kutis wurden anschließend durch Einzelknopfnähte mit resorbierbarem Faden der Stärke 4.0 verschlossen.

6.3 HA-GRÖßENAUSSCHLUSSCHROMATOGRAPHIE

Zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung der *de novo* synthetisierten HA wurden dermale Fibroblasten simultan zur Stimulation mit KF mit $40 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$ [^3H]- Glukosamin (Perkin Elmer, Rodgau) inkubiert. 24 Stunden nach der Inkubation wurde der Überstand des Mediums abgenommen und für 12 Stunden bei 37°C mit $500 \text{ } \mu\text{g/ml}$ Pronase (Sigma, Steinheim) verdaut. Durch anschließendes Erhitzen der Lösung auf 95°C wurde der Verdau durch Inaktivierung der Pronase beendet. Zur Abtrennung des nicht in HA eingebauten [^3H]- Glukosamins wurde der gesamte Überstand über eine Sephadex G50-Säule (Sigma,

Steinheim) mit einem Bettvolumen von 4 ml aufgereinigt. Die hierfür notwendige Vorbereitung des Säulenmaterials erfolgte durch mehrfaches Aufkochen mit Quell-Puffer (Appendix 6.1.2). Nach Auftragen des Überstandes auf die Säule wurde der das [³H]-Glukosamin enthaltende Durchfluss verworfen und die makromolekulare Fraktion durch Elution mit 1,5 ml Elutionspuffer (Appendix 6.1.1) gesammelt. Nach Vermessung des Eluats mittels eines beta-Counters (Beckmann Coulter, Krefeld) unter Zugabe von Szintillationsflüssigkeit wurden 20.000 counts des Eluats auf eine Sephacryl S-1000 (GE-Healthcare, München)-Säule aufgetragen und durch kontinuierliche Zugabe von Laufpuffer (Appendix 6.1.3) entsprechend der Größe chromatographisch separiert. Mithilfe eines Fraktionssammlers wurden Eluatfraktionen für jeweils 2½ Minuten gesammelt (65 Fraktionen), um nach anschließender Messung der jeweiligen Counts einen Count-Fraktionsnummernverlauf zu erstellen, aus dem die Größenverschiebung der HA durch die Stimulation mit KF ersichtlich wurde.

6.4 HA-EXTRAKTION AUS DER MURINEN HAUT

Die Hautbiopsien zur Bestimmung des Trockengewichtes lyophilisiert und für 24 Stunden bei 60°C mittels Pronase (6mg/ml) in Pronase Puffer (Appendix 6.1.4) verdaut. Nach anschließender Ethanol-fällung (12 Stunden, -20°C) wurde die freigesetzte HA durch Abzentrifugation (10.000 x g bei 4°C, 15 Minuten) erneute Lyophilisation und Resuspension in ddH₂O aufgereinigt. Die Proben wurden 1:10000 mit ddH₂O verdünnt [14].

6.5 HA-BESTIMMUNG

In den Zellkulturüberstand freigesetzte HA und aus der murinen Haut extrahierte HA wurde mittels des *Hyaluronic Acid Test Kits* (Corgenix, Colorado, USA) analog der Herstellerangaben bestimmt. Hierzu wurden die Proben 1:5 mit PBS verdünnt, die Messung der Extinktion erfolgte mit einem *ELISA-Microplate Reader* (Bio-Rad, München, Deutschland). Die Menge HA wurde als Verhältnis der HA-Konzentration zur Gesamtproteinkonzentration des Zellrasens bzw. des Trockengewichtes der Hautbiopsie berechnet.

6.6 EGF ELISA

Der Überstand von Keratinozyten wurde 24 Stunden nach Stimulation abgenommen und hieraus die EGF-Konzentration mit dem *human EGF ELISA Kit* (abcam, Cambridge, UK) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Zur Messung des EGF-Gehalts in den murinen Hautproben wurden äquivalente Mengen unter Stickstoff in 2 ml Eppendorf-Gefäßen mit Hilfe einer Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan) zermörsert, anschließend in RIPA Puffer (Appendix 6.1.7) bei 37°C für 30 Minuten lysiert und die EGF-Konzentration mit dem *murine EGF ELISA Kit* (abcam, Cambridge, UK) gemessen.

Die Menge an EGF wurde als Verhältnis der EGF-Konzentration zur Gesamtproteinkonzentration des Zellrasens bzw. der lysierten Probe berechnet.

6.7 [³H]-THYMIDIN-INKORPORATION ZUR BESTIMMUNG DER PROLIFERATION

Die Bestimmung der Proliferationsrate erfolgte durch Messung des [³H]-Thymidin (Perkin Elmer, Bodgau-Jügesheim)-Einbaus. Dermale Fibroblasten wurden in 24-Loch-Platten in einer Dichte von 15.000 Zellen pro Loch ausgesät. Nach 24-stündiger Synchronisation der Zellen in serumfreiem Medium erfolgte die 24-stündige Stimulation. Während der letzten 4-6 Stunden wurde pro Vertiefung 1µCi/ml [³H]-markiertes Thymidin hinzugefügt.

Die Aufarbeitung erfolgte nach Absaugen des Überstandes zunächst durch zweimaliges Waschen mit 1 ml kaltem 1x PBS. Die Inkorporation des [³H]-Thymidins wurde durch Zugabe von 500 µl Perchlorsäure für zwei Minuten gestoppt. Nach Absaugen der Perchlorsäure erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 0,1 M Natriumhydroxid-Lösung (300 µl/Loch) unter ständiger Bewegung bei 37 °C für 15 min.

Ein Teil des des Lysats (30 µl) wurden für spätere Proteinbestimmungen (vergleiche Abschnitt 5.8) bei -20°C gelagert. Das übrige Zelllysate wurde mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumac LSC, Niederlande) versetzt und mittels eines beta-Counter (Beckmann Coulter, Krefeld) 3 min. vermessen. Die erhaltenen *counts per minute* wurden anschließend auf die Proteinmenge normalisiert.

6.8 PROTEINBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte anhand der Methode nach Bradford. Hierzu wurde das Bradford-Reagenz 1:5 mit ddH₂O verdünnt und mit einem Volumen von 200 µl in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Als Standard diente eine BSA-Eichreihe von 2 µg bis 12 µg BSA. Nach Zugabe der Eichlösung und der jeweiligen Proben zum Bradford-Reagenz wurde die Extinktion bei 595 nm mit einem ELISA-Reader (Bio-Rad, München, Deutschland) ermittelt.

6.9 AFFINITÄTSZYTOCHEMIE

Die Aussaat der dermalen Fibroblasten für die Affinitätszytochemie erfolgte auf 18 mm runden Deckgläschen in 12-Loch-Platten. Nach dem Stimulationszeitraum wurden die Zellen für 20 Minuten mit essigsaurer, ethanolischer Formalinlösung (3,7% Formalin/PBS, 70% Ethanol und 5% Eisessig, alles V/V, Merck, Darmstadt) fixiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 0,3% Triton X100 (Sigma, Steinheim) für 10 Minuten permeabilisiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden die Zellen für eine Stunde in 3% BSA/PBS blockiert. Darauf folgend wurde HA durch biotinyliertes HA-Bindeprotein (bHABP, 2µg/ml, Seikagaku, Japan), gefolgt von Streptavidin-FITC (1:1000, Dako, Hamburg) für jeweils eine Stunde in einprozentigem BSA/PBS detektiert. Als Negativkontrolle wurden Fibroblasten vor der Färbung mit *Streptomyces* Hyaluronidase (MP Biomedicals, San Diego, USA) behandelt, wodurch das positive Signal der HA-Färbung komplett beseitigt wurde (Daten nicht gezeigt). Die Präparate wurden mit ProLong Gold[®] (Invitrogen, Darmstadt) auf einem Objektträger eingebettet. Die optische und bildliche Darstellung der Färbung wurde unter der Verwendung von Immersionsöl (Immersion 518F, Zeiss, Oberkochen) mit einem Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskop und 63x-Objektiv durchgeführt.

6.10 IMMUNOZYTOCHEMIE

Fibroblasten wurden, wie unter Abschnitt 6.1.1 beschrieben, ausgesät und stimuliert. Die Fixierung erfolgte mit 3,7% Formalin, die anschließende Permeabilisierung der Zellen mit 0,3% Triton X100. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen, zur Anfärbung der f-Aktin-Stressfasern, mit FITC-Phalloidin (1:1000, Sigma, Steinheim) in 1% BSA/PBS für eine Stunde inkubiert. pERK wurde mittels pERK Erstantikörper (1:1000, Cell Signaling, Boston, USA) und Cy3-gekoppeltem anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (1:1000, Sigma, Steinheim), beide in 1% BSA/PBS für jeweils eine Stunde detektiert. Anschließend wurden die Präparate mit ProLong Gold[®] eingebettet. Angefärbte Stressfasern wurden mit dem Zeiss Axio Observer Z1 Mikroskop und 63x-Objektiv, unter der Verwendung von Immersionsöl, dargestellt. Die nukleäre Translokation von pERK wurde mit dem Zeiss LSM 700 Mikroskop und dem Zeiss Axio Observer Z1 ApoTome mit 63x-Objektiv nachgewiesen.

6.11 IMMUNOHISTOCHEMIE

6.11.1 ANFERTIGUNG DER KRYOSCHNITTE

Die nativ entnommenen Hautproben und dermalen Äquivalente wurden zur Schonung des Gewebes zunächst in Tissue-Tek®- Einbettmedium (Leica Microsystems, Wetzlar) bei -40°C in Isopentan eingefroren, bei -80°C gelagert und zur Weiterverarbeitung im Kryostaten auf -20°C erwärmt. An einem Kryostaten (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar) wurden 14 µm dicke Gewebsschnitte angefertigt.

6.11.2 IMMUNOHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN

Die Fixierung der Kryoschnitte auf den Objektträgern erfolgte durch 20-minütige Inkubation in 4°C kaltem Ethanol. Die Fixierlösung wurde mit 1x PBS abgewaschen. Zur Demaskierung der Epitope und somit Freilegung der Bindungsstellen für den Erstantikörper wurde im Fall der Versican-Färbung ein enzymatischer Verdau mittels Chondroitinase-ABC-Lösung (1:250, Sigma, Steinheim) für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Präparate für eine Stunde mit Blockierlösung (s. Appendix) bei Raumtemperatur inkubiert. Im direkten Anschluss wurde der dem zu untersuchenden Antigen entsprechende Primärantikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 3) aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörper mit 1x PBS abgewaschen und überschüssige Peroxidasen durch Behandlung der Schnitte mit H₂O₂-Lösung inaktiviert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugierten Zweitantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Lokalisation des Antigens erfolgte durch eine HRP-katalysierte Umsetzung von Diaminobenzidin (Zytomed Systems, Berlin). Die Kernfärbung wurde mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Eingebettet wurden die Schnitte mittels Aquatex (Merck, Darmstadt) oder Entellan (Merck, Darmstadt).

Lichtmikroskopische Bilder der immunohistochemischen Färbungen wurden mit einem Leica Mikroskop (DM2000, Leica Microsystems, Wetzlar) aufgenommen.

Tabelle 3 *Verwendete Antikörper und Konzentrationen in der Immunohistochemie*

Antikörper	Firma	Verdünnung
HAS3 (H64)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA	1:500
Anti-Maus-EGF (murin)	Abcam, Cambridge, UK	1:500
Versican (LF 99)	Zur Verfügung gestellt von Larry Fischer (NIH, USA)	1:500
Biotinyliertes Hyaluronsäure Bindeprotein (HABP)	Seikagaku, Tokio, Japan	1:250
Collagen 2 3/4Cshort	IBEX, Montreal, Kanada	1:100
Ki-67	Novus Biologicals	1:50
Mac2	Cederlane, Burlington, Kanada	1:250
PARP	Sigma, Steinheim	1:500
Esel-anti-Ziege IgG, HRP-konjugiert	Calbiochem, Darmstadt	1:1000
Streptavidin Typ IV, HRP-konjugiert	Sigma, Steinheim	1:500
Ziege-anti-Hase IgG, HRP-konjugiert	Calbiochem, Darmstadt	1:1000
Ziege-anti-Ratte IgG2a, HRP-konjugiert	Calbiochem, Darmstadt	1:1000

6.11.3 QUANTITATIVE AUSWERTUNG DER IMMUNOHISTOCHEMISCHEN FÄRBUNGEN

Um die immunohistochemischen Färbungen quantitativ auszuwerten wurde die Software ImageJ (NIH, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) verwendet. Das zusätzlich installierte Plugin *Colour Deconvolution* trennt die Farbkanäle der Kernfärbung von den jeweiligen Farbkanälen der Zielstrukturen. Über die manuelle Einrichtung eines Schwellenwertes wurden die spezifisch gefärbten Bereiche der Zielstruktur ausgewählt. Die restlichen Werte wurden als Hintergrund eliminiert. Für alle Schnitte einer Färbereihe wurde der Schwellenwert konstant gehalten. Pro Schnitt wurde anschließend in 14 Arealen innerhalb der papillären Dermis der prozentuelle Flächenanteil mit spezifisch angefärbtem Signal im Verhältnis zur Gesamtfläche bestimmt (*area fraction*) und deren Mittelwert gebildet.

6.11.4 QUANTIFIZIERUNG MAC2- UND KI-67-POSITIVER ZELLEN DURCH ZELLZÄHLUNG

Die Auszählung von Mac2- und Ki-67-positiven Zellen erfolgte für jedes Präparat anhand von drei in unterschiedlichen Gesichtsfeldern aufgenommenen lichtmikroskopischen Bildern (100x). Der jeweilige Mittelwert wurde auf die Gesamtzellzahl der im Bild sichtbaren papillären Dermis bezogen.

6.12 GESAMT-RNA-ISOLATION UND MESSUNG DER MRNA-KONZENTRATION

In vitro wurde der zu lysierende Zellrasen nach Absaugen des Mediums in 1 ml Trizol (Sigma, Steinheim) aufgenommen und bei 22°C für 10 Minuten inkubiert.

Äquivalente Mengen der murinen Hautbiopsien wurden in Stickstoff mit Hilfe der MM400 Mühle (Retsch, Haan, Deutschland) zermahlen, anschließend in 1 ml Trizol aufgenommen und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Sie umfasste eine Ausschüttelung der wässrigen Phase des Trizols gegen Chloroform. In der wässrigen Phase angereicherte RNA wurde mit kaltem Isopropanol gefällt und in Ethanol gewaschen.

Die Bestimmung der RNA Konzentration erfolgte photometrisch in 15 µl RNase freiem Wasser mit einem NanoDrop-1000 (Peqlab, Erlangen) bei 260 nm.

6.13 cDNA SYNTHESE UND QUANTITATIVE REALTIME-RT-PCR (qRT-PCR)

Eine Gesamtmenge von 1 µg RNA wurde mittels des SuperscriptTMIII First-Strand synthesis-Kits (Invitrogen, Karlsruhe) nach Anweisung des Herstellers in cDNA (kodierende DNA) umgeschrieben.

Zur Evaluation der transkriptionellen Genregulation wurden quantitative Echtzeit-RT-PCRs unter Benutzung des SYBR Green PCR Master Mix auf einer Opticon 1 Platte (MJ-Research, Waltham, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Reaktionsmix für jedes zu untersuchende Gen enthielt 10 µl Master Mix, 5 µl cDNA Lösung und 2,5 µl jedes Primers (*forward* und *reverse primer*, Endkonzentration jeweils: 10 pM). Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als interne Kontrolle gewählt.

Die Erstellung der Primer erfolgte mit Hilfe der Primer3-Software (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Eine Schmelzkurvenanalyse wurde nach Beendigung der PCR durchgeführt, um die Spezifität der verwendeten Primer und Bedingungen zu kontrollieren. Die Expression des jeweiligen analysierten Gens wurde mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Methode errechnet.

6.14 SDS-PAGE

6.14.1 PROTEINE

Die Proteine des Zellrasens wurden mit Lämmli-Puffer (Appendix) geerntet und für 5 min bei 95°C erhitzt. Die analytische Trennung der Proteingemische erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Page nach Lämmli [52]. Hierzu wurden 20 µg jeder Probe pro Spur eines Polyacrylamid-Gels aufgeladen (Tabelle 4). Die SDS-Page wurde initial bei 80 V, nach Einlauf des Proteins in das Gel bei 150 V, durchgeführt. Als Größenstandard wurde je Gel 5 µl *Pre-stained molecular weight marker* (Fermentas, St.Leon-Roth, USA) verwendet.

Tabelle 4 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
0,5 M Tris pH 6,8	0,625 ml	
1,5 Tris pH 8,7		1,85 ml
10% SDS	50 µl	75 µl
dH₂O	3,6895 ml	4,545 ml
40% Acrylamid	375 µl	375 µl
Temed	5 µl	5 µl
10% APS	50 µl	25 µl

6.14.2 PROTEOGLYKANE

Proetoglykane wurden nach beschriebenem Standardprotokoll aus dem Zellüberstand isoliert [126]. Hierfür wurden Proben gleichen Volumens geerntet und über eine Sephacel® DEAE Säule chromatographisch aufgereinigt. Zur Bereinigung von Harnstoff und Salzen wurde das Eluat dreimal mit einem Gemisch aus kaltem, 96% Ethanol und 1,3% Kaliumacetat ausgefällt und bei 4°C zentrifugiert. Das salzfreie Pellet wurde in 20 µl ddH₂O resuspendiert und mit Chondrotinase ABC (Saikagaku, Tokia, Japan) für 3 Stunden bei 37°C verdaut, um die Glykosaminoglykanketten von den Kernproteinen der Proteoglykane zu trennen. Ein Drittel des verdauten Volumens wurde mittels eines großen SDS-Page-Gradientengels (4-12%; Tabelle 5) bei initial 20 mA und nach dem Einlauf in des Trenngel über Nacht bei 6 mA aufgetrennt.

Tabelle 5 Zusammensetzung von Trenn- und Gradientengel (4-12%).

	Trenngel (3,5%)	Gradientengel Komponente 1 (4%)	Gradientengel Komponente 2 (12%)
Acryl./Bis (40%)	870 µL	1,5 ml	4,5 ml
0,5M Tris Base	1,25 ml		
3M Tris Base		1,95 ml	1,95 ml
10% SDS	100 µL	150 µL	150 µL
dH ₂ O	7,67 ml	11,34 ml	8,34 ml
Temed	10 µL	10 µL	10 µL
APS	100 µL	50 µL	50 µL

6.15 WESTERN-BLOT

Der Transfer der Proteine erfolgte in einem *semidry*-Blot. Über das senkrecht zum Gel angelegte elektrische Feld wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 1000 mA auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer wurden unspezifische Bindungsstellen durch die Inkubation mit 5% BSA/TBST für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Erstantikörper wurden in der jeweils angegebenen Verdünnung (Tabelle 6) in TBST über Nacht bei 4°C eingesetzt. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit TBST wurden die Membranen für 1 h bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Zweitantikörper im Dunkeln inkubiert. Es folgten fünf Waschschritte in 1x TBST und die darauffolgende Detektion mittels des Li-Cor Odyssey.

Tabelle 6 Für die Western-Blot-Analyse verwendete Antikörper.

Antikörper	Firma	Verdünnung
Versican (LF99)	Zur Verfügung gestellt von Larry Fischer (NIH, USA)	1:1000
Has3 (H64, murin)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	1:1000
Has3 (human)	Sigma, Steinheim	1:1000
COX-2	Cayman, Ann Arbor, USA	1:1000
Mac2	Cedarlane, Burlington, Canada	1:250
IRDye 680 Ziege-anti-Hase IgG	LiCOR Bioscience, Lincoln USA	1:5000
IRDye 800CW Ziege-anti-Hase IgG		
IRDye 680 Ziege-anti-Maus IgG		
IR800CW Ziege-anti-Maus IgG		

6.16 FACS (FLUORESCENT ACTIVATED CELL SORTING)-ANALYSE

Die FACS-Analyse ist eine auf Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften von suspendierten Einzelzellen basierende Methode. Für eine detaillierte Beschreibung der Methode wird auf den Übersichtsartikel von L.A. Herzenberg et al. verwiesen [45].

Die Bestimmung des prozentuellen Anteils apoptotischer Zellen nach Behandlung mit KF und nach UVB Bestrahlung erfolgte mittels Messung der mittleren Fluoreszenzintensität von Alexa-488-gekoppeltem Annexin-V-Antikörper (Cell Signaling, Boston, USA) [116]. Annexin-V besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserinen, die als frühes Ereignis während des programmierten Zelltodes von der Innenseite der Zellmembran nach außen verlagert werden.

Die Zellen wurden entsprechend ihrer *Scattereigenschaften gated* und die mittlere Fluoreszenzintensität des Alexa-Fluor[®]-488-Farbstoffes wurde ermittelt. Als Positivkontrolle diente Staurosporin (Sigma, Steinheim).

6.17 LENTIVIRALE AUSSCHALTUNG DER HAS3-MRNA-EXPRESSION

Die genetische Ausschaltung der HAS3 wurde mit Hilfe des MISSION[™] *Lentiviral shRNA knockdown systems* (Sigma-Aldrich, München) durchgeführt. Durch die Interferenz-RNA-Technik kommt es zu einer effektiven Depletion der mRNA des Zielgens.

Die lentivirale Produktion basiert auf einem Drei-Plasmid-System, bei dem jedem Plasmid eine unterschiedliche Funktion zukommt. Eins der Plasmide kodiert für das VSV-G (Vesikuläres Stomatitis Virus G-Protein)-Hüllprotein und ein Plasmid trägt die aus Sicherheitsgründen verkürzten Stücke der HIV-1 (Humanes Immundefizienz-Virus 1) Strukturproteine. Das dritte Plasmid enthält eine shRNA-Sequenz, die gegen HAS3 gerichtet ist.

Das Einfügen eines Ampicillin-Resistenz-Gen (*ampR*) ist des Weiteren nötig, um den Vektor über eine Selektion in *E. coli* Bakterien zu vervielfältigen. Bei der Infektion der Zielzelle wird nur die Sequenz zwischen den beiden *Long Terminal Repeats* (LTRs) in die DNA des Wirtes integriert. Da sich hier keine für den Aufbau der Lentiviren wichtigen Gene befinden, ist sichergestellt, dass keine vermehrungsfähigen Lentiviren von den Zielzellen produziert werden. Das Verpackungssignal *Psi* sorgt schließlich dafür, dass die DNA in die in der Produktionszelllinie entstehenden Lentiviren verpackt wird.

6.17.1 VERMEHRUNG DER PLASMIDE

Unter Nutzung des im Plasmid vorhandenen Ampicillin-Resistenz-Gens, erfolgte die selektive Amplifikation in *E.coli* Bakterien. Die Gesamt-DNA wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und photometrisch bei 260 nm quantifiziert.

6.17.2 PRODUKTION DER LENTIVIREN

Mit Hilfe des Lipofektions-Reagenz Fugene 6[®] (Roche, Mannheim) wurde der Transfer in die Produktionszelllinie HEK 293T durchgeführt. Zur besseren Stabilisierung der Lentiviren wurde das Wachstumsmedium (DMEM) nach 16 Stunden gegen HEPES-gepuffertes Spezialmedium (*Isocove's Modified Dulbecco's Medium*) ausgewechselt. Am Folgetag wurden die Lentiviren geerntet und unter Zugabe von Poly-L-Lysin aufkonzentriert [127].

6.17.3 INFEKTION DER ZELLEN

Die Zielzellen wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 infiziert. Um die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran zu verbessern, wurden 10 µg/ml Protaminsulfat zugegeben. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt. Nach einer Wartezeit von einer Woche und mindestens drei Medienwechseln wurde die Ausschaltung der Zielgene mittels qRT-PCR validiert.

6.18 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Experimenten dargestellt. Datensätze wurden mittels ungepaartem Student's-t-Test verglichen, wenn nur zwei Gruppen von Daten getestet wurden. Um signifikante Unterschiede zwischen drei und mehr Konditionen zu überprüfen, wurden die Daten mittels *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* und nachfolgendem *Bonferroni-Test für multiple Vergleiche* analysiert. Ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit der *GraphPad Prism[®]-Software* (Version 5.0, GraphPad Software, San Diego, USA).

7 ERGEBNISSE

7.1 NEGATIVE MODULATION DER HA-MATRIX: KOLLAGENFRAGMENTE

7.1.1 EINFLUSS VON KOLLAGENFRAGMENTEN AUF APOPTOSE UND PROLIFERATION

KF wurden durch Verdauung mit Kollagenase Typ 3 aus polymerisierten Kollagen Typ 1-Gelen hergestellt. Es ist bekannt, dass KF dosisabhängig apoptotische Prozesse in glatten Muskelzellen hervorrufen können [113]. Um in späteren Versuchen pro-apoptotische Prozesse und anti-proliferative Effekte zu vermeiden, wurden in einer vorbereitenden Versuchsreihe zunächst Konzentrationswirkungsbeziehungen, in einer Konzentrationsspanne von 50-250 $\mu\text{g/ml}$ KF untersucht.

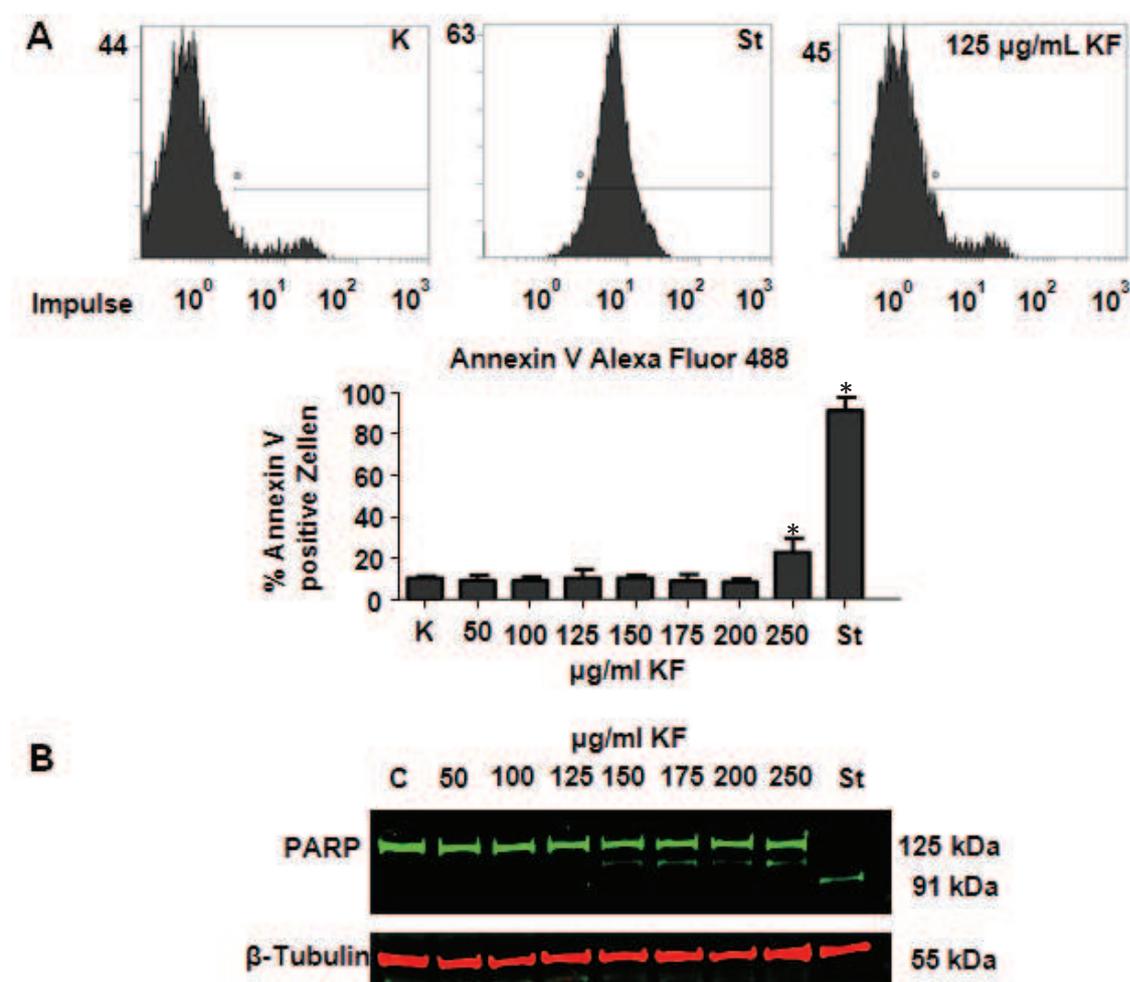


Abbildung 7 Konzentrationsabhängige Induktion der Apoptose dermaler Fibroblasten durch KF. Humane dermale Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit KF (KF, 50-250 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. **(A)** Apoptose wurde per Annexin-V FACS-Analyse untersucht. Staurosporin (St, 2 μM , 24h) diente als Positiv-Kontrolle. Repräsentative Flussdiagramme demonstrieren die Platzierung des Gate anhand der Kontrolle (K) zur Analyse von Annexin-V-negativen beziehungsweise -positiven Zellen. **(B)** PARP-Spaltung wurde per Immunoblot analysiert, um auf Apoptose in Antwort auf KF zu testen. β -Tubulin diente als Ladungskontrolle. n=3-6, Mittelwert \pm SEM; *, p<0,05

In dermalen Fibroblasten führten KF ab einer Konzentration von 250 µg/ml zu einer erhöhten Apoptoserate, wie durch die Annexin-V FACS-Analyse (Abbildung 7A) gezeigt werden konnte. Klassische Spaltprodukte von PARP, wie sie in der Staurosporin-Kontrolle sichtbar wurden (Abbildung 7B), konnten bis zu einer Konzentration von 250 µg/ml KF nicht detektiert werden. Als Maß für die Proliferation wurde die [³H]-Thymidin-Inkorporation in die DNA untersucht (Abbildung 8). Eine Reduktion der Proliferation war ab einer Konzentration von 150 µg/ml sichtbar. Für alle weiteren Versuche wurde daher eine Konzentration von 125 µg/ml gewählt.

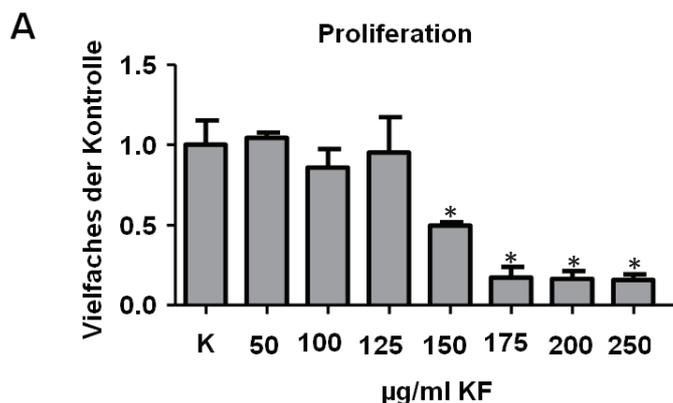


Abbildung 8 Einfluss von KF auf die Proliferation dermalen Fibroblasten. **(A)** Humane dermale Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit KF (KF, 50-250 µg/ml) inkubiert. Die DNA-Synthese wurde anhand der [³H]-Thymidin-Inkorporation als Maß für die Proliferation untersucht. n=3-6, Mittelwert ± SEM; *, p<0,05

7.1.2 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DURCH KF

Die Morphologie von Fibroblasten, die mit KF behandelt wurden, änderte sich in den ersten 24 Stunden deutlich (Abbildung 9) von einem flachen adhärenenten, zu einem spindelförmigen Phänotyp. Mikroskopische Beobachtung der Zellen über einen längeren Inkubationszeitraum (bis zu 96 Stunden) zeigte jedoch, dass die Veränderung des Phänotyps sich mit der Dauer der Behandlung wieder dem der Kontrollzellen anpasste (Daten nicht gezeigt).

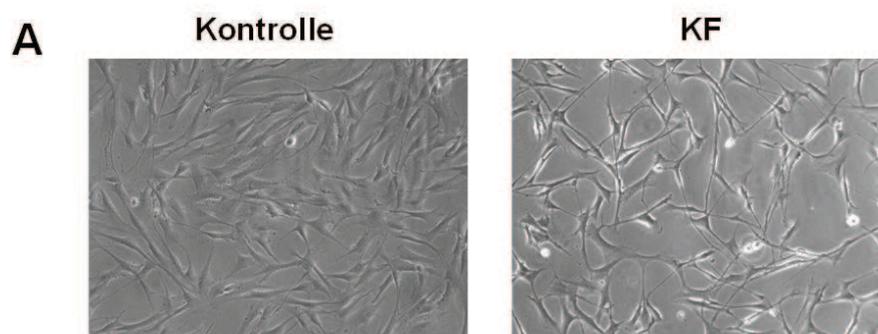


Abbildung 9 Morphologische Veränderungen nach KF Stimulation. **(A)** Repräsentative, durchlichtmikroskopische Bilder dermalen Fibroblasten nach 24-stündiger Behandlung mit Kontrollmedium oder KF (125 µg/ml), welche *in situ* durch Spaltung von Kollagen 1 hergestellt wurden; 40x Vergrößerung.

7.1.3 VERÄNDERUNG DER HA-MATRIX DURCH KF

Untersuchungen zum Einfluss von KF auf die HA-Matrix von Fibroblasten zeigten deutliche Veränderungen. So stellte die Anfärbung der perizellulären HA nach essigsaurer Fixierung eine drastische Reduktion der für Fibroblasten typischen haarähnlichen HA-Strukturen dar (Abbildung 10 B). Dies spiegelte sich zudem in einer Abnahme des HA-Gehalts im Überstand von mit KF behandelten Fibroblasten wieder. Des Weiteren wurde die Größenverteilung der von den Fibroblasten *de novo*-sezernierten HA durch KF in Richtung kleinerer Kettenlängen verschoben, was anhand der Sephacryl S-1000 Größenausschlusschromatographie von [³H]-Glukosamin markierter HA deutlich wurde (Abbildung 10 C).

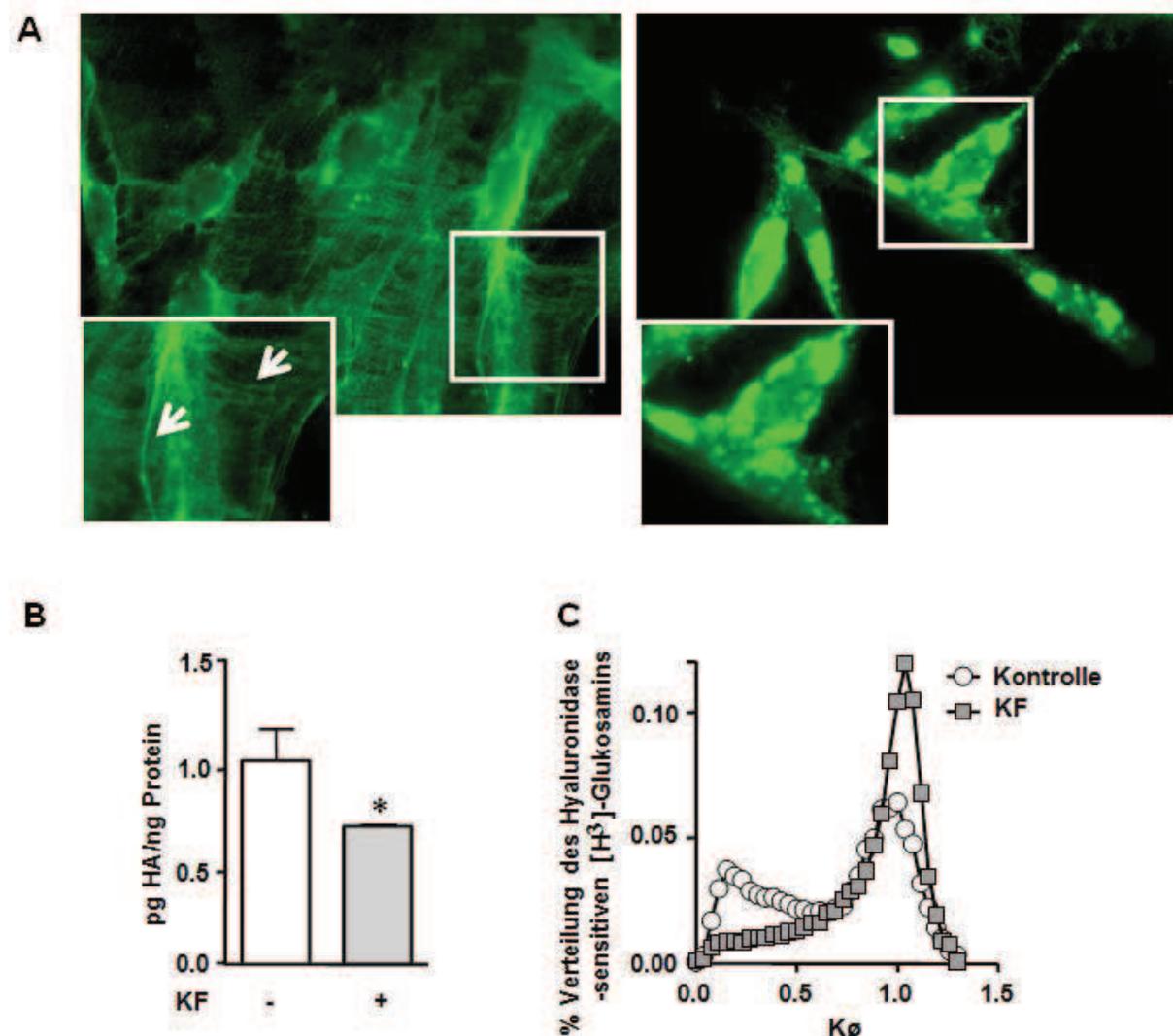


Abbildung 10 Veränderungen der HA-Matrix durch KF. **(A)** Darstellung der perizellulären HA nach saurer Formalin/Ethanol-Fixierung und Anfärbung mit biotinyliertem HAbP und Streptavidin-FITC; 63x Vergrößerung, Einsätze 200x. Die Pfeile deuten auf für Fibroblasten typische „haarähnliche“ HA-Strukturen. **(B)** HA-Sekretion ins Medium. **(C)** Darstellung der Größenverteilung von *de novo* synthetisierter [³H]-Glukosamin-markierter HA, welche über eine Sephacryl S1000-Säule aufgetrennt wurde. n=3-6, Mittelwert ± SEM; *, p<0,05

Die Untersuchung der relativen mRNA-Expression der einzelnen HAS-Isoenzyme per qRT-PCR zeigte, dass das HAS2-Transkript etwa 95% der Gesamtmenge aller Isoenzyme unter Kontrollbedingungen darstellt (Abbildung 11). KF verursachen eine differentielle Regulation der einzelnen Isoenzyme, wobei eine Induktion der HAS1-mRNA-Menge, eine Reduktion der HAS2-mRNA-Menge und keine Regulation in Bezug auf die HAS3-mRNA-Menge detektiert werden konnte (Abbildung 11).

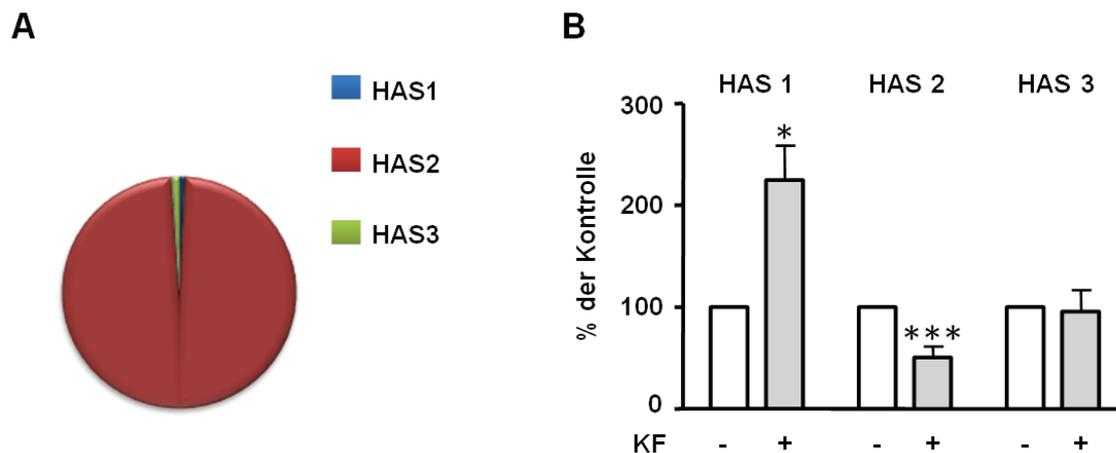


Abbildung 11 Veränderung der mRNA-Expression der HAS-Isoenzyme. **(A)** Kuchendiagramm der per qRT-PCR detektierten relativen mRNA Expression der einzelnen HAS-Isoenzyme. **(B)** Durch qRT-PCR ermittelte Regulation der HAS-Isoenzyme als Reaktion auf eine 24 stündige Stimulation mit KF. n=3-6, Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,01$

7.1.4 $\alpha_v\beta_3$ -INTEGRIN-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION REDUZIERT DIE HAS2-MRNA-EXPRESSION

In glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass KF aktivierend auf die $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Signaltransduktion wirken [113]. Um zu untersuchen, ob auch in Fibroblasten $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an der zellulären Antwort auf KF beteiligt sind, wurden Fibroblasten für 24 h in der An- bzw. Abwesenheit von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-blockierenden Antikörpern mit KF stimuliert. Wie in Abbildung 12 gezeigt, führte die Blockade des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins zu einer Aufhebung des durch die KF hervorgerufenen Effektes, bezogen sowohl auf die HAS1- als auch die HAS2-mRNA-Expression. Diesen Ergebnissen entsprechend zeigte die Stimulation mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-aktivierenden RGDS (arg-gyl-asp-ser)-Peptiden ein mit der nach KF-Stimulation übereinstimmendes mRNA-Expressionsprofil der HAS-Isoenzyme. Eine Veränderung der Verteilung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen durch die Behandlung mit KF fand hierbei nicht statt, wie immunozytochemisch gezeigt werden konnte (Abbildung 12 B).

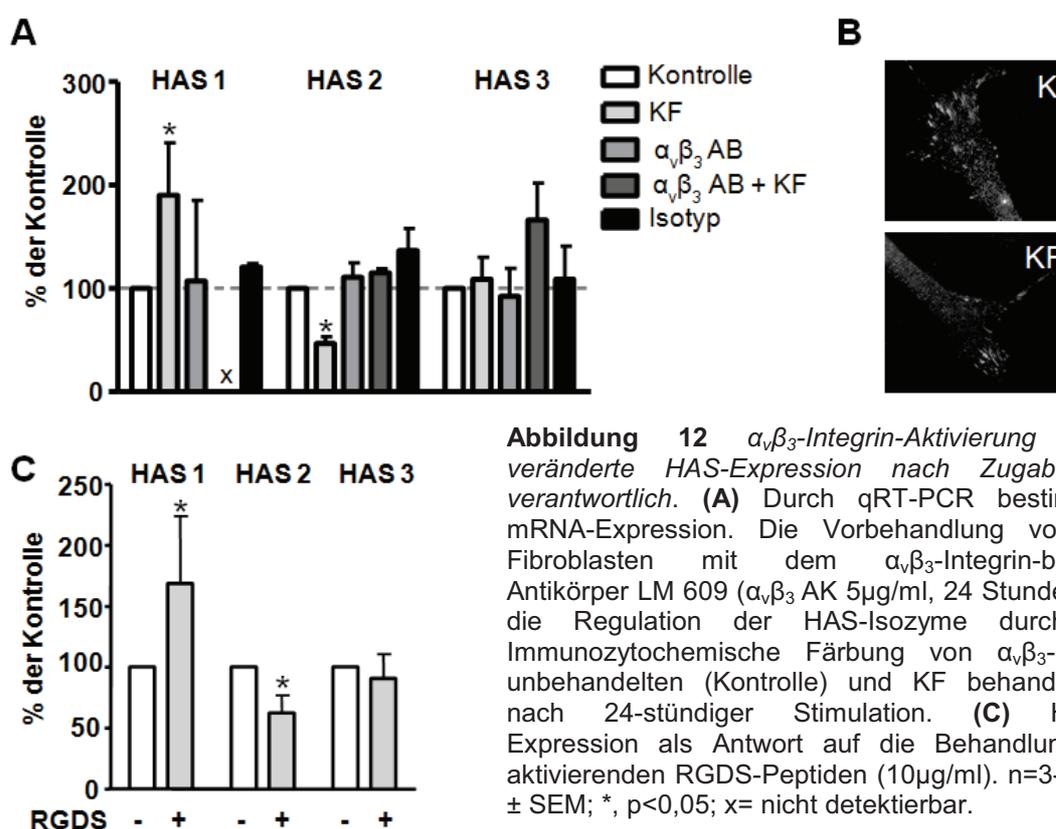


Abbildung 12 $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Aktivierung ist für die veränderte HAS-Expression nach Zugabe von KF verantwortlich. **(A)** Durch qRT-PCR bestimmte HAS-mRNA-Expression. Die Vorbehandlung von dermalen Fibroblasten mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-blockierenden Antikörper LM 609 ($\alpha_v\beta_3$ AK 5 μ g/ml, 24 Stunden) inhibierte die Regulation der HAS-Isozyme durch KF. **(B)** Immunocytochemische Färbung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin- an unbehandelten (Kontrolle) und KF behandelten Zellen nach 24-stündiger Stimulation. **(C)** HAS-Isozym-Expression als Antwort auf die Behandlung mit $\alpha_v\beta_3$ -aktivierenden RGDS-Peptiden (10 μ g/ml). n=3-6, Mittelwert \pm SEM; *, p<0,05; x= nicht detektierbar.

Zur Beantwortung der Frage, welche Ursachen die morphologischen Veränderungen der Fibroblasten haben könnten, wurden die mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen assoziierten Aktin-Stressfasern mittels Phalloidin-FITC immunozytochemisch angefärbt.

KF verursachten einen partiellen Zusammenbruch der Aktinintegrität. Die morphologischen Veränderungen, sowie die Reorganisation des Zytoskeletts konnten durch Blockade von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen, aufgehoben werden (Abbildung 13). Folglich wurde vermutet, dass KF über die Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-medierten Signaltransduktionswege ihre Effekte auf die HAS-mRNA-Expression und das Aktin-Zytoskelett bewirkten.

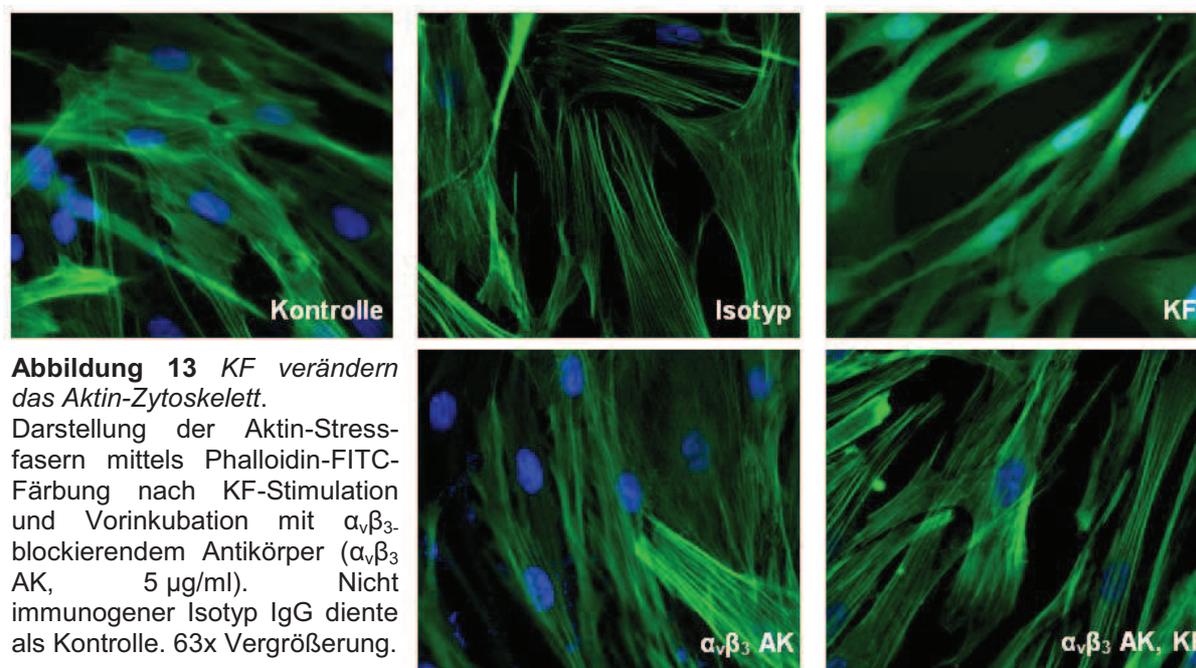


Abbildung 13 KF verändern das Aktin-Zytoskelett. Darstellung der Aktin-Stressfasern mittels Phalloidin-FITC-Färbung nach KF-Stimulation und Vorinkubation mit $\alpha_v\beta_3$ -blockierendem Antikörper ($\alpha_v\beta_3$ AK, 5 µg/ml). Nicht immunogener Isotyp IgG diente als Kontrolle. 63x Vergrößerung.

7.1.5 EINFLUSS DER SIGNALMOLEKÜLE ROCK UND ERK AUF DIE KF-VERMITTELTE HAS2-MRNA-REGULATION

Als nächstes wurden $\alpha_v\beta_3$ -Integrin nachgeschaltete Effektorproteine untersucht, welche an der Regulation der HAS2 beteiligt sein können. Es war bekannt, dass $\alpha_v\beta_3$ -Integrine, abhängig von der Zellart und den experimentellen Konditionen, diverse Signalwege aktivieren [2, 54, 70]. Da KF und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin einen eindeutigen Effekt auf das Zytoskelett und HAS2 hatten, wurde im Folgenden untersucht, ob diese beiden Effekte miteinander in Verbindung stehen. Es zeigte sich, dass die Degradierung des Aktin-Zytoskeletts durch Latrunculin A [23] das gleiche HAS-Expressionsprofil verursachte wie die Stimulation mit KF (Abbildung 14): HAS1 wurde induziert, HAS2 herabreguliert und HAS3 blieb unverändert. Als wichtiger Regulator der Organisation des Zytoskeletts wurde im Folgenden der Einfluss der Rho-Kinase (ROCK) evaluiert. Der ROCK-Inhibitor Y27632 regulierte die HAS1-mRNA hoch, HAS2 herunter und zeigte keinen Effekt auf HAS3 (Abbildung 14 A). Die Hypothese, dass ROCK bei der KF hervorgerufenen Signaltransduktion eine wesentliche Rolle spielt, wurde zusätzlich durch Verwendung von Lysophosphatid-Säure (LPA), einem ROCK-Aktivator [60, 105] unterstützt. Gleichzeitige Stimulation von LPA mit KF unterband das Auftreten des für KF charakteristischen HAS-Expressionsprofils (Abbildung 14 B).

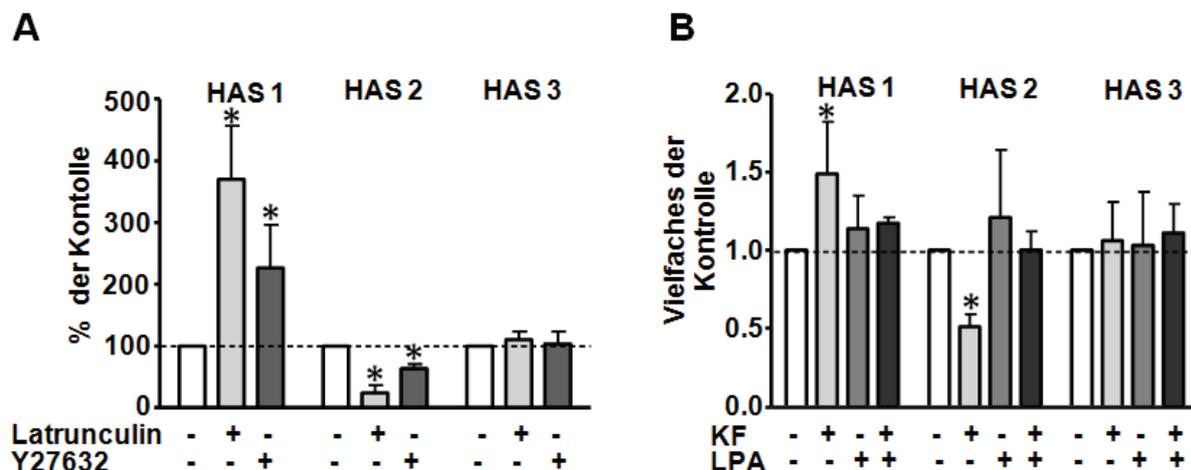


Abbildung 14 Hemmung von ROCK reguliert die HAS-Expression. Per qRT-PCR detektierte mRNA-Expression dermalen Fibroblasten. **(A)** mRNA-Expression nach Behandlung mit Latrunculin A (3 $\mu\text{mol/L}$, 24 h) oder ROCK-Inhibitor Y27632 (10 $\mu\text{mol/L}$, 24 h). **(B)** Stimulation mit dem Rock-Aktivator LPA (300 nmol/L) in An- und Abwesenheit von KF. $n=3-5$, Mittelwert \pm SEM; *, $p<0,05$

Bekanntermaßen führt ROCK über eine Aktivierung der LIM-Kinase zu einer Phosphorylierung von Cofilin [56], welches in phosphoryliertem Zustand seine Aktin-depolymerisierende Aktivität verliert. Das Aktin-Zytoskelett ist seinerseits essentiell für die Translokation von phosphoryliertem ERK1/2 aus dem Zytoplasma in den Nukleus [68]. Es wurde daher im Weiteren untersucht, ob die Cofilin-Phosphorylierung spezifisch von KF und durch $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Signaltransduktion beeinflusst wurde. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Cofilin-Phosphorylierung signifikant durch eine 24-stündige Stimulation mit KF reduziert wurde (Abbildung 15). Dieser Sachverhalt konnte durch Inkubation mit blockierenden Antikörpern gegen $\alpha_v\beta_3$ -Integrine vor KF-Stimulation aufgehoben werden. Zeitverläufe des HAS2-mRNA-Gehaltes und der Cofilin-Dephosphorylierung nach KF-Stimulation ergaben einen zeitlich kongruenten Verlauf mit jeweiliger starker Abnahme ab einem Inkubationszeitpunkt von 6 Stunden (Abbildung 16).

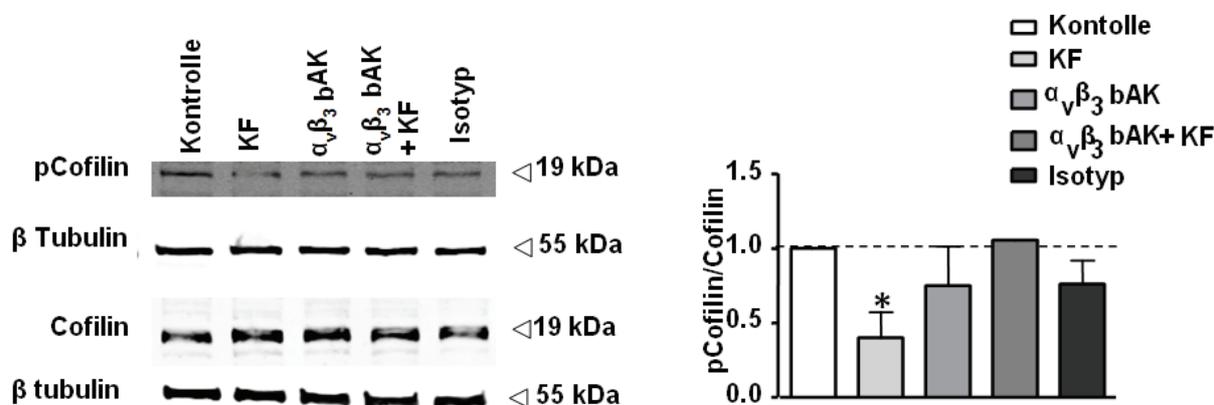


Abbildung 15 KF hemmen die Cofilin-Phosphorylierung. **(A)** Cofilin und phosphoryliertes Cofilin wurden per Western Blot nach 24-stündiger Behandlung mit KF in An- und Abwesenheit von $\alpha_v\beta_3$ -blockierendem Antikörper ($\alpha_v\beta_3$ bAK, 5 $\mu\text{g/ml}$) oder IgG-Kontrolle detektiert. $n=3$, Mittelwert \pm SEM; *, $p<0,05$

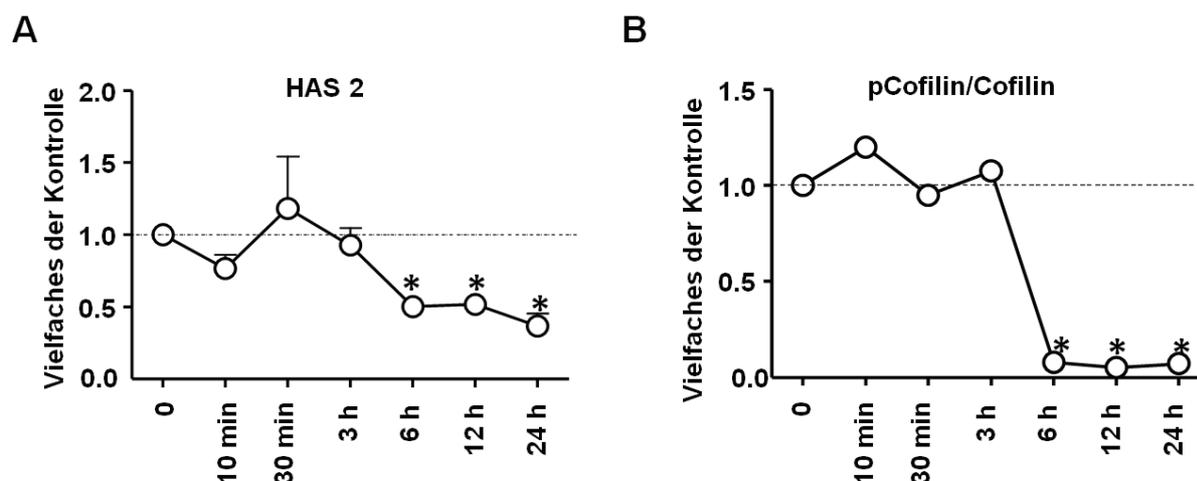


Abbildung 16 Zeitliche Korrelation der Suppression von HAS2 und der Cofilin Phosphorylierung. **(A)** Cofilin und phosphoryliertes Cofilin wurden per Western Blot nach 24-stündiger Behandlung mit KF in An- und Abwesenheit von $\alpha_v\beta_3$ -blockierendem Antikörper ($\alpha_v\beta_3$ bAK, 5 μ g/ml) oder IgG-Kontrolle detektiert. **(B)** Zeitverlauf der mittels qRT-PCR detektierten HAS2-mRNA-Expression. **(C)** Zeitverlauf der per Western Blot ermittelten Cofilin-Phosphorylierung. n=3, Mittelwert \pm SEM; *, p<0,05

Neben ihrer Funktion als Stützgerüst der Zelle sind Aktinfilamente an diversen zellulären Transduktionswegen beteiligt. So fungieren sie beispielsweise als Transportstrecke für Vesikel. Auch die Translokation von pERK in den Nukleus ist abhängig von dem Vorhandensein eines intakten Aktin-Zytoskeletts [4]. Es wurde daher vermutet, dass die durch KF vermittelte Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin die HAS2-Expression über eine Beeinflussung des Zytoskeletts, und somit verminderter pERK1/2-Translokation, reduziert. Übereinstimmend mit dieser Hypothese verursachte der MEK1-Inhibitor PD98059, welcher zu einer reduzierten ERK1/2-Phosphorylierung führt, eine spezifische Reduktion der HAS2-mRNA (Abbildung 17). Allerdings führte die Stimulation mit KF im kompletten Zelllysat zu einer vermehrten ERK1/2-Phosphorylierung, wie im Western Blot gezeigt werden konnte (Abbildung 18).

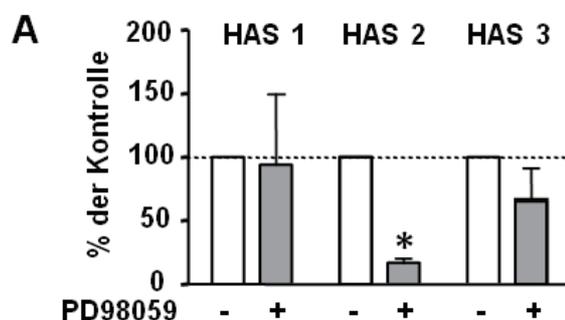


Abbildung 17 Reduktion der HAS2-mRNA-Expression durch ERK1/2-Inhibition. **(A)** Detektion der HAS-mRNA mittels qRT-PCR nach Hemmung von MEK1/2 durch den Inhibitor PD98059 (10 μ mol/l) und somit Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung. n=4, Mittelwert \pm SEM; *, p<0,05

Um dieses überraschende Ergebnis weiter zu untersuchen und die genaue Lokalisation von pERK1/2 nach KF-Stimulation in der Zelle zu evaluieren, wurden immunozytochemische Färbungen angefertigt und konfokal mikroskopiert. Wie in Abbildung 18 gezeigt, verursachte die Stimulation mit KF in dermalen Fibroblasten eine signifikante Reduktion des pERK1/2-Signals im Nukleus im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Zusätzlich zur verminderten pERK1/2-Translokation konnte nachgewiesen werden, dass der Transkriptionsfaktor ELK-1 ein Zielprotein von pERK1/2 in mit KF behandelten Zellen weniger phosphoryliert und somit wenig aktiviert vorlag.

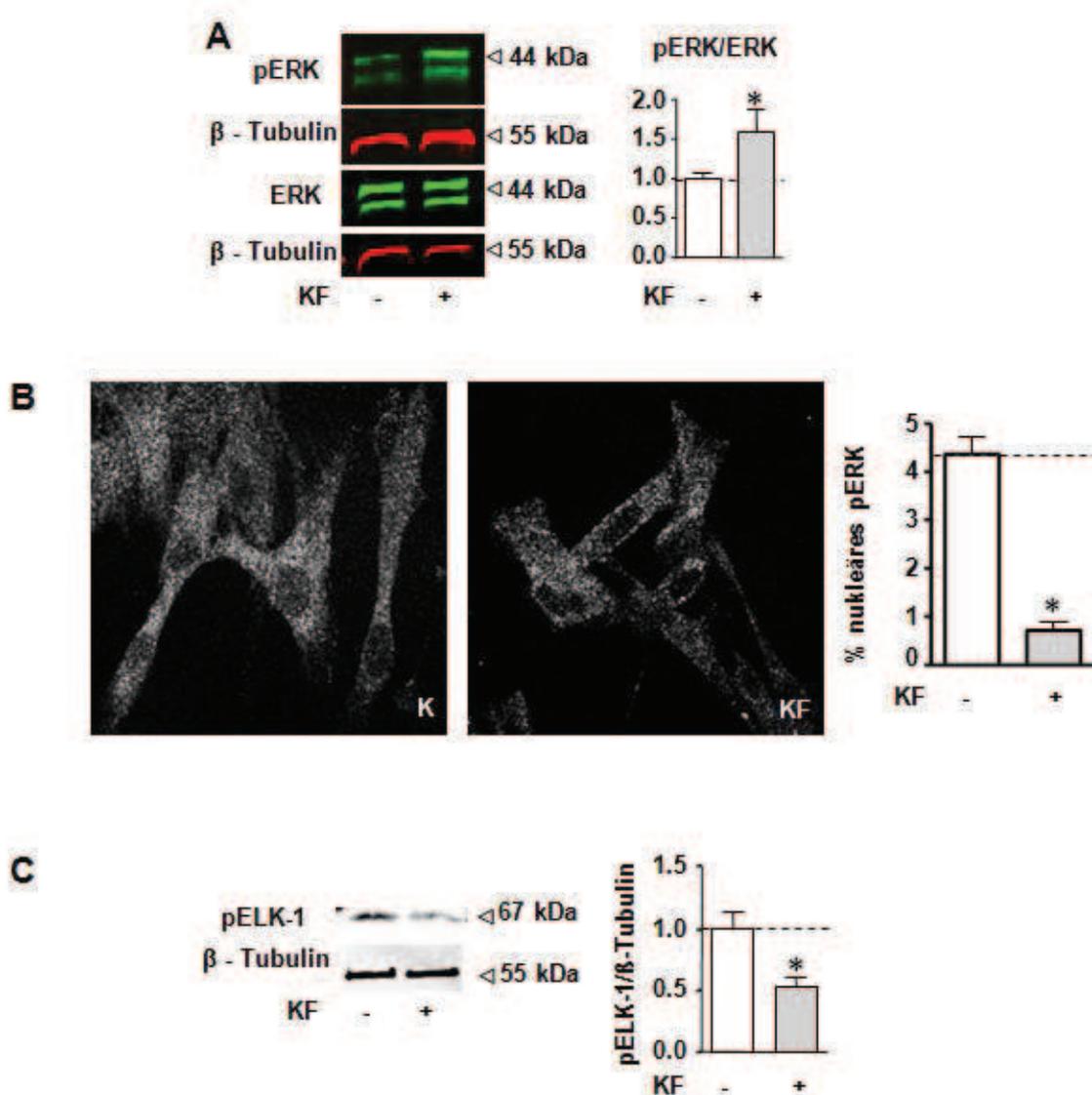


Abbildung 18 Hemmung der nukleären EKR1/2-Aktivität durch KF. **(A)** ERK und pERK nach 24-stündiger KF-Behandlung; Analyse per Western Blot. **(B)** Konfokal mikroskopische Bilder und Quantifizierung der nukleären Translokation von pERK dargestellt durch Immunozytochemie; 63x Vergrößerung. Zur quantitativen Auswertung wurden vier Bilder pro Färbung aus drei individuellen Experimenten mit Hilfe des Programms ImageJ[®] ausgewertet. **(C)** Der Phosphorylierungsstatus von ELK-1, einem nukleären Effektorprotein von pERK1/2, wurde per Western Blot aus Zelllysate bestimmt. n=3-5, Mittelwert \pm SEM; *, $p < 0,05$.

Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass KF über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine zu einer Hemmung von ROCK und der Aktin-abhängigen Translokation von pERK1/2 in den Nukleus führten und dadurch die HAS2-Transkription reduzierten.

7.1.6 DURCH UVB-BESTRAHLUNG ENTSTANDENE KF UND DEREN SIGNALTRANSDUKTION

In Übereinstimmung mit dem Effekt, der nach KF-Stimulation gezeigt werden konnte, wurde auch nach UVB-Bestrahlung eine Reduktion des pERK1/2-Signals im Nukleus dermalen Fibroblasten nachgewiesen (Abbildung 19). Die signifikant reduzierte Translokation von pERK1/2 nach UVB-Bestrahlung wurde bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit MMP-Inhibitor aufgehoben.

A

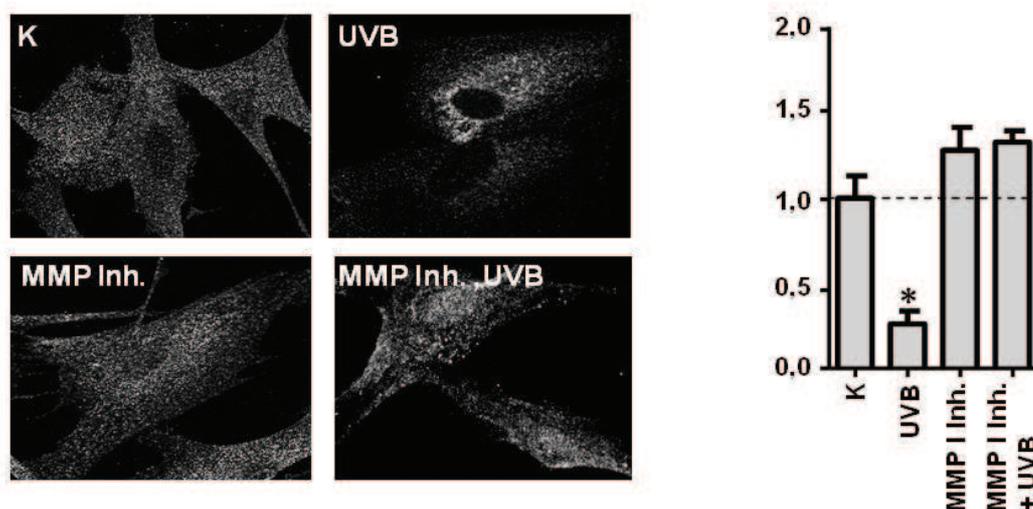


Abbildung 19 Hemmung der nukleären Translokation von pERK1/2 durch UVB-Strahlung. (A) Die nukleäre Translokation von pERK wurde anhand von immunozytochemischen Färbungen visualisiert (Zeiss ApoTome, Axio Observer Z1, 63x Vergrößerung) und an vier Bildern pro Färbung und drei unabhängigen Experimenten quantifiziert. n=3, Mittelwert ± SEM; *, p<0,05.

Zum weiteren Nachweis, dass endogen entstandene KF nach UVB-Bestrahlung tatsächlich zu einer Herabregulation der HAS2 führen, wurde nach UVB-Bestrahlung der Fibroblasten dem Medium Kollagen Typ1 in An- und Abwesenheit des MMP-Inhibitors zugesetzt. Nach dreitägiger Inkubation wurden die Überstände abgenommen und auf frisch ausgesäte Fibroblasten gegeben. Nach weiteren 24 h konnte in diesen Zellen eine Reduktion der HAS2-Expression detektiert werden. Medium, welchem MMP1-Inhibitor direkt nach der Bestrahlung zugesetzt wurde, konnte diesen Effekt nicht hervorrufen. Des Weiteren führte auch die gleichzeitige Inkubation der frisch ausgesäten Zellen mit den Überständen und blockierendem Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ -Integrine zur Aufhebung der HAS2-Herabregulation (Abbildung 20).

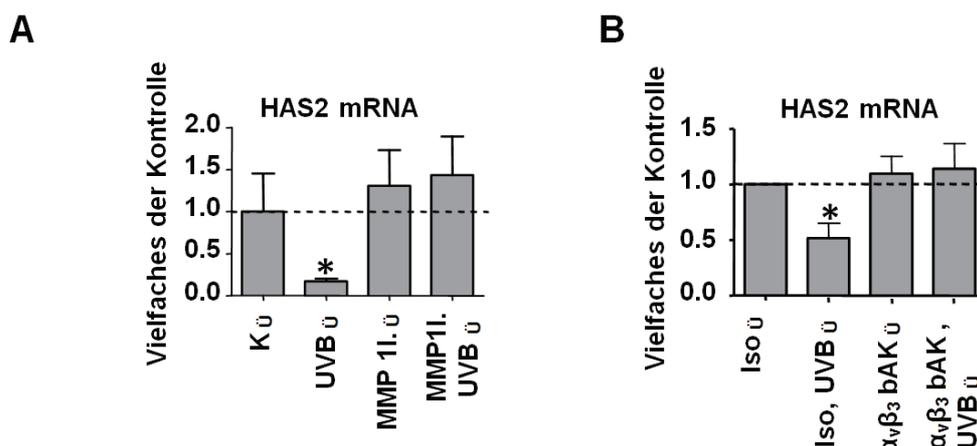


Abbildung 20 Durch UVB-Strahlung hervorgerufene KF hemmen HAS2 via $\alpha_v\beta_3$ -Integrine. Per qRT-PCR ermittelte HAS2-mRNA-Expression. Kollagen Typ 1 (120 $\mu\text{g/ml}$) wurde dem Überstand von dermalen Fibroblasten zugesetzt (K_Ü). Im Folgenden wurden die Zellen in An- beziehungsweise Abwesenheit von MMP-Inhibitor (MMP 1 I._Ü, 300 nmol/l) mit UVB-Licht bestrahlt (UVB_Ü, 100 mJ/cm^2). **(A)** Nach drei Tagen Inkubation wurden die Überstände auf frisch ausgesäte Zellen übertragen und nach weiteren 24 h Inkubation das mRNA-Expressionsniveau von HAS2 bestimmt. **(B)** Zusätzlich wurden Fibroblasten von der Stimulation mit den Überständen mit blockierendem Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ -Integrine ($\alpha_v\beta_3$ bAK, 5 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. n=3-6, Mittelwert \pm SEM; *, p<0,05.

7.1.7 DURCH UVB-STRAHLUNG HERVORGERUFENE KOLLAGENFRAGMENTIERUNG UND $\alpha_v\beta_3$ -AKTIVIERUNG REDUZIERT DIE HAS2-EXPRESSION IN DERMALEN ÄQUIVALENTEN.

Um durch UVB-Strahlung hervorgerufene Veränderungen *in vivo* möglichst detailgetreu experimentell darstellen zu können und um die Entstehung von quantitativ ausreichenden KF zu ermöglichen, wurden in den folgenden Experimenten dermale Äquivalente aus dermalen Fibroblasten und Typ 1 Kollagen verwendet. Hierbei wurde zunächst untersucht, ob die UVB-Bestrahlung eine Kollagenfragmentierung zu Folge hat. Hierzu wurden Schnitte der bestrahlten und unbestrahlten dermalen Äquivalente immunohistologisch auf Kollagen-Neoepitope angefärbt. Nach einer einmaligen Bestrahlung mit UVB-Licht wurde die Entstehung von Kollagen-Neoepitopen über einen Zeitraum von 96 h untersucht (Abbildung 21 A). Zusätzlich wurde mRNA isoliert und die MMP1-mRNA-Expression detektiert (Abbildung 21 B). Eine Erhöhung der MMP1-mRNA zeigte sich nach 48 h (Abbildung 21 C) Bemerkenswerterweise trat eine deutliche Reduktion der HAS2-mRNA nach 96 h, nach dem Zeitpunkt der höchsten MMP1-Transkription, und zum gleichen Zeitpunkt der größten Akkumulation von KF auf (Abbildung 21 D).

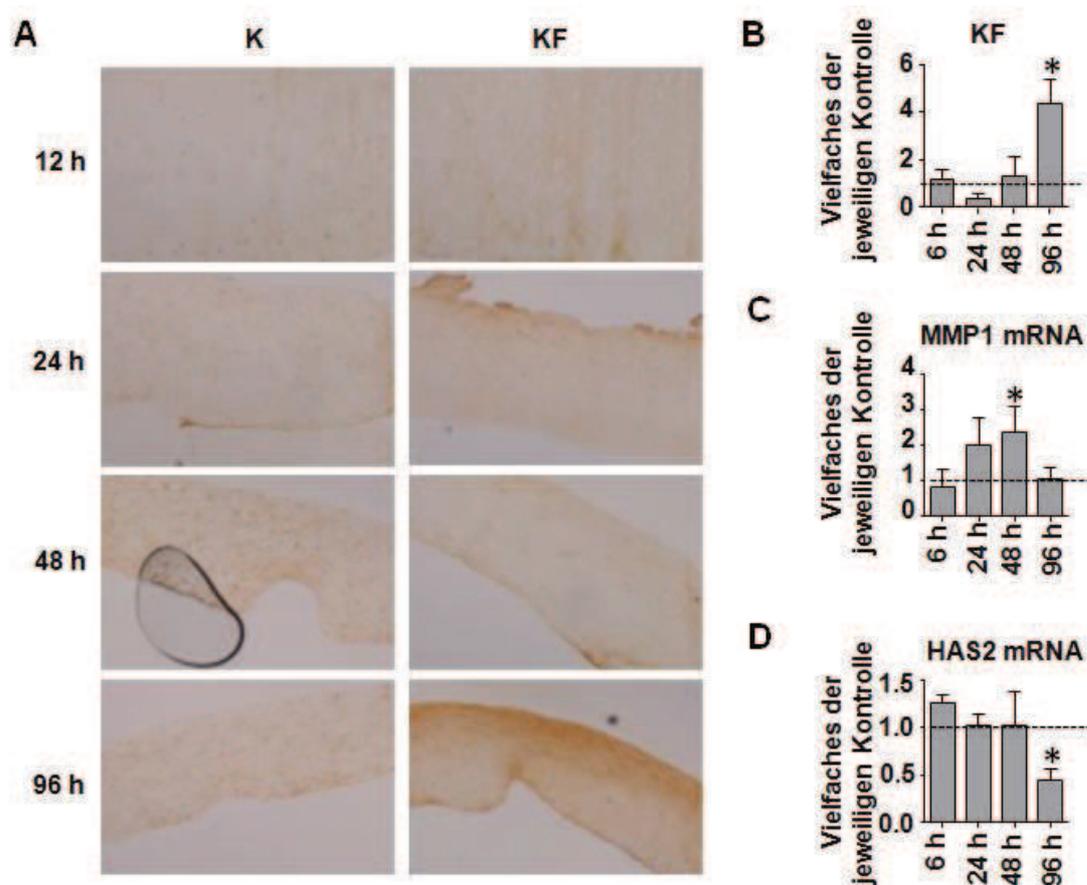


Abbildung 21 UVB-induzierte KF hemmen die HAS2-Expression in dermalen Äquivalenten. Aus Kollagen Typ1 wurden in Anwesenheit von dermalen Fibroblasten dermale Äquivalente synthetisiert. **(A,B)** Immunohistochemische Färbung von Kollagen 2 $\frac{3}{4}$ C_{short}. Zeitverlauf der Anreicherung von Kollagen-Neoepitop nach UVB-Bestrahlung (10 mJ/cm²). **(C)** Mittels qRT-PCR bestimmte MMP1-mRNA-Expression. **(D)** HAS2-mRNA-Expression. n=3, Mittelwert \pm SEM; *, p<0,05.

Um den Einfluss der KF auf die HAS2-mRNA-Expression weiter zu validieren, wurden 3D-Kulturen von dermalen Fibroblasten mit einem MMP-Inhibitor behandelt und mit UVB-Licht bestrahlt. Die UVB-vermittelte Reduktion der HAS2 konnte durch die Behandlung mit dem MMP-Inhibitor unterbunden werden (Abbildung 22).

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die entstandenen KF auch im 3D-Modell über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine zelluläre Signale vermitteln. Hierzu wurden die Gele mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-blockierenden Antikörper LM609 vorbehandelt und anschließend mit UVB-Licht bestrahlt. Wie in Abbildung 22 gezeigt, konnte hierdurch in der Tat die Herabregulation der HAS2 verhindert werden.

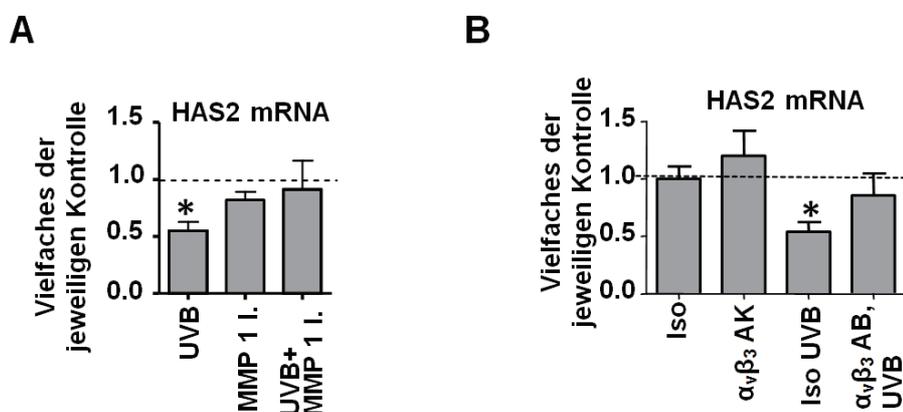


Abbildung 22 Einfluss von MMP-Inhibition und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Blockade auf UVB-vermittelte HAS2-mRNA-Reduktion in der 3D-Kultur. **(A)** 3D-Kulturen von Fibroblasten in Kollagengelen wurden in der An- und Abwesenheit von MMP-Inhibitor (MMP 1 I., 300 nmol/l) mit UVB-Licht bestrahlt (100mJ/cm²). Nach 24 h wurde die HAS2-mRNA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt. **(B)** HAS2-mRNA-Expression 24 h nach UVB-Bestrahlung und gleichzeitiger Inkubation mit $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-blockierendem Antikörper ($\alpha_v\beta_3$ AK, 5µg/ml) oder Isotyp-IgG-Kontrolle (Iso, 5µg/ml). n=3, Mittelwert ± SEM; *, p<0,05.

7.1.8 DIFFERENTIELLE REGULATION DER HAS1-GENEXPRESSION

Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, erfolgte die Hochregulation des HAS1-mRNA-Gehalts durch KF infolge einer $\alpha_v\beta_3$ -Integrin Aktivierung. Um die verantwortlichen nachgeschalteten Signaltransduktionswege zu identifizieren, wurden unterschiedliche Inhibitoren verwendet (Daten nicht gezeigt). Wohingegen die Inhibition von ERK1/2 und der Jun-N-terminal Kinase keinen Effekt zeigte, konnte durch Inhibition von p38 mittels SB 203580 der durch KF hervorgerufene Effekt auf die HAS1-mRNA-Expression aufgehoben werden (Abbildung 23).

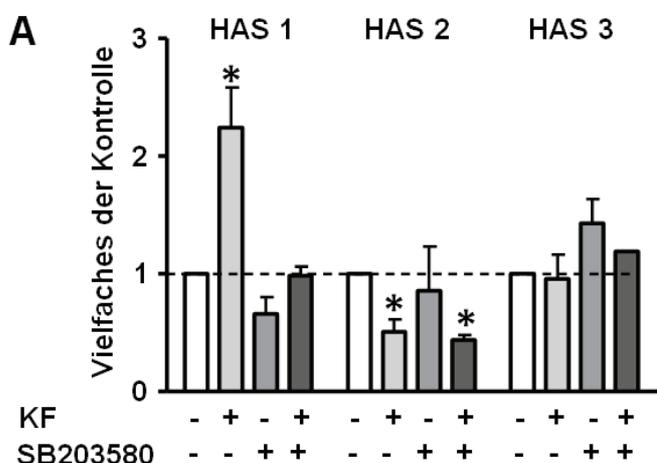


Abbildung 23 p38-Inhibition hebt die KF-Induktion der HAS1-mRNA auf.

(A) HAS-Isozym-mRNA-Expression in Antwort auf die Stimulation mit KF in An- und Abwesenheit von p38-Inhibitor SB203580. n=3-5, Mittelwert ± SEM; *, p<0,05.

Im Anschluss sollte untersucht werden, ob die HAS1-Hochregulation mit einer erhöhten p38-Phosphorylierung in zeitlichem Zusammenhang steht. Hierzu wurde eine Zeitspanne von 10 min bis zu 24 h nach beginnender KF-Stimulation untersucht. In der Tat konnte gezeigt werden, dass sowohl HAS1 als auch die p38-Phosphorylierung zeitlich korrelierend nach 24 h signifikant erhöht vorlagen (Abbildung 24).

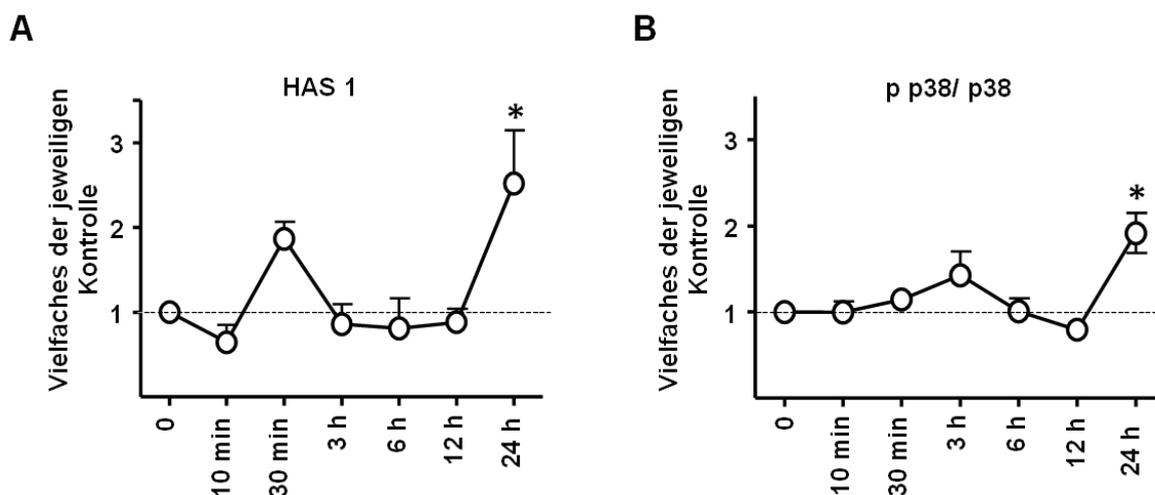


Abbildung 24 Zeitliche Korrelation der HAS1-mRNA-Erhöhung und p38-Phosphorylierung. (A) Zeitverlauf des mittels qRT-PCR detektierten HAS1-mRNA-Gehalts nach KF-Stimulation. (B) Zeitverlauf des durch Western Blot ermittelten Verhältnisses phospho-p38/p38 nach KF-Behandlung. n=3-5, Mittelwert \pm SEM; *, p<0,05.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass es sich bei der Phosphorylierung von p38 um einen nachgeschalteten Effekt der $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-Aktivierung handelte, wurden dermale Fibroblasten parallel zur Stimulation mit KF mit dem $\alpha_v\beta_3$ -Integrin blockierenden Antikörper LM609 inkubiert. Es zeigte sich, dass der KF-induzierte Effekt auf die HAS1-mRNA-Expression aufgehoben werden konnte (Abbildung 25).

A

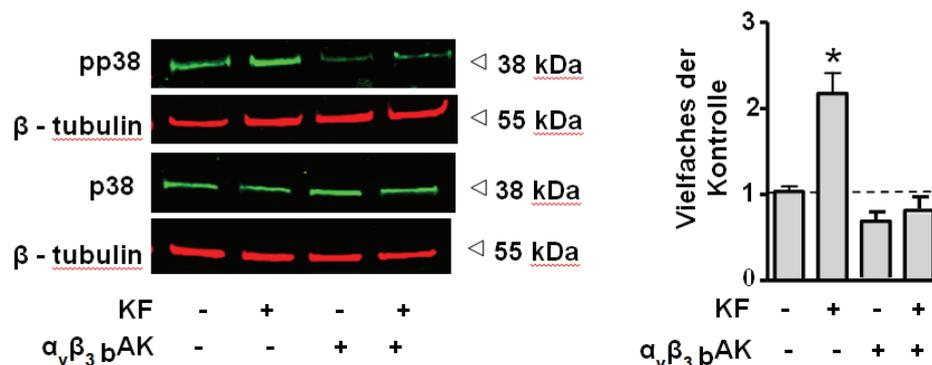


Abbildung 25 KF-vermittelte Induktion der p38-Phosphorylierung ist $\alpha_v\beta_3$ -Integrin abhängig. (A) Western Blot und quantitative Auswertung von pp38 und p38 nach KF-Stimulation in An- und Abwesenheit von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-blockierenden Antikörpern ($\alpha_v\beta_3$ bAK, 5 μ g/ml). n=3-5, Mittelwert \pm SEM; *, p<0,05.

Zusammenfassend ist HAS2, basierend auf den erhaltenen qRT-PCR Daten das am häufigsten exprimierte Isoenzym, womit die Vermutung nahe liegt, dass die Reduktion der HAS2-mRNA Expression für die Reduktion des HA-Gehalts im Überstand nach KF-Behandlung verantwortlich ist. KF ist somit den negativen Modulatoren der HA Matrix zuzuordnen. Die Herabregulation der HAS2 durch KF, welche durch UVB induzierte MMP-Aktivierung entstehen, aktivieren $\alpha_v\beta_3$ -Integrine, was zu einer Inhibition der ROCK führt und im Anschluss zu einer verminderten Translokation von pERK1/2 in den Zellkern. Die verminderte Konzentration von pERK1/2 führt hiernach zu einer reduzierten HAS2-Transkription und einer Reduktion der extrazellulären und perizellulären HA-Matrix.

7.2 POSITIVE MODULATION DER HA-MATRIX: ESTRADIOL

7.2.1 E_2 VERHINDERT DEN UVB-BEDINGTEN VERLUST VON HA IN DER DERMIS

Zur Untersuchung des Einflusses von endogenen Sexualhormonen auf den HA-Gehalt in der Dermis während der Hautalterung, wurde bei weiblichen unbehaarten skh-1-Mäusen durch Ovariectomie (OVX, X) die *de novo* Synthese von endogenen Sexualhormonen unterbunden (Abbildung 26). Um den alleinigen Effekt von Estradiol (E_2) im Folgenden untersuchen zu können, wurde die ovariectomierte Gruppe weiter unterteilt. Hierbei wurde einer Gruppe ein subkutanes Placebo-Pellet (P) ohne Wirkstoffgehalt implantiert, während die zweite Gruppe ein Estradiol-Depot-Pellet erhielt, welches kontinuierlich $1,1 \mu\text{g } E_2/\text{Tag}/\text{Maus}$ freisetzte. Als Kontrolle dienten *sham*-operierte Tiere (S), denen zuvor ein Placebo-Pellet implantiert worden war. Hierdurch wurde ausgeschlossen, dass im Vergleich zur E_2 Behandlung der operative Eingriff oder die Pelletimplantation die Ergebnisse verfälschte.

Die Untersuchung der drei nicht mit UVB-Licht bestrahlten Gruppen erlaubte die Evaluation des Effektes von E_2 auf die intrinsisch gealterte HA-Matrix im Alter von 18 Wochen. OVX verursachte tendenziell eine Reduktion des HA-Gehaltes der papillären Dermis, wie durch Darstellung der HA per Affinitätschromatographie gezeigt werden konnte. Dieser Effekt konnte durch E_2 -Substitution aufgehoben bzw. überkompensiert werden. Die signifikante Akkumulation von HA nach E_2 -Behandlung gegenüber der Kontrolle und OVX lässt einen stimulierenden Effekt von E_2 auf die dermale HA vermuten (Abbildung 26).

Um die Rolle von E_2 während der aktinischen Hautalterung zu untersuchen, wurden die beschriebenen Gruppen zusätzlich über einen Zeitraum von 10 Wochen mit UVB-Licht ($3 \times 1 \text{ MED}$ ($80\text{mJ}/\text{cm}^2$) wöchentlich) bestrahlt. Eine deutliche Reduktion des HA-Gehaltes in der papillären Dermis konnte in Folge der UVB-Bestrahlung (S,P UVB) detektiert werden. Eine weitere Minderung des HA-Gehaltes wurde in der Gruppe der ovariectomierten Tiere (X,P UVB) beobachtet. Wie zuvor bei den unbestrahlten Tieren beobachtet werden konnte, wurde auch bei den bestrahlten Mäusen durch die Behandlung mit E_2 die Reduktion des HA-Gehaltes durch OVX aufgehoben. Trotz zusätzlicher Belastung durch UVB-Strahlung ergab die Auswertung der affinitätshistochemischen Färbung einen ähnlichen Gehalt an HA, wie bei den unbestrahlten E_2 -substituierten Tieren detektiert werden konnte (Abbildung 26 A). Die Ergebnisse der Färbung wurden im Weiteren durch biochemische Bestimmung des HA-Gehalts der einzelnen Biopsien bestätigt (Abbildung 26 B).

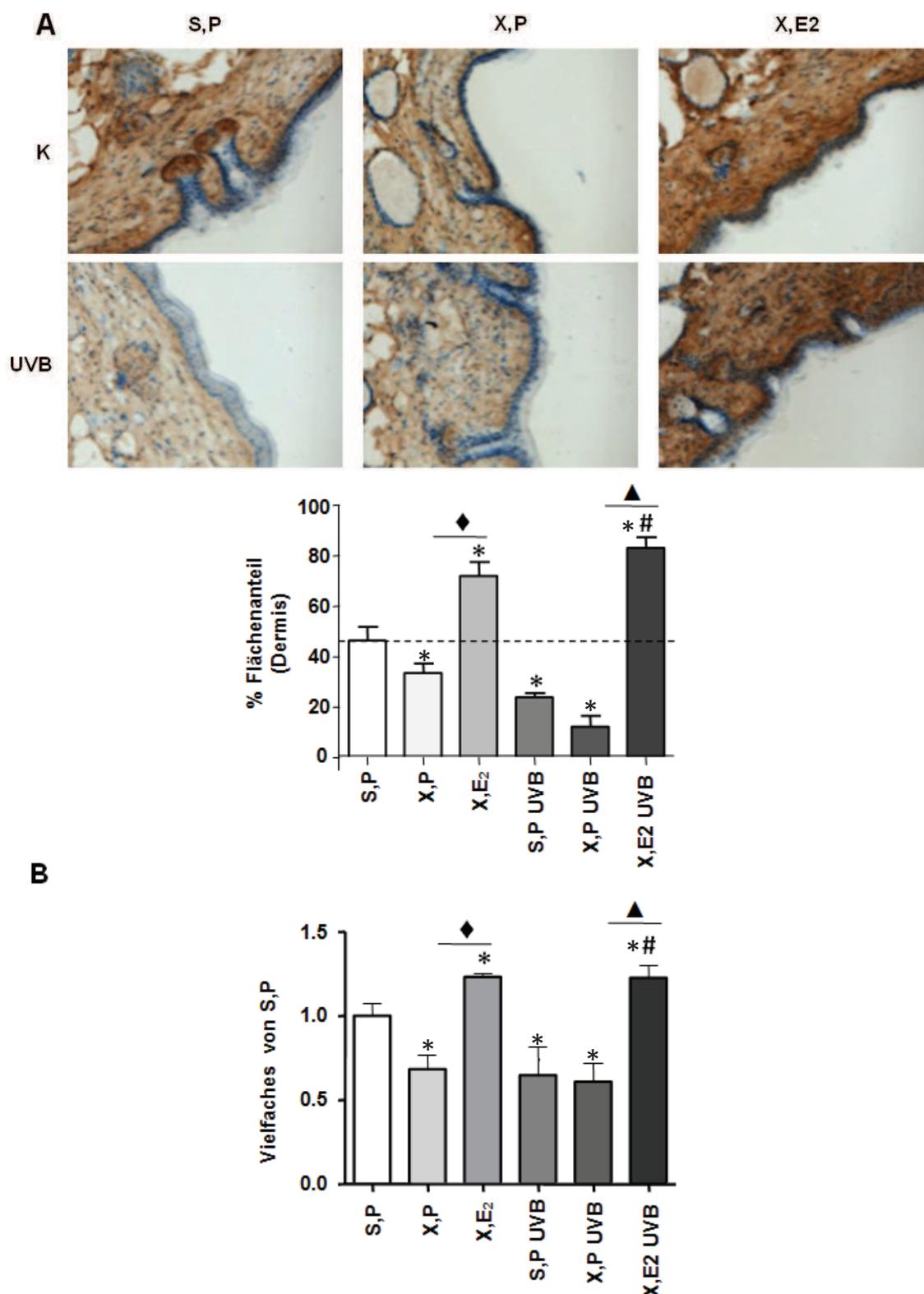
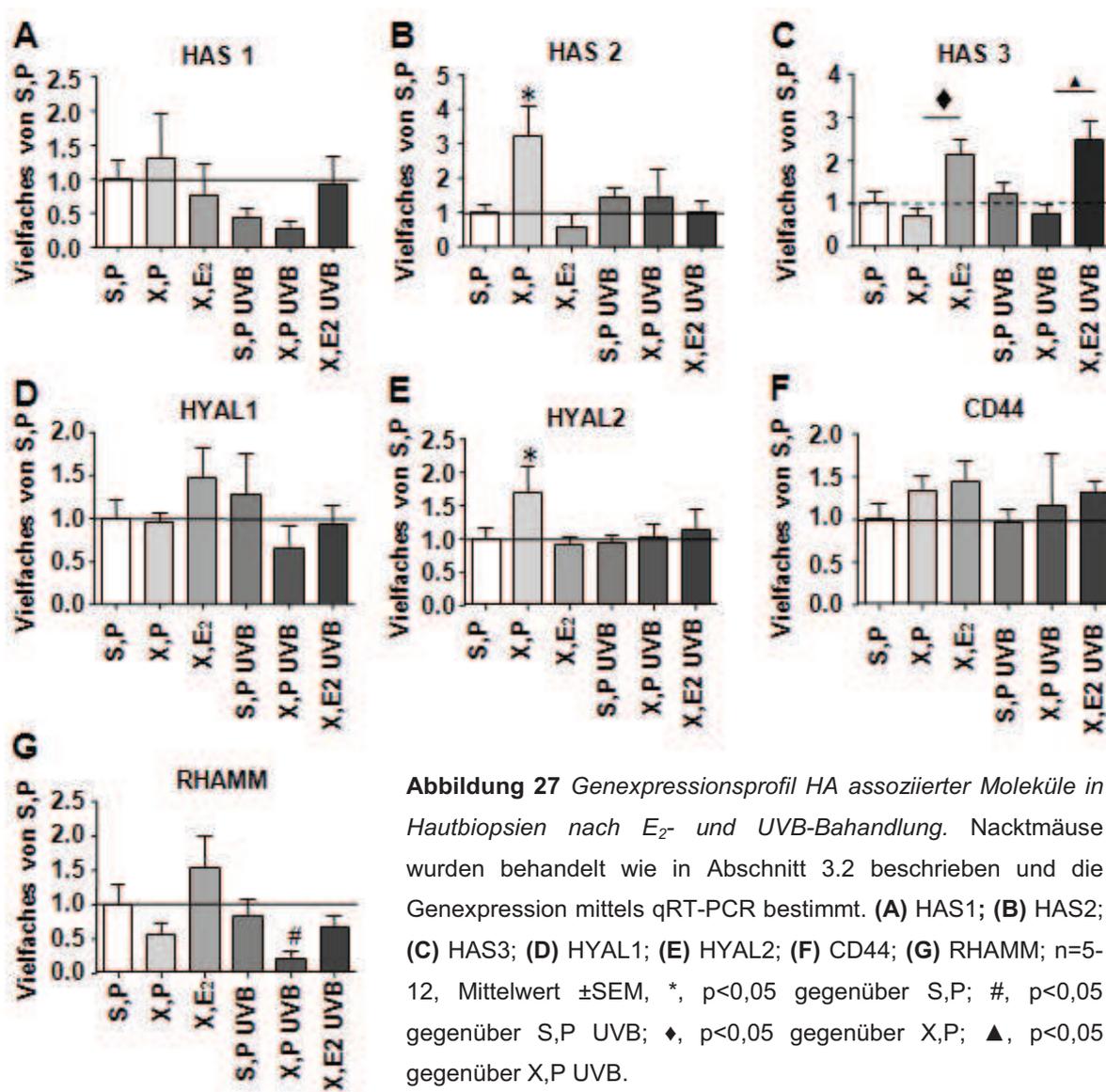


Abbildung 26 Erhöhung des HA-Gehaltes der papillären Dermis durch E₂ *in vivo*. Im Alter von 18 Wochen wurden Biopsien und der Gehalt an HA quantifiziert. **(A)** Affinitätshistochemie der Haut und quantitative Auswertung des HA-positiven Flächenanteils. 100x Vergrößerung **(B)** Bestimmung des HA-Gehalts aus Hautlysaten. n=7-8, Mittelwert ±SEM, *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦, p<0,05 gegenüber X,P; ▲, p<0,05 gegenüber X,P UVB.

7.2.2 mRNA-REGULATION VON HA-ASSOZIIERTEN MOLEKÜLEN

Im Folgenden sollte der Mechanismus, welcher der Erhöhung der HA durch E_2 in der papillären Dermis zugrunde liegt, genauer untersucht werden. Hierzu wurden mittels qRT-PCR die mRNA-Expressionsniveaus der einzelnen HAS-Isoenzyme sowie der Hyaluronidasen (HYAL) -1 und -2 detektiert. Beachtenswert war, dass die Expression der HAS3-mRNA in Antwort auf E_2 und E_2 -UVB genau dem gleichen Muster folgte wie der HA-Gehalt in der Haut. Im Gegensatz dazu wurden HAS1 und HAS2 deutlich geringfügiger reguliert und folgten dem Muster der HA-Stimulation durch E_2 nicht (Abbildung 27).



Des Weiteren wurde in nicht bestrahlter Haut von OVX-Mäusen eine erhöhte HYAL2-Expression gemessen, welche durch E_2 -Substitution aufgehoben wurde. HYAL2 könnte somit als zusätzlicher Faktor bei der Reduktion der HA durch OVX und dem Anstieg des HA-Gehalts durch E_2 beteiligt sein. Demgegenüber wurde HYAL1 nicht auf eine Art und Weise reguliert, die eine Beteiligung an den beobachteten Effekten wahrscheinlich erscheinen lässt.

Neben den auf HA-Matrix anabol und katabol wirkenden Enzyme wurden auch die HA-Rezeptoren CD44 und der *receptor for HA mediated motility* (RHAMM) mittels qRT-PCR untersucht. Die CD44-Expression wurde weder durch OVX/E₂ noch durch UVB-Bestrahlung der Haut beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde RHAMM tendenziell durch OVX herabreguliert. Die Reduktion der RHAMM-mRNA konnte durch E₂-Substitution aufgehoben werden. Dies weist darauf hin, dass die HA-Signaltransduktion über RHAMM E₂-abhängig sein könnte.

Als weiterer die HA-Matrix beeinflussender Faktor wurde die mRNA-Expression von Versican, einem HA-bindenden Proteoglykan, charakterisiert. Zunächst wurde die mRNA-Expression mit Hilfe eines Primers untersucht, der alle Spleiß-Varianten erfasste. Obwohl sich nach OVX keine Regulation des Versican-mRNA-Gehalts zeigte, konnte eine erhöhte Expression nach E₂/UVB-Behandlung detektiert werden. Wie einleitend bereits dargestellt, sind für Versican vier Spleiß-Varianten, Vo, V1, V2 und V3, beschrieben, denen jeweils unterschiedliche biologische Eigenschaften zugeschrieben werden [121]. Um mögliche Effekte von E₂ auf Versican detailliert zu evaluieren, wurden im Folgenden Primer verwendet, die spezifisch für die einzelnen Spleiß-Varianten sind. Auffällig war an dieser Stelle, dass vor allem die Spleiß-Variante V2 einer Induktion durch E₂ zu unterliegen scheint (Abbildung 28).

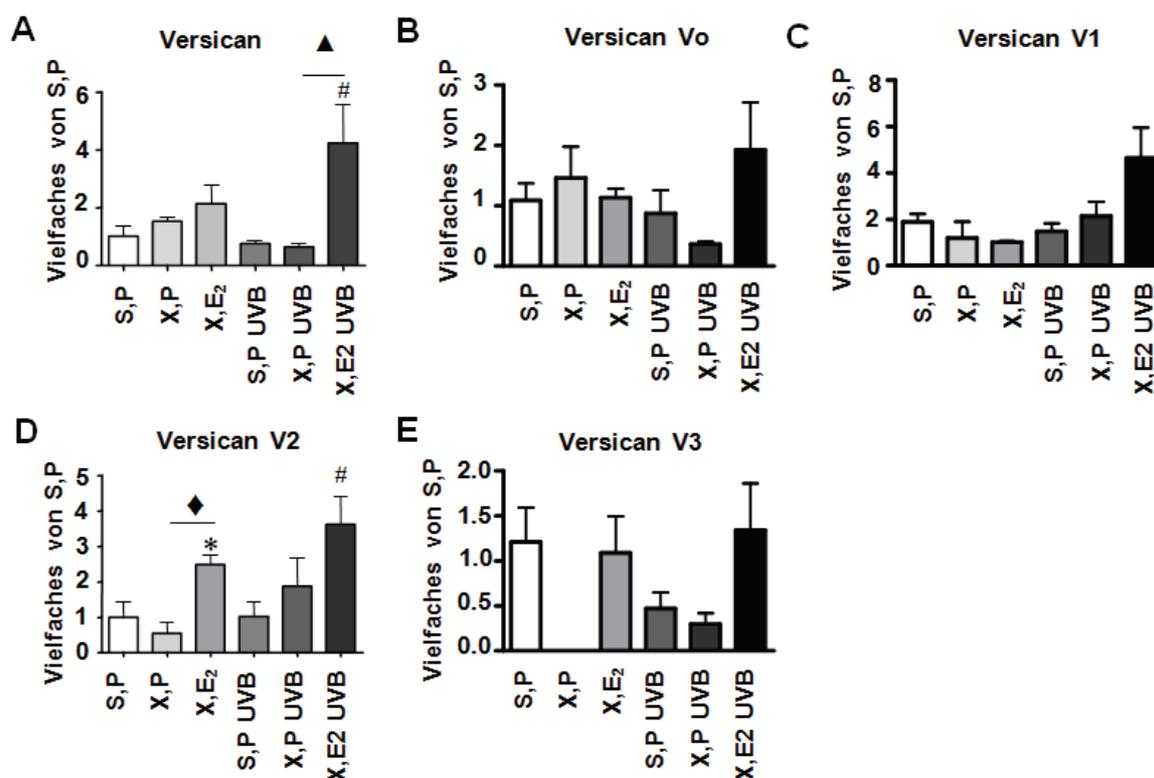


Abbildung 28 Genexpressionsprofil der Versican Spleiß-Varianten in Hautbiopsien nach E₂- und UVB-Behandlung. Nacktmäuse wurden behandelt wie in Abschnitt 3.2 beschrieben und die Genexpression mittels qRT-PCR bestimmt. (A) Versican; (B) Versican V0; (C) Versican V1; (D) Versican V2; (E) Versican V3; n=5-12, Mittelwert ± SEM, *, p<0,05 gegenüber S_{1,P}; #, p<0,05 gegenüber S_{1,P} UVB; ♦, p<0,05 gegenüber X_{1,P}; ▲, p<0,05 gegenüber X_{1,P} UVB.

Neben Quantifizierung der mRNA-Expression von HA-assoziierten Molekülen zeigte die Analyse der E_2 Rezeptoren, dass $E_2R\beta$ in der Haut von haarlosen *skh-1*-Mäusen nicht detektierbar war. Demgegenüber wurde der $E_2R\alpha$ -Rezeptor deutlich exprimiert, jedoch offensichtlich nicht von den experimentellen Gegebenheiten beeinflusst (Abbildung 29). Die Daten lassen somit darauf schließen, dass alle E_2 -medierten Effekte im vorliegenden Versuchsmodell $E_2R\alpha$ -vermittelt waren.

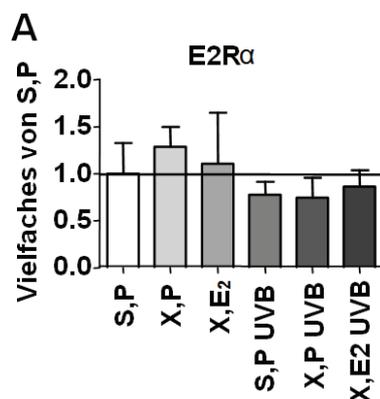


Abbildung 29 Genexpressionsprofil von $E_2R\alpha$ in Hautbiopsien nach E_2 - und UVB-Behandlung. Nackmäuse wurden behandelt wie in Abschnitt 3.2 beschrieben und die Genexpression von $E_2R\alpha$ mittels qRT-PCR bestimmt; $n=5-12$, Mittelwert \pm SEM.

7.2.3 E₂ FÜHRT ZU EINER INDUKTION VON HAS3 IN DER HAUT VON UVB-BESTRAHLTEN MÄUSEN

Zur Beantwortung der Frage, ob die HAS3-mRNA-Ergebnisse auch auf Proteinebene übertragbar waren, wurde HAS3 immunohistochemisch und per Western Blot untersucht (Abbildung 29). Die Ergebnisse bestätigten die mRNA-Daten und lassen darauf schließen, dass die HAS3-Expression sowohl in nicht bestrahlten als auch in bestrahlten Tieren durch E₂ erhöht wird.

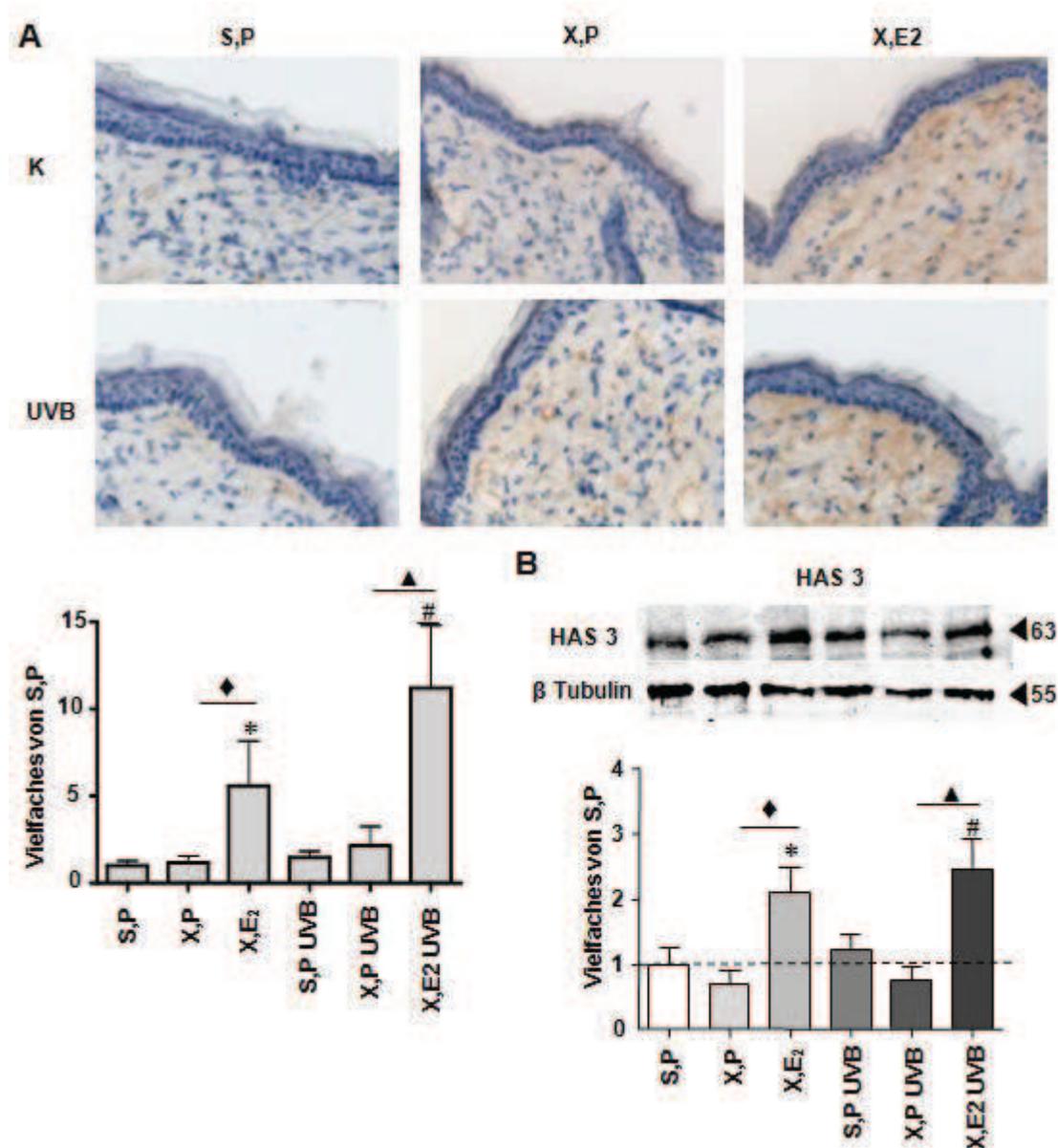


Abbildung 29 Induktion von HAS3 durch E₂ in vivo. Die HAS3-Expression wurde in Hautbiopsien von Haarlosen skh-1-Mäusen bestimmt, die wie in Abschnitt 3.2 beschrieben behandelt wurden. Im Alter von 18 Wochen wurde der Gehalt an HAS3 analysiert. **(A)** HAS3 immunohistochemische-Färbung und quantitative Analyse der dermalen Kompartimente. 100 x Vergrößerung. **(B)** HAS3-Western-Blot (H64) aus komplettem Hautlysat. n=7-12, Mittelwert ±SEM; *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦, p<0,05 gegenüber X,P; ▲, p<0,05 gegenüber X,P UVB.

7.2.4 E₂ UND UVB FÜHREN ZU EINER INDUKTION VON VERSICAN IN DER PAPILLÄREN DERMIS

Vor dem Hintergrund der erhöhten mRNA-Expression von Gesamt-Versican und Versican-V2 durch E₂ und E₂/UVB sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch auf Protein-Ebene darstellen lässt. In Übereinstimmung mit den qRT-PCR-Daten, vor allem der Spleiß-Variante 2, zeigte auch die quantitative Analyse der immunohistochemischen Versican-Färbung keinen Effekt von OVX auf den Versican-Gehalt der Dermis. Im Gegensatz dazu führte die E₂-Substitution bei den bestrahlten als auch bei den nicht bestrahlten Mäusen zu einer starken Anreicherung von dermalelem Versican (Abbildung 30).

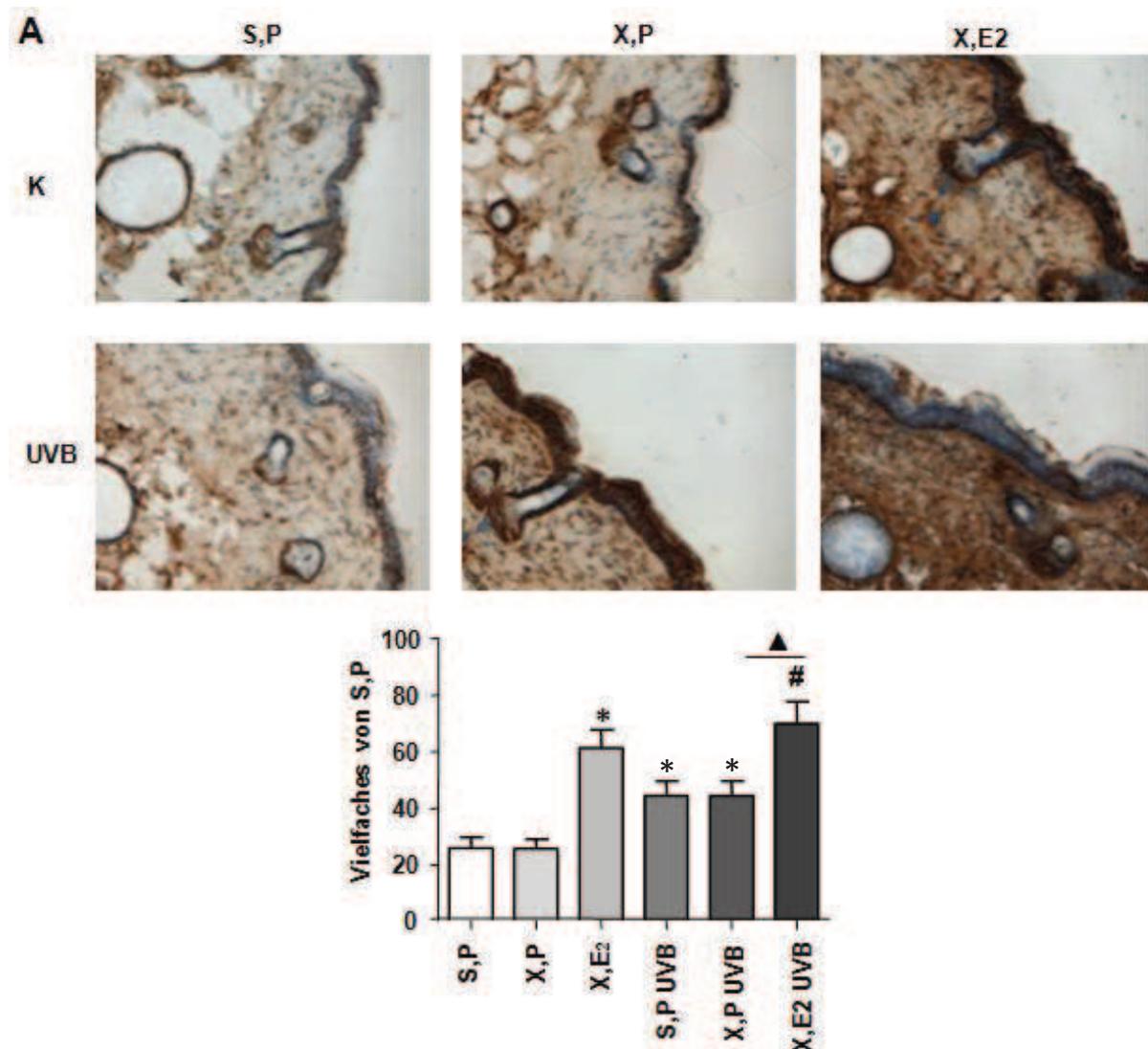


Abbildung 30 Induktion von Versican in Antwort auf UVB-Strahlung und E₂ *in vivo*. Die Versican-Expression wurde in Hautbiopsien, welche wie in Abschnitt 3.2 beschrieben behandelt wurden, bestimmt. Im Alter von 18 Wochen wurden Biopsien entnommen und auf den Gehalt von Versican analysiert. (A) Immunohistochemische Färbung von Versican und quantitative Bildauswertung mittels ImageJ®. 100x Vergrößerung, n=7-12, Mittelwert ± SEM; *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦, p<0,05 gegenüber X,P; ▲, p<0,05 gegenüber X,P UVB.

Zusätzlich erhöhte sich der Versican-Gehalt durch den Einfluss von UVB-Strahlung auch in den Sham,UVB- und OVX,UVB-behandelten Tieren. Wie in Abbildung 31 dargestellt, wurden diese Daten im Western Blot bestätigt. Auf der Höhe von etwa 200 kDa, der Größe von V2, stellte sich die Hauptbande dar.

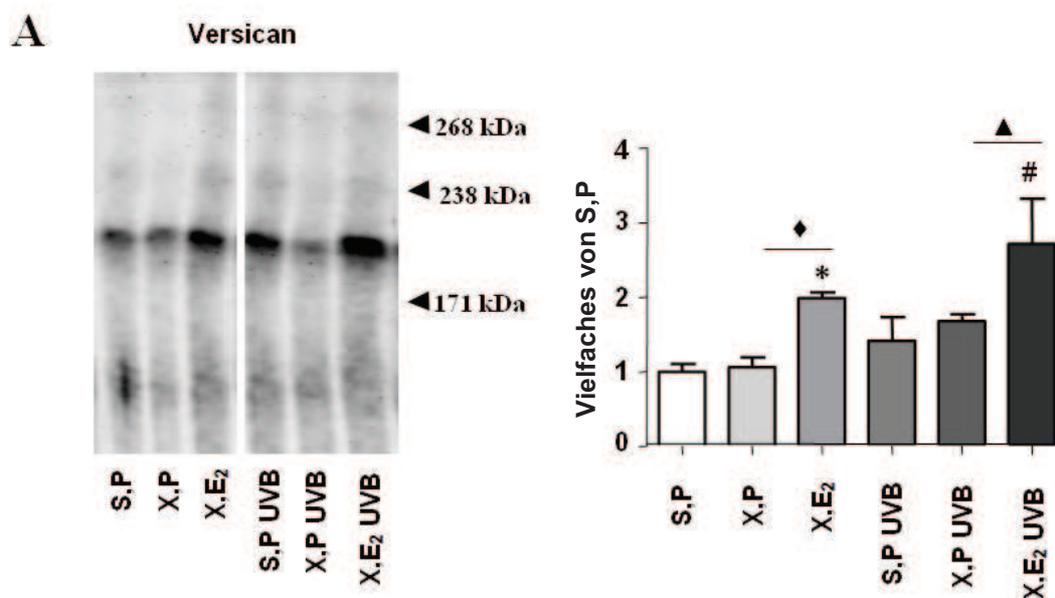


Abbildung 31 Hochregulation von Versican in Antwort auf UVB-Strahlung und E₂ in vivo. Die Versican-Expression wurde in Hautbiopsien, welche wie in Abschnitt 3.2 beschrieben behandelt wurden, bestimmt. Im Alter von 18 Wochen wurden Biopsien entnommen und auf den Gehalt von Versican analysiert. **(A)** Versican-Western Blot (LF99) aus Hautextrakten und quantitative Analyse der Hauptbande zwischen 238 und 171 kDa. n=7-12, Mittelwert ±SEM, *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦, p<0,05 gegenüber X,P; ▲, p<0,05 gegenüber X,P UVB.

7.2.5 E₂ HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE REGULATION VON HAS3 UND VERSICAN IN DERMALEN FIBROBLASTEN IN VITRO

Die dargestellten *in vivo*-Ergebnisse stellen die Rolle von endogenem und exogenem E₂ bei der Regulation der Zusammensetzung der dermalen Matrix deutlich dar. Im Speziellen wirkte E₂ dem Verlust der dermalen HA durch UVB-Strahlung entgegen und führte zu einem erhöhten Versican-Gehalt in aktinisch gealterter Haut. Auf der Suche nach zugrunde liegenden Regulationsmechanismen wurden zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen. Zum einen kam in Frage, dass E₂ auf direktem transkriptionellen Weg auf die HAS-Isoenzyme und Versican wirkt. Zum anderen wurde ein indirekter Effekt von E₂ auf die HAS-Isoenzyme und Versican-Expression über eine E₂-bedingte Freisetzung von Mediatoren, beispielsweise Zytokinen, erwogen.

Zur Überprüfung der an erster Stelle genannten Arbeitshypothese wurden dermale Fibroblasten *in vitro* mit E₂ und UVB-Licht behandelt. Die Analyse der mRNA-Expression mittels qRT-PCR und des Proteingehalts mittels Western Blot ergab keinen Einfluss von E₂ auf HAS3. Versican wurde auf mRNA-Ebene durch UVB-Strahlung supprimiert und erfuhr keine Veränderung durch Behandlung mit E₂ (Abbildung 32).

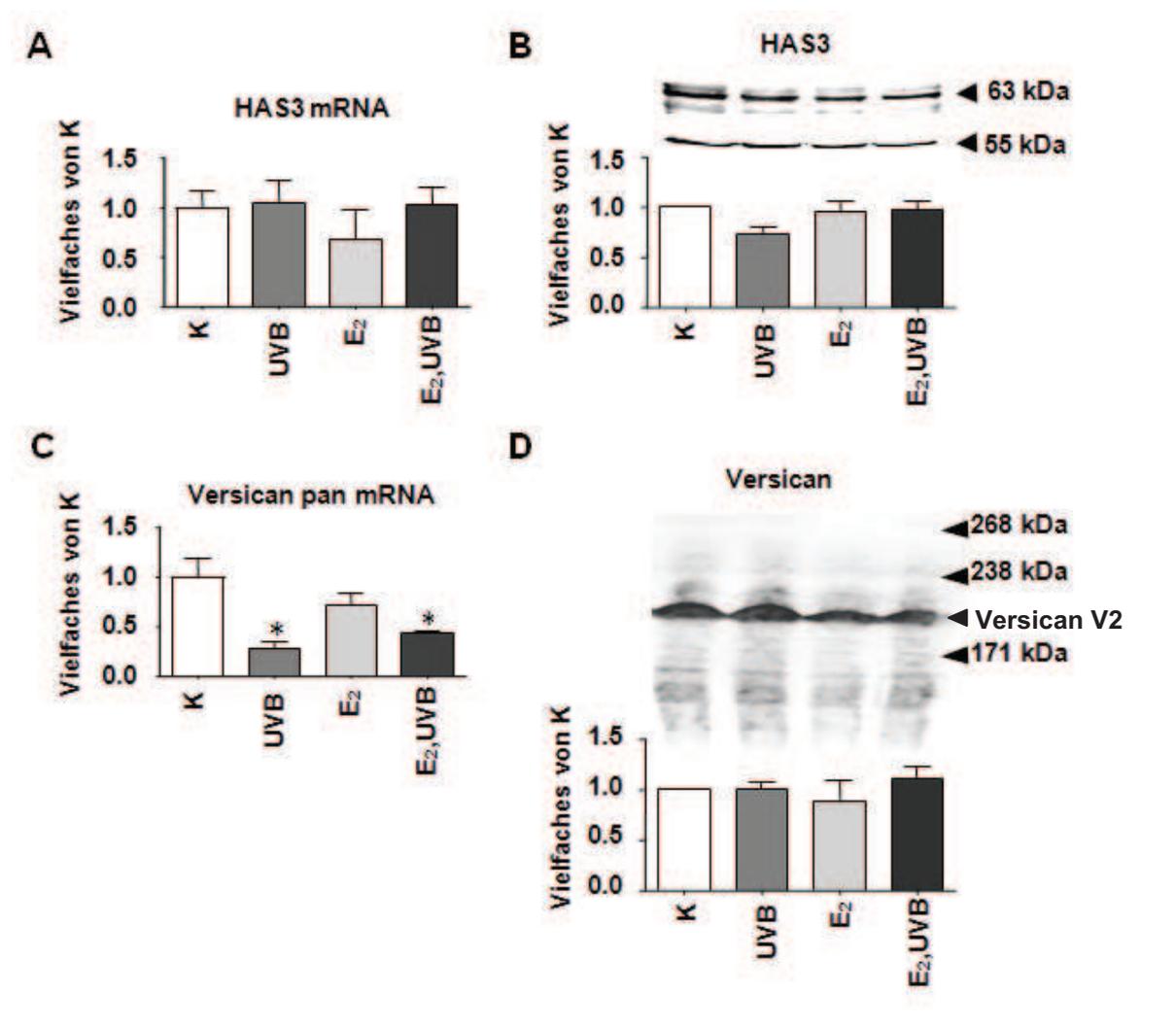
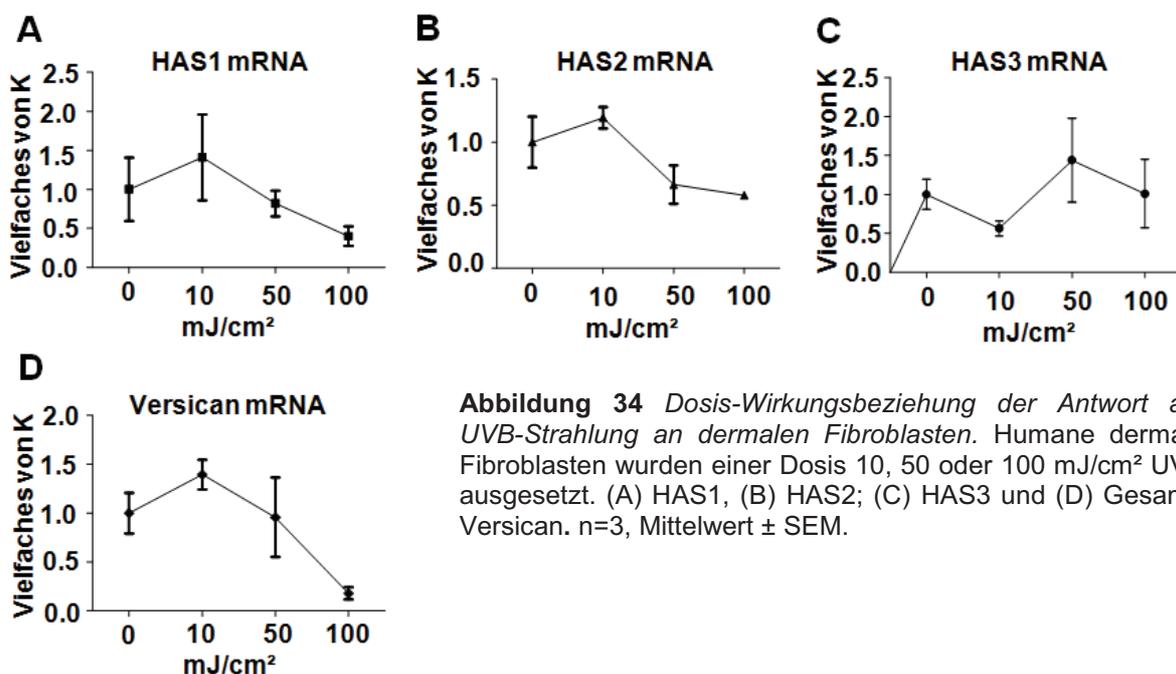
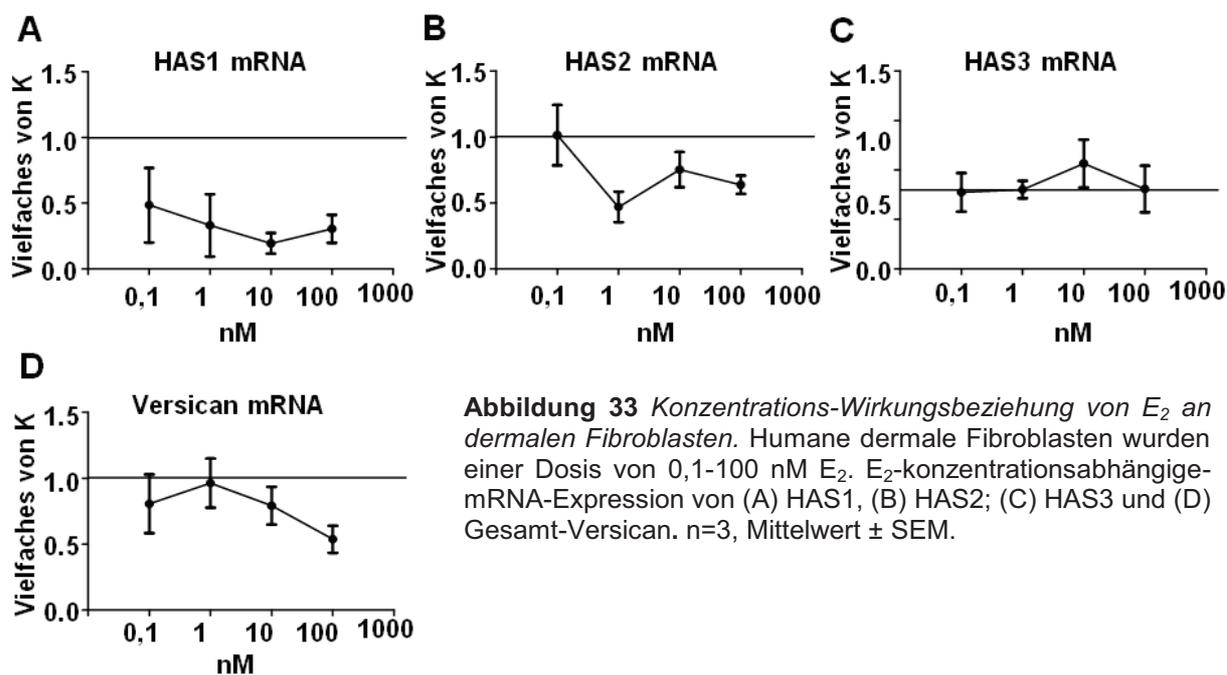


Abbildung 32 HAS3- und Versican-Expression in humanen dermalen Fibroblasten nach UVB- und E₂-Behandlung. Dermale Fibroblasten blieben entweder unbehandelt, erhielten eine Einzeldosis UVB (100 mJ/cm²), 100 nM E₂ oder beides und wurden nach 24 h analysiert. **(A)** HAS3-mRNA. **(B)** HAS3-Western Blot (Sigma®) und quantitative Analyse. **(C)** Gesamt-Versican-mRNA-Expression. **(D)** Gesamt-Versican-Western Blot (LF99) und quantitative Analyse. n=3-6, Mittelwert ± SEM, *, p<0,05 gegenüber der Kontrolle.

Um auszuschließen, dass es sich bei den erhaltenen Ergebnissen um einen dosisabhängigen Effekt handelte, wurden Dosis-Wirkungskurven von E_2 im Bereich von 0,1 bis 100 μM und für UVB-Bestrahlung im Bereich von 10-100 mJ angefertigt (Abbildung 33, 34). Die Experimente bestätigten, dass die direkte Stimulation von Fibroblasten mit E_2 und UVB zu keiner den *in vivo*-Daten entsprechenden Regulation von HAS3 und Versican führte. Es schien daher unwahrscheinlich zu sein, dass es sich bei dem den *in vivo*-Ergebnissen zugrundeliegenden Mechanismus um eine direkte Regulation der entsprechenden Gene durch E_2 bei Fibroblasten handelt.



7.2.6 DIE DURCH E_2 VERMITTELTE ERHÖHTE SEKRETION VON EGF IN KERATINOZYTEN FÜHRT ZUR PARAKRINEN REGULATION VON HAS3 UND VERSICAN IN FIBROBLASTEN

Als nächstes wurde untersucht, ob E_2 über einen indirekten Mechanismus zu einer Regulation der HAS3 und Versican in Fibroblasten führt. Für diesen Zweck wurden Hautbiopsien in Bezug auf Wachstumsfaktoren, welche bekanntermaßen an der Regulation der HA-Matrix beteiligt sind, per qRT-PCR analysiert (Abbildung 35). Bei der Auswertung der Daten wurde im speziellen nach Genregulationen gesucht, die durch OVX supprimiert und durch E_2 induziert wurden. Diese Kriterien sollten sowohl für die nicht bestrahlten als auch für die bestrahlten Biopsien erfüllt sein. Während für die TGF β -Isoformen keine entsprechende Regulation festgestellt werden konnte, wurde interessanterweise das Expressionsniveau von EGF durch OVX gesenkt und konnte durch E_2 -Substitution überkompensiert werden. Auch in UVB-bestrahlten Tieren entsprach das EGF-Expressionsniveau der einzelnen Gruppen dem Regulationsmuster von HA, HAS3 und Versican.

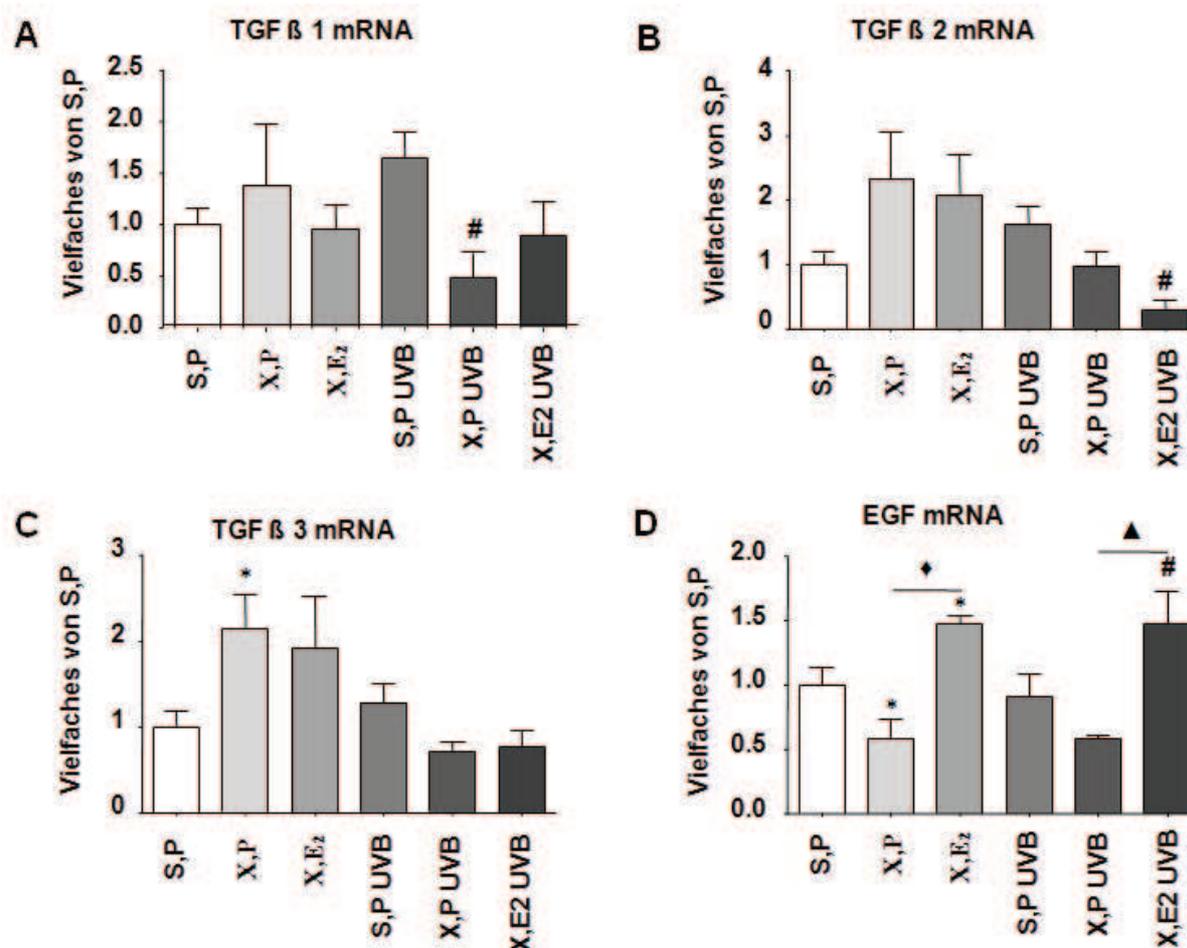


Abbildung 35 Wachstumsfaktor-Expression von murinen Hautbiopsien in Antwort auf UVB und E_2 . Die Mäuse wurden wie in Abschnitt 3.2 beschrieben behandelt. Hautbiopsien wurden im Alter von 18 Wochen entnommen und mittels qRT-PCR analysiert. mRNA-Expression von (A) TGF β -1, (B) TGF β -2, (C) TGF β -3, (D) EGF. n=5-12, Mittelwert \pm SEM, *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦, p<0,05 gegenüber X,P; ▲, p<0,05 gegenüber X,P UVB.

Zur weiteren Überprüfung dieser Ergebnisse wurde EGF in Kryoschnitten immunohistochemisch detektiert und qualitativ mit Hilfe des Programms ImageJ® ausgewertet (Abbildung 36 A). Zusätzlich wurde die EGF-Konzentration in Lysaten der Hautbiopsien durch ELISA bestimmt (Abbildung 36 B). Die Ergebnisse beider Messungen bestätigten, dass EGF durch E_2 vermehrt synthetisiert wird. In der immunohistochemischen Färbung konnte deutlich gezeigt werden, dass sich die Expression von EGF in der Haut hauptsächlich auf die Epidermis beschränkt. Es wurde daher vermutet, dass EGF parakrin auf Fibroblasten der Dermis wirkt.

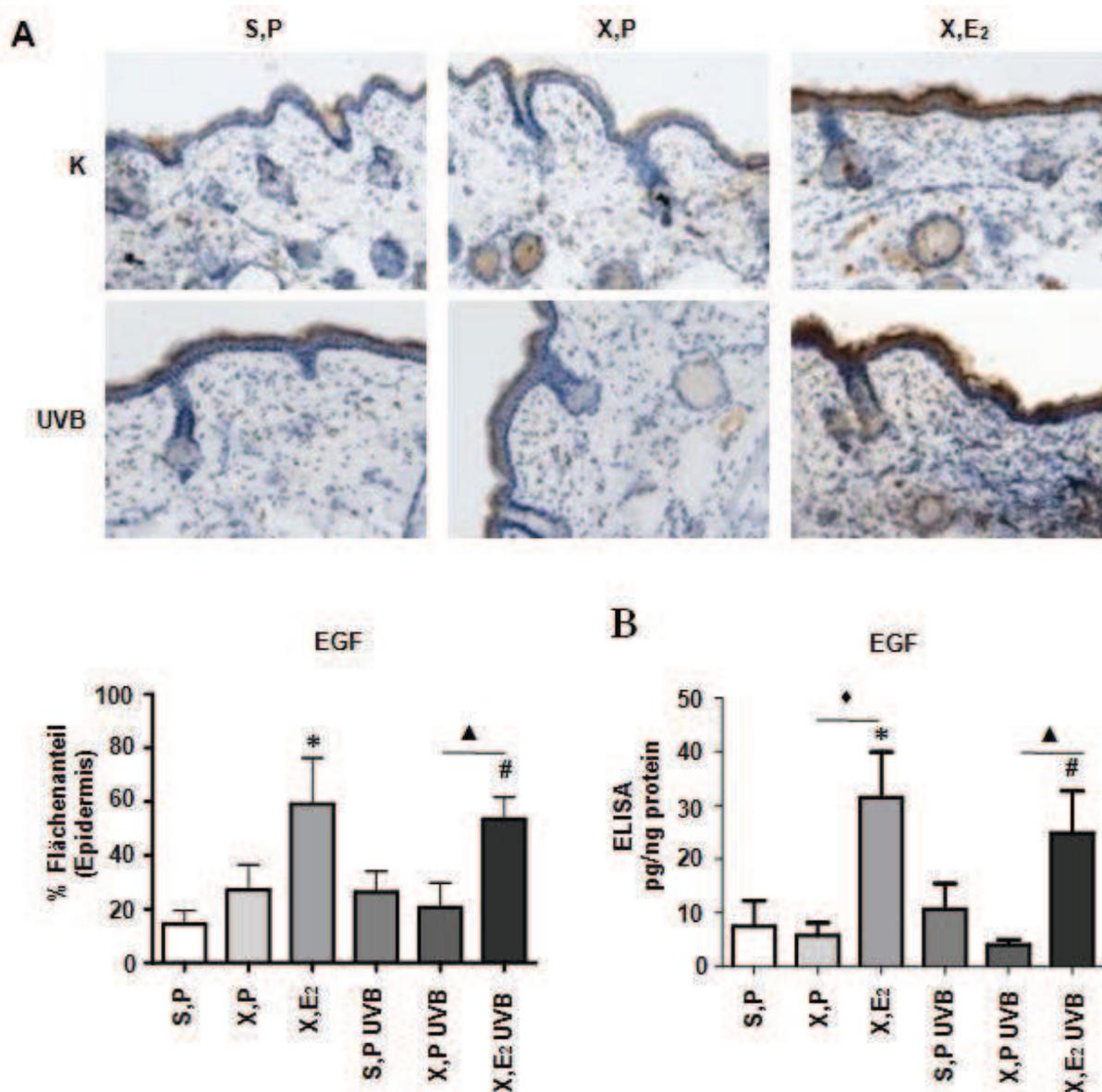


Abbildung 36 EGF-Expression dermaler Hautbiopsien in Antwort auf UVB und E_2 . Skh-1 Mäuse wurden wie in Abschnitt 3.2 beschrieben behandelt. Hautbiopsien wurden im Alter von 18 Wochen entnommen und auf die EGF-Expression untersucht. **(A)** Immunohistochemische Färbung von EGF und quantitative Auswertung der Epidermis. **(B)** EGF in Hautlysaten bestimmt mittels ELISA. $n=5-12$, Mittelwert \pm SEM, *, $p < 0,05$ gegenüber S,P; #, $p < 0,05$ gegenüber S,P UVB; ♦, $p < 0,05$ gegenüber X,P; ▲, $p < 0,05$ gegenüber X,P UVB.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden humane dermale Fibroblasten *in vitro* mit EGF stimuliert und die Regulation von HAS3 und Versican mittels qRT-PCR und Western Blot analysiert (Abbildung 37). EGF erhöhte die HAS3-mRNA-Expression, den HAS3-Proteingehalt und die HA-Synthese in Hautfibroblasten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass EGF sowohl die Gesamt-Versican- und V2-mRNA-Expression, als auch den Proteingehalt induzierte.

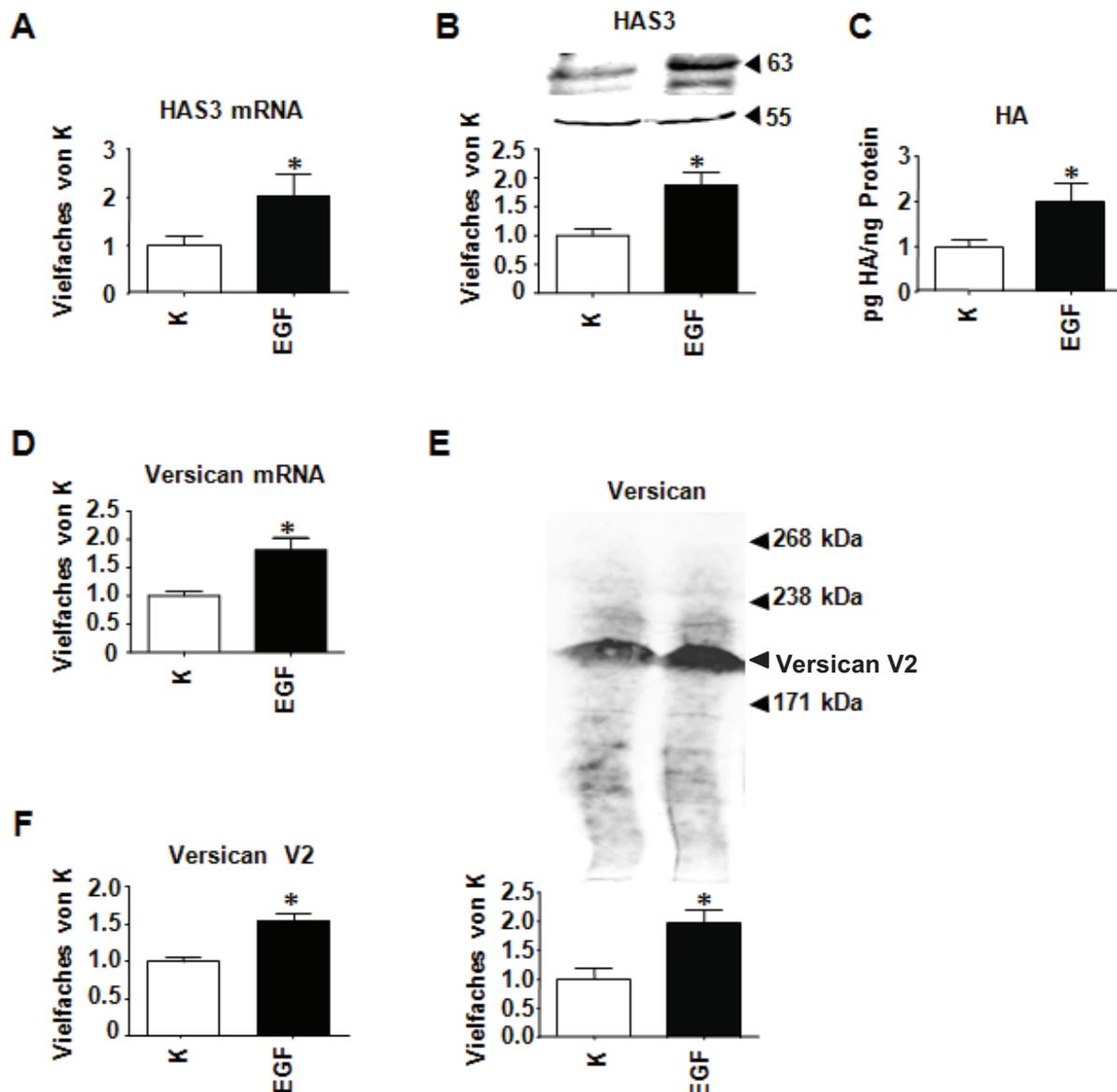


Abbildung 37 HAS3- und Versican-Expression dermaler Fibroblasten nach EGF-Stimulation. Humane dermale Fibroblasten wurden für 24 h mit EGF (10 ng/ml) stimuliert. **(A)** HAS3-mRNA-Expression. **(B)** HAS3-Western Blot (Sigma) und quantitative Analyse. **(C)** Ins Medium sekretierte HA nach 24-stündiger EGF-Stimulation. **(D)** Gesamt-Versican-mRNA-Expression. **(E)** Gesamt-Versican-Western Blot (LF99) und quantitative Analyse der Hauptbande (V2). **(F)** Versican-V2-mRNA-Expression. n=3-6, Mittelwert \pm SEM, *, $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Zusätzlich wurde untersucht, ob E_2 und UVB einen Einfluss auf die EGF-Genregulation und EGF-Sekretion in das Medium von Keratinozyten haben. Wie in Abbildung 38 dargestellt, erhöhte E_2 die EGF-mRNA-Expression und die EGF-Konzentration im Überstand, unabhängig von zusätzlicher UVB-Bestrahlung. Unter den gegebenen Bedingungen konnte in humanen Fibroblasten keine Induktion der EGF-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

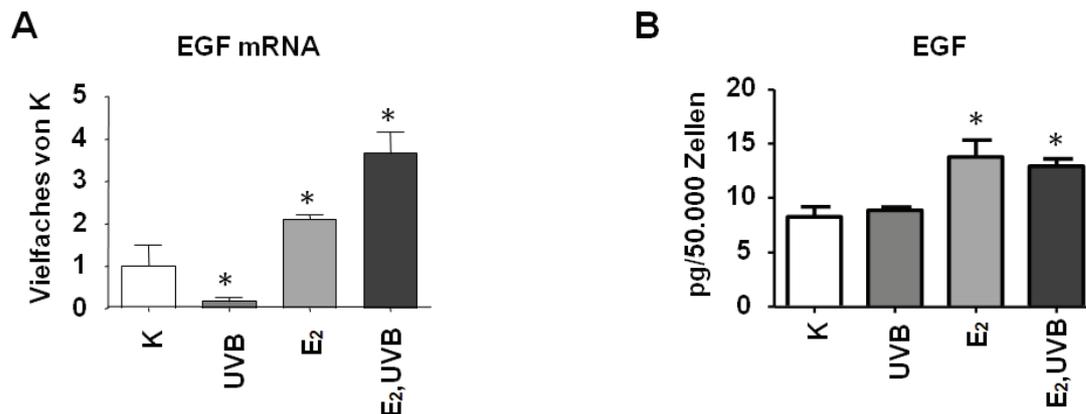


Abbildung 38 EGF-Freisetzung durch Keratinozyten nach UVB- und E_2 -Behandlung. Keratinozyten wurden mit 100 nM E_2 , UVB (100 mJ/cm²) oder beidem für 24 h stimuliert. **(A)** mRNA-Expression von EGF. **(B)** Die EGF-Konzentration wurde im Zellkulturüberstand von behandelten Keratinozyten mittels ELISA bestimmt. n=3-6, Mittelwert \pm SEM, *, p<0,05 gegenüber der Kontrolle.

Als nächstes wurde konditioniertes Medium von Keratinozyten, welche mit E_2 und UVB behandelt wurden (Abschnitt 3.1.1 und 3.1.5), verwendet, um dermale Fibroblasten zu stimulieren. Erneut wurde eine Erhöhung der HAS3 und Versican-V2-mRNA-Expression in den Fibroblasten detektiert. Diese Erhöhung ließ sich durch gleichzeitige Zugabe eines EGF-Rezeptorkinaseinhibitors, Erlotinib, genauso wie mit einem EGF-neutralisierenden Antikörper, aufheben (Abbildung 39). Wie bereits in der Einleitung beschrieben ist HA ein bekannter Aktivator der Proliferation in unterschiedlichen Zellarten [98]. Zudem ist bekannt, dass im Rahmen der Alterung die proliferative Kapazität von Zellen sinkt [3]. Folglich sollte analysiert werden, welche Auswirkung die indirekt vermittelte Veränderung der HA-Matrix durch E_2 auf den funktionellen Parameter, die Proliferation von dermalen Fibroblasten, hat.

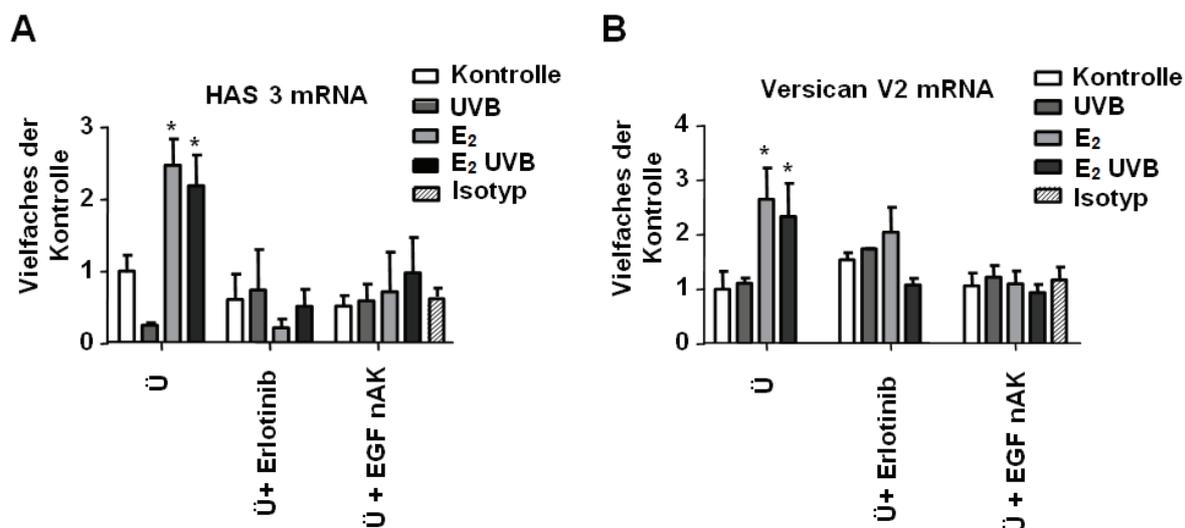


Abbildung 39 Einfluss von konditionierten Keratinozyten-Medien auf Fibroblasten. Keratinozyten wurden mit 100 nM E₂, UVB (100 mJ/cm²) oder beidem für 24 h stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden verwendet, um dermale Fibroblasten in der An- bzw. Abwesenheit von Erlotinib (3µM), EGF-neutralisierendem Antikörper (EGF nAK, 0,35 µg/ml) oder Isotyp-IgG-Kontrolle (0,35 µg/ml) zu stimulieren. **(A)** Die HAS3- und **(B)** Versican-V2-mRNA wurde bestimmt. n=3-6, Mittelwert ± SEM, *, p<0,05 gegenüber der Kontrolle.

Die Stimulation von Fibroblasten mit E₂-konditioniertem Keratinozyten-Medium führte zu einer erhöhten Proliferation der Fibroblasten (Abbildung 40). Erneut konnte dieser Effekt mit Erlotinib und dem neutralisierenden EGF-Antikörper aufgehoben werden.

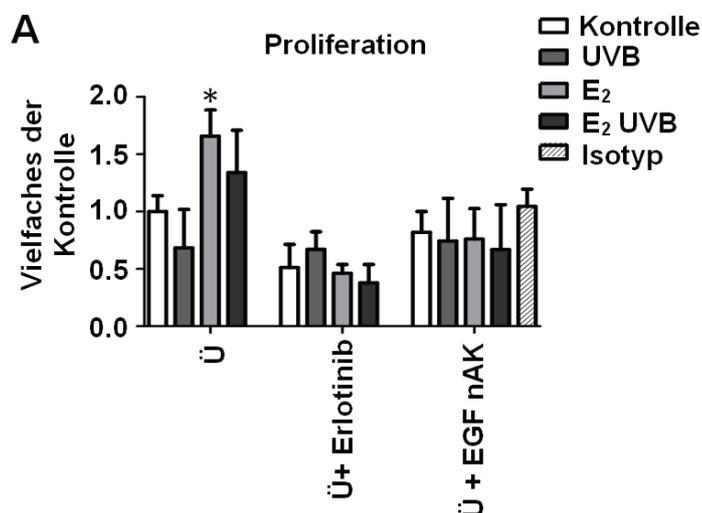


Abbildung 40 Einfluss von konditionierten Keratinozyten-Medien auf die Proliferationsrate von Fibroblasten. Keratinozyten wurden mit 100 nM E₂, UVB (100 mJ/cm²) oder beidem für 24 h stimuliert. **(A)** Die Zellkulturüberstände wurden verwendet, um die proliferative Antwort dermalen Fibroblasten in der An- bzw. Abwesenheit von Erlotinib (3µM), EGF-neutralisierendem Antikörper (EGF nAK, 0,35 µg/ml) oder Isotyp-IgG-Kontrolle (0,35 µg/ml) zu ermitteln. n=3-6, Mittelwert ± SEM, *, p<0,05 gegenüber der Kontrolle.

Ebenfalls unterbunden wurde der proliferative Effekt nach Stimulation mit konditioniertem Keratinozyten-Medium durch lentiviralen *knock down* von HAS3 in den Fibroblasten (Abbildung 41).

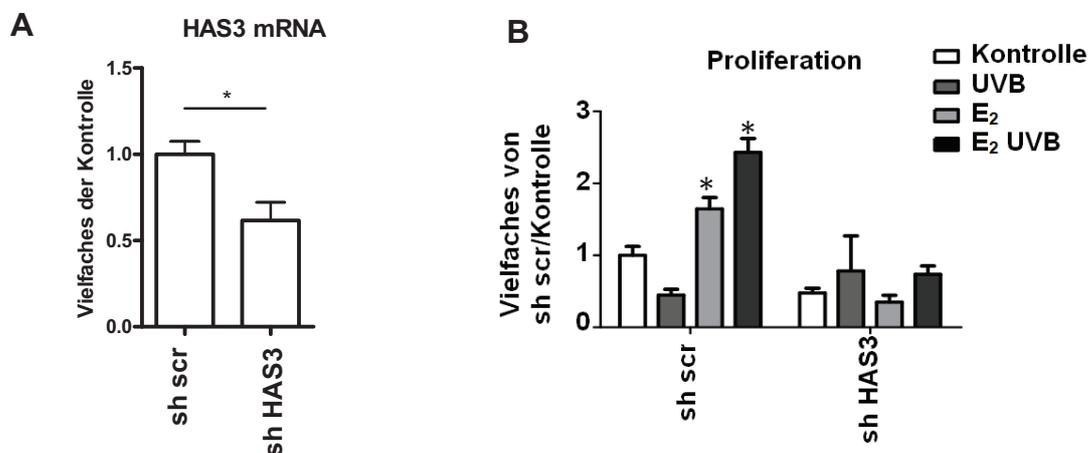


Abbildung 41 HAS3 Ausschaltung in Fibroblasten hemmt den proliferationssteigernden Effekt von konditionierten Keratinozyten-Medien. Keratinozyten wurden mit 100 nM E₂, UVB (100 mJ/cm²) oder beidem für 24 h stimuliert. **(A)** Dermale Fibroblasten wurden lentiviral mit sh *scrambled* (sh scr) und sh HAS3 Viren behandelt und der HAS3 mRNA-Gehalt mittels qRT-PCR analysiert. **(B)** Anschließend wurde mit konditionierten Keratinozyten-Medien stimuliert und die Proliferation analysiert. n=3-6, Mittelwert ± SEM, *, p<0,05 gegenüber der Kontrolle.

Übertragen auf die Situation *in vivo* kann folglich gemutmaßt werden, dass E₂ über eine erhöhte Sekretion von EGF durch Keratinozyten parakrin die Bildung von HA- und Versican-reicher EZM von Fibroblasten in der Dermis stimuliert. Dieser HAS3-abhängige Prozess könnte zu einer Erhöhung der proliferativen Kapazität von dermalen Fibroblasten führen.

7.2.7 DIFFERENZIELLE EFFEKTE VON E_2 AUF PROLIFERATION UND INFLAMMATION DER DERMIS *IN VIVO*

Zur Evaluation einer möglichen Verknüpfung zwischen HA, Versican und funktionellen Effekten während der Hautalterung *in vivo*, wurde die Proliferation dermalen Fibroblasten anhand der Proliferationsmarker Ki-67 durch immunohistochemische Färbung in den murinen Hautproben ermittelt (Abbildung 42).

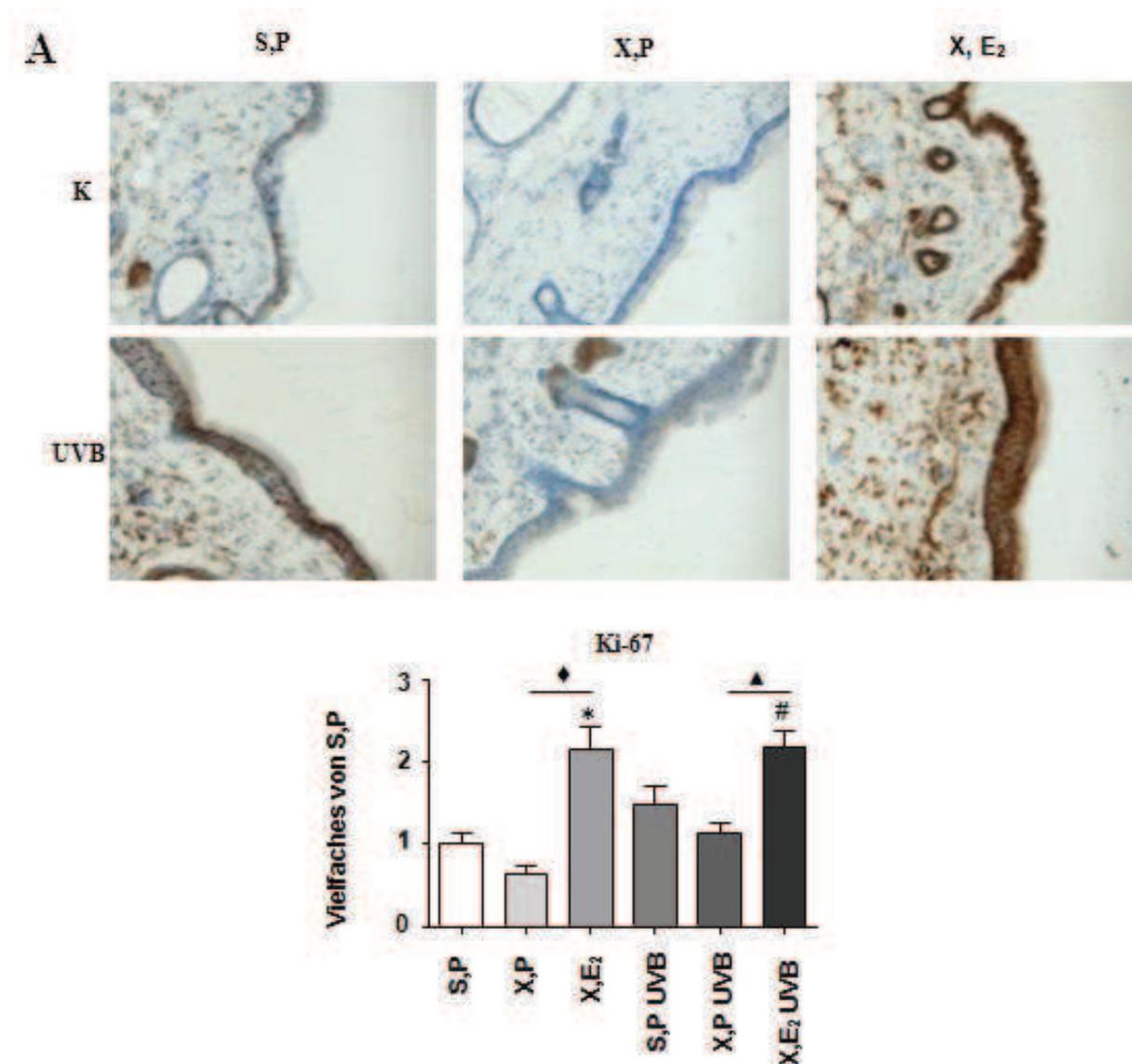


Abbildung 42 Proliferation der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E_2 . Immunohistochemie von Hautbiopsien murinen Ursprungs nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Behandlung der Mäuse. **(A)** Immunohistochemische Färbung von Ki67 und quantitative Analyse der papillären Dermis. $n=5-12$, Mittelwert \pm SEM, *, $p<0,05$ gegenüber S,P; #, $p<0,05$ gegenüber S,P UVB; ♦ $p<0,05$ gegenüber X,P, ▲ $p<0,05$ gegenüber X,P UVB.

Des Weiteren wurden die mRNA-Expressionen der Proliferationsmarker Ki-67 und TPX2 untersucht. Ki-67 ist ein nukleäres Protein, welches nur in der G₁-, S- und G₂-Phase der Mitose in den Zellen vorliegt [79]. TPX2 kann dagegen nur in den Mitosephasen S, G₂ und M detektiert werden [43]. Ki-67- und TPX2-Transkripte lagen nach E₂-Substitution in nicht bestrahlten und bestrahlten Biopsien erhöht vor (Abbildung 43). Unter Berücksichtigung der vorhergehenden Daten ist es daher denkbar, dass die Induktion von HA- und Versicanreicher EZM ursächlich für die proliferationssteigernden Wirkungen von E₂ sind.

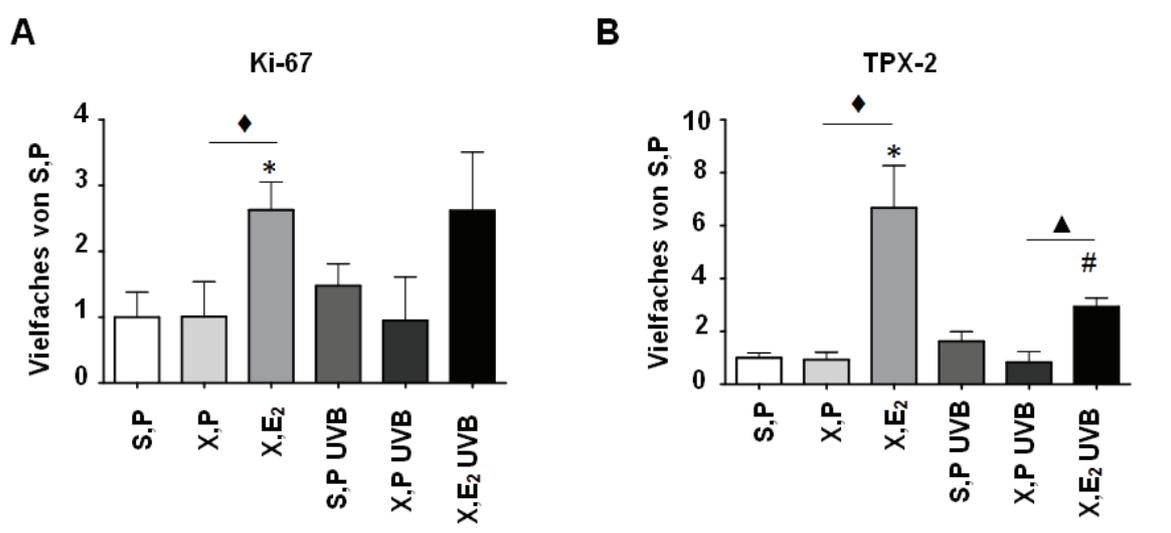


Abbildung 43 Ki-67 und TPX-2 mRNA Expression der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E₂. mRNA-Expression von Hautbiopsien murinen Ursprungs nach der in Schnitt 3.2 beschriebenen Behandlung von skh-1 Mäusen. **(A)** Ki67-mRNA-Expression. **(B)** TPX-2-mRNA-Expression. n=5-12, Mittelwert ± SEM, *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦ p<0,05 gegenüber X,P, ▲ p<0,05 gegenüber X,P UVB.

7.2.8 DIFFERENZIELLE EFFEKTE VON E_2 AUF PROLIFERATION UND INFLAMMATION DER DERMIS IN VIVO

Neben ihrer proliferationssteigernden Eigenschaft wird HA auch eine Rolle bei der Inflammation, entweder nach Generierung von HA-Fragmenten oder durch die Entstehung von supramolekularen Komplexen, an die sich Monozyten anheften können, zugeschrieben. Interessanterweise waren in der Dermis von OVX-Mäusen, welche die geringste Menge an HA und einen erhöhten Gehalt an Versican zeigten, die quantitative Auswertung der Mac2-immunohistochemischen Färbung, der mRNA-Gehalt und der Proteingehalt im Western Blot erhöht (Abbildung 44). Zusätzlich wurde die Mac2-Expression stark durch E_2 reduziert, was einen anti-inflammatorischen Effekt von E_2 während der Alterung vermuten lässt.

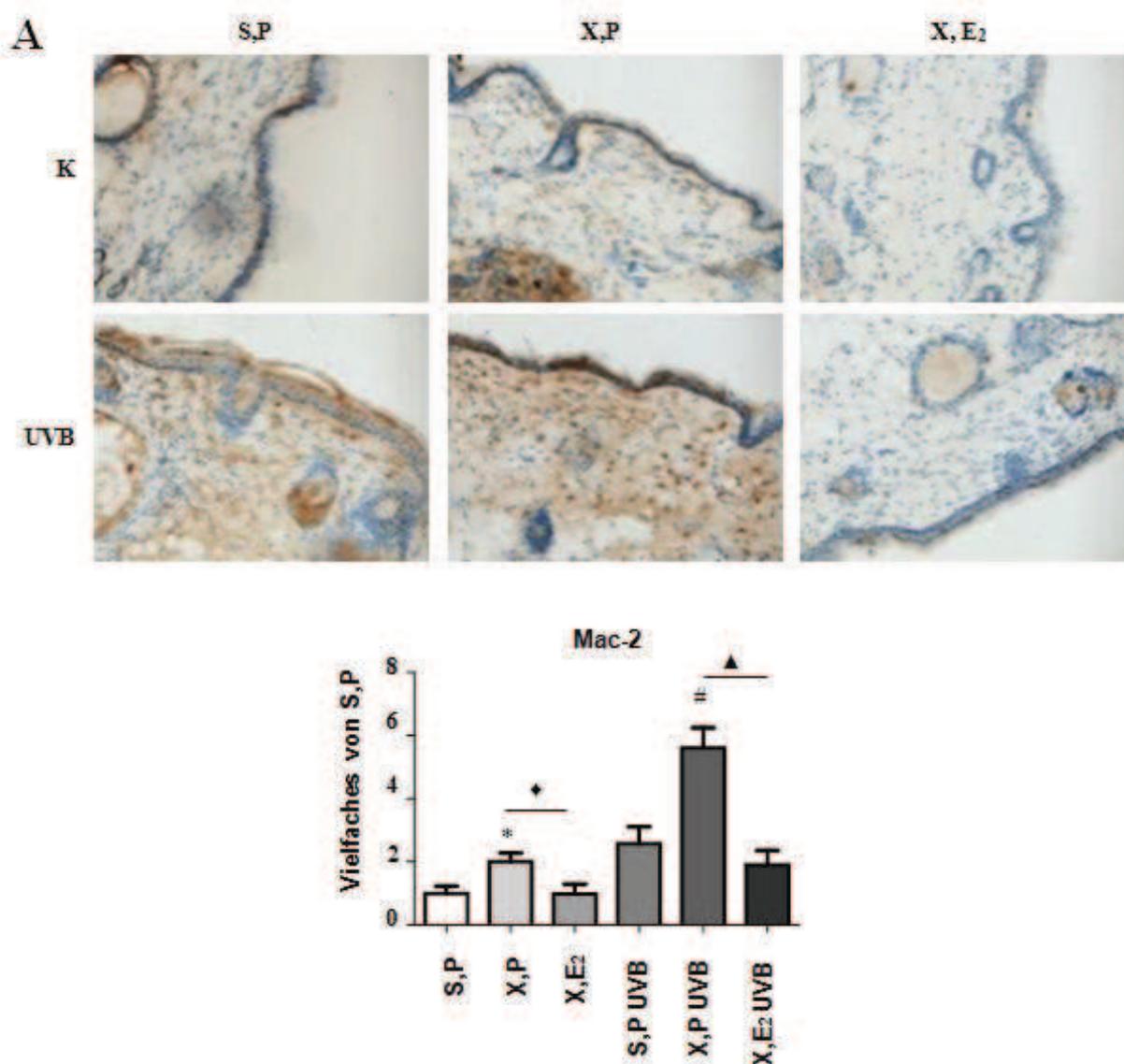


Abbildung 44 Mac-2 Expression in der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E_2 . Immunohistochemie und mRNA-Expression von Hautbiopsien murinen Ursprungs nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Behandlung. Immunohistochemische Färbung von Mac2 und quantitative Auswertung. n=5-12, Mittelwert \pm SEM, *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦ p<0,05 gegenüber X,P, ▲ p<0,05 gegenüber X,P UVB.

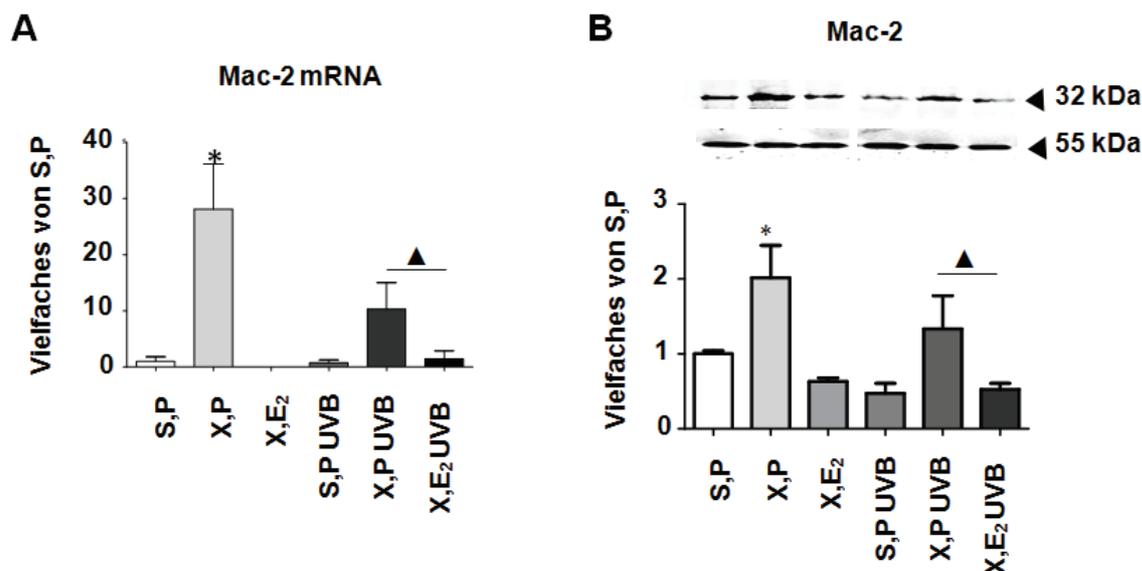


Abbildung 45 Mac-2 Expression in der Haut von *skh-1* Mäusen nach 10 wöchiger Behandlung mit UVB und E₂. Western Blot und mRNA-Expression von Hautbiopsien murinen Ursprungs nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Behandlung. **(A)** Mac2-mRNA-Expression. **(B)** Mac-2-Western Blot und quantitative Auswertung. n=5-12, Mittelwert ±SEM, *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦ p<0,05 gegenüber X,P, ▲ p<0,05 gegenüber X,P UVB.

Um diese Hypothese weiter zu stützen wurden die Expressionsprofile der unterschiedlichen Chemo- und Zytokine MCP-1, IL6 und TNFα analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass diese unter E₂-Substitution supprimiert waren (Abbildung 46).. Zuletzt wurde mRNA-Expression der induzierbaren Cyclooxygenase 2 (COX2) als ein Indikator für entzündliche Prozesse untersucht. Auch die COX2-Expression wurde durch E₂ deutlich reduziert (Abbildung 47).

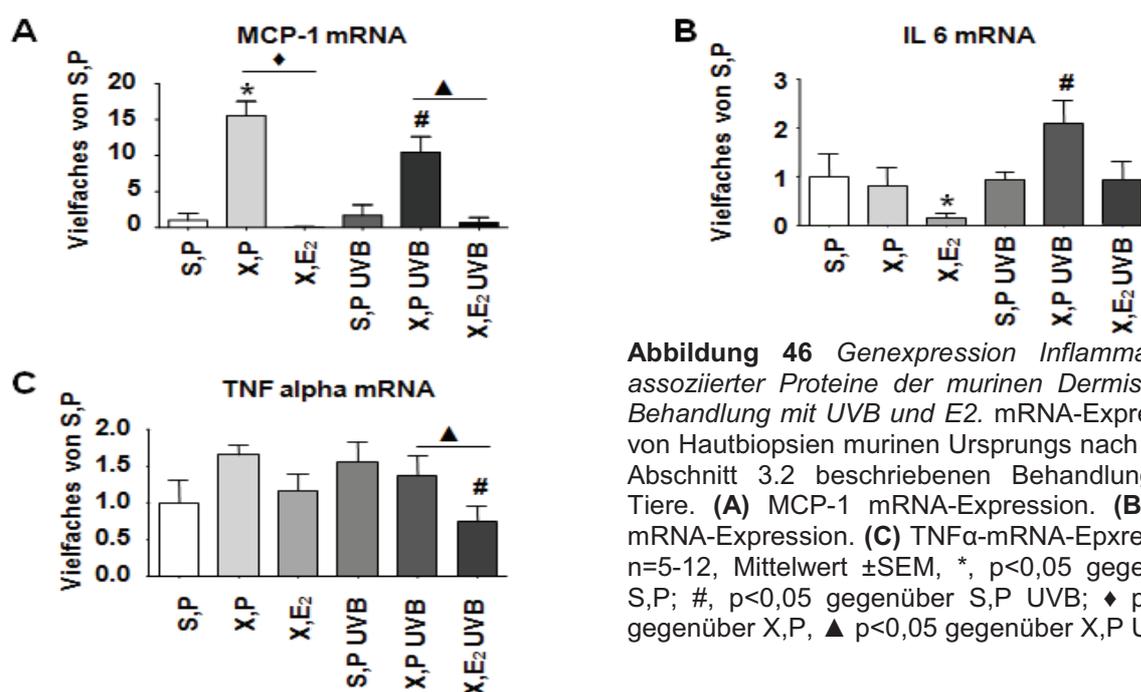


Abbildung 46 Genexpression Inflammationsassoziierter Proteine der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E₂. mRNA-Expression von Hautbiopsien murinen Ursprungs nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Behandlung der Tiere. **(A)** MCP-1 mRNA-Expression. **(B)** IL6-mRNA-Expression. **(C)** TNFα-mRNA-Expression. n=5-12, Mittelwert ±SEM, *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦ p<0,05 gegenüber X,P, ▲ p<0,05 gegenüber X,P UVB.

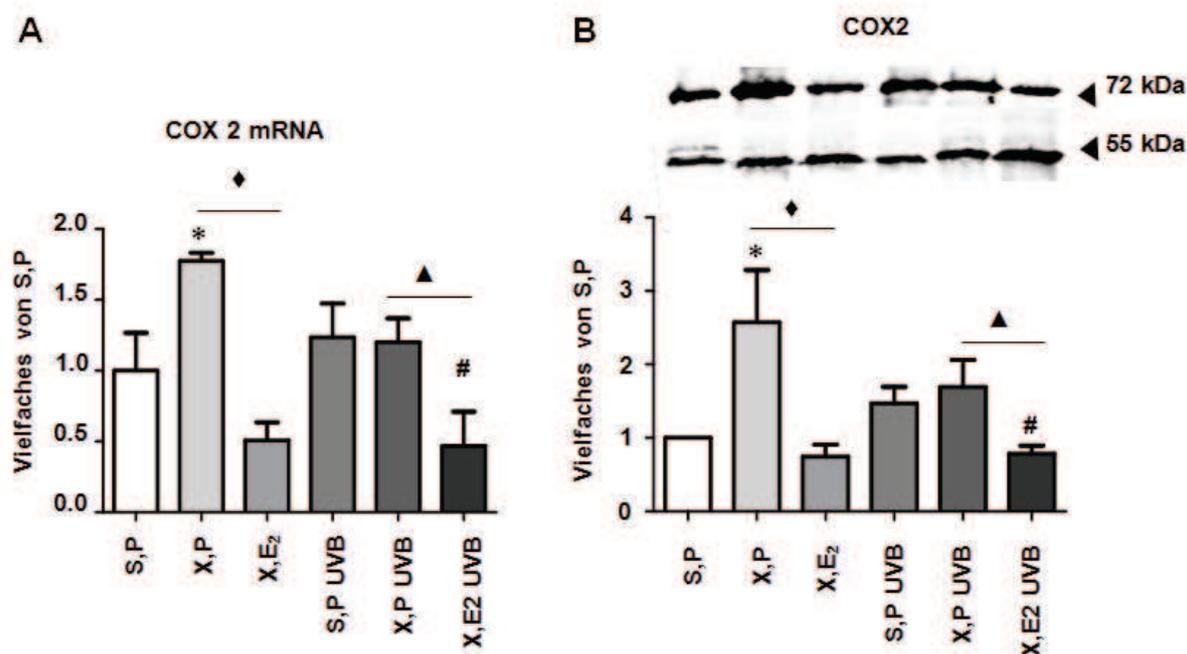


Abbildung 47 Expression von COX2 in der murinen Dermis nach Behandlung mit UVB und E₂. mRNA-Expression und Immunoblot von Hautbiopsien murinen Ursprungs nach der in Abschnitt 3.2 beschriebenen Behandlung der Mäuse. (A) COX2-mRNA-Expression. (B) COX2-Western Blot und quantitative Auswertung. n=5-12, Mittelwert ±SEM, *, p<0,05 gegenüber S,P; #, p<0,05 gegenüber S,P UVB; ♦ p<0,05 gegenüber X,P, ▲ p<0,05 gegenüber X,P UVB

Zusammenfassend weisen die *in vivo* gewonnenen Daten auf einen, mit der Induktion von HAS3 und Versican einhergehenden, proliferationssteigernden und anti-inflammatorischen Effekt von E₂ in UVB-bestrahlter Haut hin.

8 DISKUSSION

8.1 NEGATIVE MODULATION DER HA-MATRIX: KOLLAGENFRAGMENTE

Grundlegend sollte bei der Untersuchung von Veränderungen der HA-Matrix durch UV-Einflüsse zwischen der akuten und der chronischen Exposition unterschieden werden.

Obwohl HA in der gesunden Epidermis nur in geringen Mengen im Stratum spinosum und Stratum basale vorliegt, ist die HA-Extrusion in Keratinozyten während der Wundheilung stark erhöht [96]. Für HA wurde berichtet, dass vor allem HA mit niedrigem Molekulargewicht und HA-Kabel pro-inflammatorisch wirken [22, 90]. Es ist daher von Interesse, dass bei der akuten Reaktion auf UVB-Bestrahlung der Haut die HA-Synthese in Keratinozyten erhöht ist und niedermolekulare HA detektiert werden kann, welche an der transienten inflammatorischen Antwort der Haut im Rahmen des Sonnenbrands beteiligt sein könnte [7, 61]

Im Gegensatz zur akuten Reaktion auf UV-Strahlung scheint bei der chronischen UV-Exposition die Abnahme der dermalen HA-Menge für den Phänotyp und funktionelle Aspekte der aktinisch gealterten Haut von Bedeutung zu sein [65]. HA wird in der Dermis durch dermale Fibroblasten synthetisiert und als quantitative und funktionelle Komponente in die dermale EZM eingebaut. TGF- β ist ein starker Induktor der HA-Synthese in dermalen Fibroblasten. Es erscheint daher möglich, dass der verminderte HA-Gehalt in aktinisch gealterter Haut mit einer reduzierten TGF- β Konzentration im Alter einhergeht [18, 44]. Die genauen Regulationsmechanismen und weitere Faktoren, die eventuell kausal zu einer direkten Inhibition der HA-Synthese führen, sind bislang jedoch nicht bekannt.

Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Proteolyse von Typ1-Kollagen kryptische Integrin-bindende RGD-Sequenzen freisetzt [20, 61], welche zu einer veränderten biologischen Aktivität der KF im Vergleich zu nativem Kollagen führt. Beispielsweise scheinen KF über die Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen apoptotische Vorgänge in glatten Muskelzellen zu hemmen [113].

Der Abbau von fibrillärem Typ1- und Typ3-Kollagen findet als Folge von UVB-Strahlung statt und ist vermutlich für einen großen Teil des Phänotyps aktinisch gealterter Haut verantwortlich [32]. Die Spaltung von Kollagen in KF wird über MMPs vermittelt, welche durch UVB-Strahlung induziert und aktiviert werden [31, 32]. Eine Induktion von MMPs in der Dermis ist durch mindestens drei Mechanismen zu erklären (I): Erhöhte Expression von MMPs durch Keratinozyten und Diffusion selbiger in die papilläre Dermis. (II) Vermehrte Freisetzung von IL1 in der Epidermis und/oder der Dermis und anschließende parakrine oder autokrine Anregung der MMP-Expression durch IL1. (III) Direkte Induktion von MMPs durch UVB-Strahlung in der papillären Dermis.

Von Interesse ist des Weiteren, dass KF in sonnenbestrahlter Haut zu einer verminderten *de novo*-Synthese von Kollagen führen [39]. Dieser Befund wurde *in vitro* durch die Erkenntnis bestätigt, dass die *de novo* Prokollagen Typ1-Synthese auch in 3D-Gelen dermalen Fibroblasten unter dem Einfluss von mittels MMP verdautem Kollagen reduziert wird [106, 108]. Spaltung von Kollagen während der aktinischen Alterung bringt daher biologisch aktive KF hervor, die alternative Signalwege aktivieren und somit bei der Umgestaltung der Matrix mitwirken. Übereinstimmend mit diesen Daten sind Fibroblasten in der gesunden Dermis über Integrine mit Kollagenfibrillen verbunden und zeigen einen ausgebreiteten Phänotyp mit deutlich ausgeprägten zytoplasmatischen Aktinfilamenten [107]. Im Gegensatz hierzu interagieren Fibroblasten in der aktinisch gealterten Haut hauptsächlich mit KF und sind charakterisiert durch eine schmale Zellform mit deutlich vermindertem Aktin-Gehalt (Abbildung 48) [107]. Auch in den vorliegenden Experimenten konnte dieser Effekt gezeigt werden: KF führten in dermalen Fibroblasten zu einem zusammengezogenen Phänotyp mit einem deutlich reduzierten Zytoskelett.

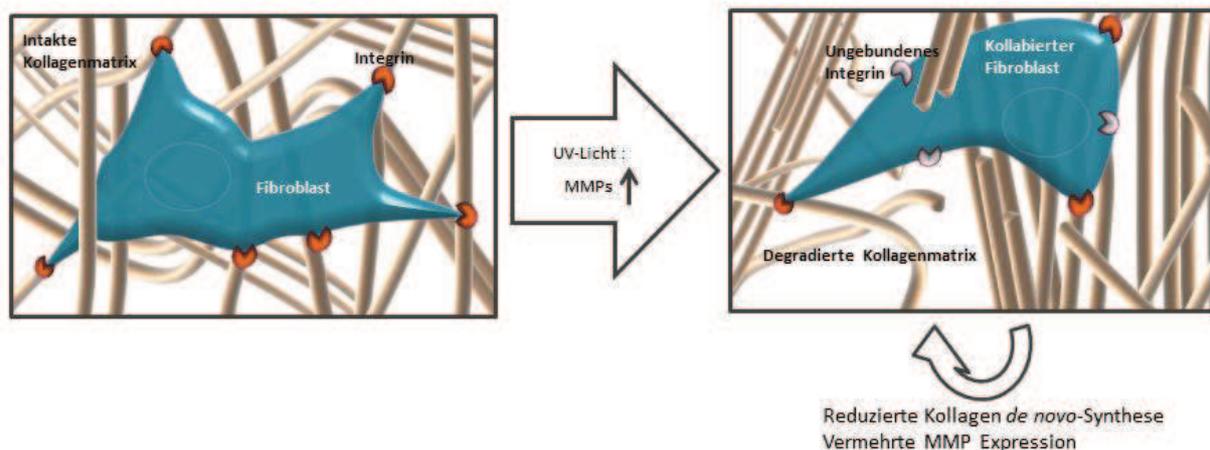


Abbildung 48 Durch UV-Strahlung hervorgerufene Kollagenfragmentierung. (A) Die mechanische Integrität der Dermis entsteht in sonnengeschützter Haut durch intakte Kollagen-Typ1-Fibrillen. Integrine auf der Oberfläche von Fibroblasten binden an Kollagenfibrillen und verbinden das intrazelluläre Aktin-Zytoskelett (nicht gezeigt) mit der extrazellulären Matrix. (B) Nach UV-Exposition kommt es zu einer vermehrten Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) die ihrerseits das Kollagennetzwerk degradieren. Durch das verminderte Angebot an Bindungsstellen verändert sich der Phänotyp der Fibroblasten.

In der vorliegenden Arbeit sollte folglich untersucht werden, ob neben den bereits beschriebenen Effekten der KF, auch eine Verbindung zwischen KF und der Regulation der HA-Matrix von dermalen Fibroblasten existiert und wie diese vermittelt wird. In der Tat wurde festgestellt, dass KF in dermalen Fibroblasten zu einem Verlust der perizellulären HA führten und die HA-Sekretion der Zellen stark reduzierten. Verglichen mit fibrillärem Kollagen aktivieren KF unterschiedliche Integrine. Im Besonderen konnte in früheren Veröffentlichungen gezeigt werden, dass KF $\alpha_v\beta_3$ -Integrine in glatten Muskelzellen aktivieren

[113]. Die Verwendung von blockierenden Antikörpern gegen $\alpha_v\beta_3$ -Integrine in den vorliegenden Versuchen zeigte, dass KF über $\alpha_v\beta_3$ -Integrine eine Herabregulation des HAS2-mRNA-Gehalts und die Disintegration des Zytoskeletts bewirkten.

Die ROCK-Familie der Rho-assoziierten Proteinkinasen ist von großer Bedeutung für die Aktin-Anordnung in der Zelle [63]. Die Feststellung, dass Latrunculin A und der ROCK-Inhibitor Y27632 die Wirkung von KF auf die HAS-Expression imitierten, legt nahe, dass das Zytoskelett und ROCK-medierte Signale in die Signaltransduktion der KF involviert sind. $\alpha_v\beta_3$ -Integrine werden, im Zusammenhang mit dem regenerierenden Signalweg von $\alpha_5\beta_1$ -Integrinen, mit einer verminderten RhoA/ROCK-Aktivität in Verbindung gebracht [19, 119].

Es ist bekannt, dass ROCK über seine Effekte auf das Zytoskelett die nukleo-zytoplasmische Überführung von Signalmolekülen beeinflusst [4, 63]. Des Weiteren ist Cofilin essentiell für die Organisation von Aktinfilamenten und wird durch Phosphorylierung reguliert [62]. Im Speziellen wird durch RhoA/ROCK-Signaltransduktion die LIM-Kinase aktiviert, welche ihrerseits Cofilin phosphoryliert und somit zu einer Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts führt [46]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Cofilin-Phosphorylierung von KF beeinträchtigt wird. Tatsächlich stellte sich heraus, dass KF $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-abhängig die Cofilin-Phosphorylierung reduzierte.

Die Proteinkinase ERK1/2 ist ein Signalmolekül dessen genregulatorische Effekte von einer erfolgreichen Translokation aus dem Zytoplasma in den Nukleus abhängig sind [13, 68]. Zusätzlich wurde bereits gezeigt, dass diese Translokation von ERK1/2 in einigen Fällen in Zusammenhang mit dem RhoA/ROCK-Signalweg steht [50, 55]. Der Gehalt an pERK1/2 war im Nukleus nach KF-Behandlung der Zellen reduziert und die Behandlung der Zellen mit einem ERK1/2-Inhibitor führte zur Hemmung der HAS2-mRNA-Expression. ELK-1 ist als direktes Effektorprotein des MAP-Kinase-Transduktionswegs bekannt. Die ELK-1-Phosphorylierung ist des Weiteren abhängig von der erfolgreichen pERK1/2-Translokation in den Nukleus [4]. Aus diesem Grund wurde die ELK-1-Phosphorylierung als weiteres Maß für die nukleäre Aktivität von pERK1/2 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Zellen mit KF die Phosphorylierung von ELK-1 reduzierte.

Die Phosphorylierung von ELK-1 durch pERK1/2 führt zur Rekrutierung mehrerer nukleärer Transkriptionsfaktoren wie z.B. dem *CyclicAMP Response Element-binding Protein* (CREB) [30, 120]. Da die ersten 2250 Basenpaare des HAS2-Promotors drei mögliche Bindungsstellen für CREB1 aufweisen, scheint es wahrscheinlich zu sein, dass die HAS2-Transkription über pERK1/2-CREB induziert wird und dass dieser Effektormechanismus der HAS2-Transkription durch die KF-Signaltransduktion gestört wird.

Zusammenfassend deuten die gewonnenen Daten darauf hin, dass KF über eine Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrine zu einer Inhibition von ROCK und der damit verbundenen Cofilin-Phosphorylierung führen. Letztendlich führt dies zu einer verminderten Translokation von pERK1/2 in den Nukleus und somit zu reduzierter transkriptioneller Aktivierung von HAS2 (Abbildung 49).

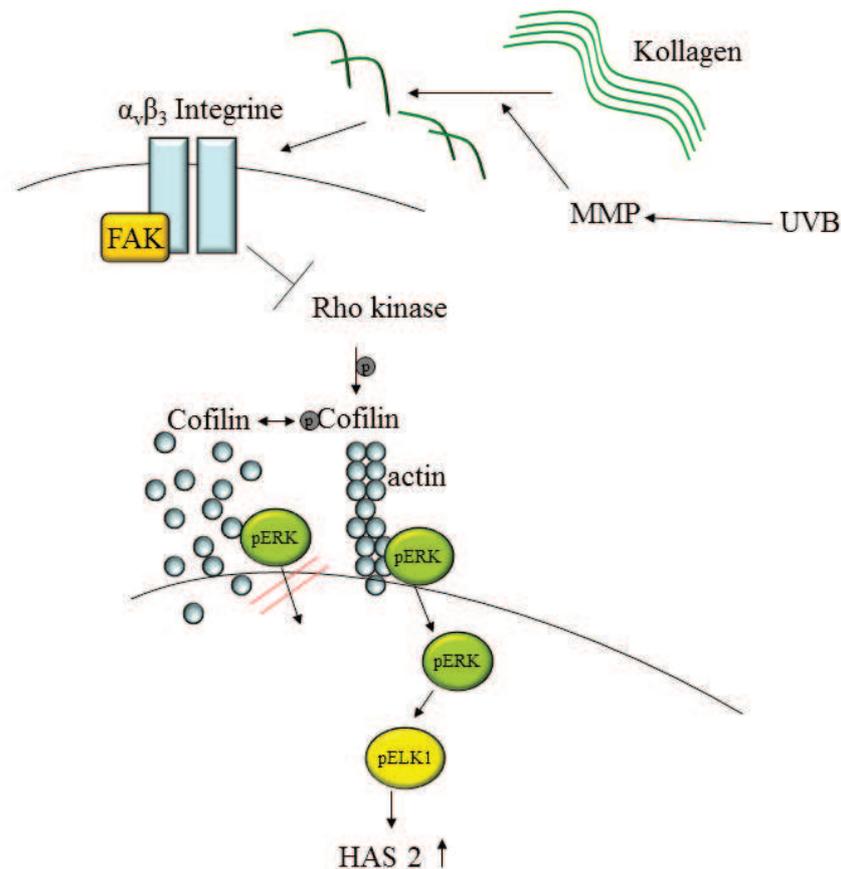


Abbildung 49 Schematische Zeichnung des vorgeschlagenen Mechanismus der verminderten HAS2-mRNA-Expression. Die durch UVB herbeigeführte Erhöhung der MMP1-Expression führt zu einer verstärkten Degradation von polymerem Kollagen. Die vorliegenden Daten lassen darauf schließen, dass KF über eine Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen zu einer Hemmung von ROCK und somit zur einer verminderten Cofilin-Phosphorylierung führen. Die hieraus entstehende Instabilität des Aktin-Zytoskeletts bedingt eine reduzierte Translokation von pERK1/2 in den Zellkern und somit verminderte Transkription von HAS2.

Wie per qRT-PCR festgestellt werden konnte, scheint es sich bei der HAS2 um das von den drei untersuchten HAS-Isoenzymen am stärksten exprimierte Isoenzym zu handeln. Diese Annahme stimmt mit der Tatsache überein, dass die Verminderung der HAS2 mRNA-Expression mit einer Reduktion des HA-Gehalts im Überstand der Fibroblasten korrelierte. Zeitgleich mit der HAS2-Reduktion nach KF-Stimulation trat eine erhöhte HAS1-mRNA-Expression auf. Diese HAS1-Induktion war ebenfalls abhängig von der Aktivierung von $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen und nachgeschaltet von der Aktivierung von p38, wie durch Versuche mit

unterschiedlichen Inhibitoren gezeigt werden konnte. Die Aktivierung von p38 durch $\alpha_v\beta_3$ -Integrine [17] sowie die Induktion von HAS1 durch Aktivierung von p38 wurde bereits in Synoviozyten dargestellt [92]. Ein möglicher Grund für die erhöhte HAS1-Expression könnte ein kompensatorischer Mechanismus als Antwort auf die HAS2-Reduktion sein. Allerdings erscheint die quantitative und funktionelle Bedeutung der HAS1-Induktion vernachlässigbar, wenn in Betracht gezogen wird, in welchem geringem Maß das Isoenzym in Fibroblasten vorliegt.

Experimente, welche die mechanistischen Grundlagen der HA-Regulation durch UVB-Strahlung aufdecken sollten, fokussierten sich im Folgenden auf die HAS2-Expression. Die Verwendung von dermalen Äquivalenten und Kollagengelen erlaubte die Untersuchung von UVB-Strahlung auf Fibroblasten in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix, wie sie ähnlich bereits von Varani et al. [108] benutzt wurde. Als Ergebnis konnte wieder eine Hemmung der HAS2-Expression festgestellt werden, die im zeitlichen Zusammenhang mit der Induktion von MMP1 und der Akkumulation von Kollagen-Neoepitopen durch UVB stand. Die Reduktion der HAS2-mRNA-Expression durch UVB-Strahlung konnte durch Vorbehandlung der Kollagengele mit einem MMP1-Inhibitor oder $\alpha_v\beta_3$ -Integrin-blockierenden Antikörpern aufgehoben werden.

Gemeinsam betrachtet beschreiben die dargestellten Daten einen neuen Signalweg, der die HA-Synthese während der Alterung mit der Kollagen Degradation koppelt, wie dies auch schon für die *de novo*-Kollagensynthese gezeigt werden konnte [108].

Folglich führt die UVB-Exposition im Rahmen der Hautalterung nicht nur zu einer Kollagenspaltung, sondern über die Entstehung von KF zusätzlich zu einer negativen Modulation der HA-Matrix. Da angenommen wird, dass HA wichtig für die Zell-Proliferation und Zell-Migration in der Haut ist, könnte der dargestellte regulatorische Mechanismus zur verminderten regenerativen Kapazität von gealterter Haut beitragen.

8.2 POSITIVE MODULATION DER HA-MATRIX: ESTRADIOL

Seit langem ist bekannt, dass E_2 einen positiven Einfluss auf die Hautqualität hat. Besonders deutlich wird dies beim Eintritt der Menopause oder im Speziellen während der Östrogen-Substitutions-Therapie postmenopausaler Frauen [110]. Die Effekte von E_2 auf die Haut sind vielseitig. Zu erwähnen sind hauptsächlich die Erhöhung der Feuchtigkeit, der Dicke und der Straffheit der Haut, sowie eine reduzierte Faltenbildung [49, 76, 77]. *In vitro* konnte des Weiteren gezeigt werden, dass E_2 -Behandlung dem Verlust von Typ1-Kollagen vorbeugt und die *de novo*-Kollagensynthese stimuliert [16]. Zusätzlich erhöht E_2 den dermalen GAG-Gehalt, was Grundlage für die erhöhte Feuchtigkeit und Dicke der Haut sein könnte [40, 104]. Der Verlust von HA in der Haut scheint einen wichtigen Teil des natürlichen Alterungsprozesses in der Postmenopause auszumachen. Eine systematische Tierstudie, die den Effekt von E_2 auf die dermale HA, die HAS-Isoenzyme, HA-Rezeptoren, die HYALs und vor allem die zugrundeliegenden Mechanismen der Regulation untersucht, steht bislang noch aus. Aus diesem Grund war das Ziel der vorliegenden Untersuchungen die Veränderungen von HA, HAS-Isoenzymen, HYALs, HA-Rezeptoren und dem HA-Adhären Versican durch E_2 im Zusammenhang mit der extrinsischen Alterung darzustellen und aufzuklären.

Die in Abschnitt 6.2 dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Verlust von endogenem E_2 zu einer starken Reduktion der dermalen HA in skh-1-Nacktmäusen führte, welche durch zusätzliche Behandlung mit UVB-Strahlung verstärkt wurde. Im Gegensatz hierzu erhöhte sich der Versican-Gehalt im Rahmen der aktinischen Alterung mit einer weiteren deutlichen Zunahme nach E_2 -Behandlung der Tiere. Die aktuellen Daten zeigen, dass sich die molekularen Ziele, welche die Antwort auf E_2 vermitteln, verändern, wenn UVB-Strahlung als Kofaktor wirkt. E_2 allein veränderte sowohl die HAS3- als auch die HYAL2-Expression, während E_2 und UVB-Strahlung gemeinsam hauptsächlich zu einer Regulation der HAS3 führten. HAS3 scheint daher einen besonderen Stellenwert als E_2 -abhängiger Regulator der dermalen HA-Homöostase während der intrinsischen und extrinsischen Hautalterung zu haben.

E_2 vermittelt die Veränderung der Genexpression durch Aktivierung der intrazellulären E_2 -Rezeptoren (E_2R) α und β , welche in Folge der Ligandenbindung in den Zellkern translozieren und dort auf Gene mit einer E_2 -Bindestelle in der Promoterregion wirken. Zusätzlich werden nicht genomische E_2 -Effekte über den GRP30-Signalweg vermittelt [42]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl $E_2R\alpha$ als auch $E_2R\beta$ in der Haut und in dermalen Fibroblasten exprimiert werden [110]. Allerdings treten beachtliche Varianzen im Verhältnis der beiden Subtypen in Abhängigkeit des Organs, des Alters und der Spezies auf [41, 111].

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie die E₂R-Expression der murinen Hautbiopsien mittels qRT-PCR untersucht. Das Ergebnis zeigte, dass der E₂R α -Rezeptor stark exprimiert vorlag während der E₂R β -Rezeptor nicht detektiert werden konnte. Aus diesem Grund wurden die oben dargestellten Effekte auf die HA- und Versican-Matrix dem E₂R α zugeordnet, wobei ein nicht-genomischer Effekt aufgrund der vorliegenden, auf der mRNA basierenden Untersuchungen nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

Die *in vivo*-Versuche ließen vermuten, dass die Veränderung der HAS3- und Versican-mRNA-Expression eine Hauptrolle bei den durch E₂ vermittelten Effekten auf die EZM einnehmen. Die anschließenden Untersuchungen waren folglich auf die Fragestellung ausgerichtet, ob E₂ seinen Einfluss durch eine direkte Genregulation in Fibroblasten vermittelt. Unerwarteter Weise zeigte sich, dass E₂ die mRNA-Expression von HAS3 und Versican nicht erhöhte. Zur Erklärung der *in vivo*-Ergebnisse wurde eine direkte transkriptionelle Regulation von E₂ auf die HAS3- und Versican-Genexpression daher ausgeschlossen.

Als alternative Begründung für die HAS3- und Versican-Induktion durch E₂ wurde im Folgenden ein parakriner, durch E₂ induzierter Mechanismus, in Betracht gezogen. Diese Hypothese geht einher mit früheren Befunden, dass der postmenopausale Verlust von Kollagen auf eine durch E₂ vermittelte Minderung des TGF β -Gehalts in der Dermis zurückzuführen ist [5].

Zur Untersuchung eines möglichen parakrinen Mechanismus wurden die mRNA-Expressionsniveaus unterschiedlicher Zytokine in den Hautbiopsien untersucht. In der Tat konnte festgestellt werden, dass die Hormon- und UVB-abhängige Regulation der EGF-Expression mit der von HAS3 übereinstimmte. Im Detail war der EGF-mRNA-Gehalt der Proben in OVX-Tieren erniedrigt und in E₂-behandelten Tieren erhöht. Bekannter Weise erhöht EGF die HAS2- und HAS3-Expression in Keratinozyten und wirkt hierdurch proliferationssteigernd und pro-migratorisch [66, 67]. Da zur Bestimmung der EGF-Expression Extrakte der kompletten Haut mit allen Hautschichten verwendet wurden, konnte nicht differenziert werden welche Zellart Ursprung für die detektierten EGF-Protein- und mRNA-Mengen war. Allerdings wies die immunohistologische Untersuchung der murinen Haut auf eine deutlich verstärkte EGF-Sekretion in der Epidermis hin. Anschließende *in vitro*-Ergebnisse zeigten, dass E₂ die EGF-Expression in Keratinozyten, jedoch nicht in Fibroblasten, erhöhte. Des Weiteren führte EGF, welches in der Zellkultur von Keratinozyten durch Stimulation mit E₂ und UVB freigesetzt wurde, zu einer erhöhten HAS3- und Versican-Expression in humanen Fibroblasten. Es wurde geschlussfolgert, dass E₂ in Keratinozyten die Freisetzung von EGF stimuliert, welches dann über einen parakrinen Mechanismus zur Induktion von HAS3 und Versican in dermalen Fibroblasten führt. Bei den vorliegenden mechanistischen Untersuchungen handelt es sich um *in vitro*-Experimente, die eine akute

UVB-Antwort nach einmaliger Bestrahlung, im Gegensatz zur chronischen *in vivo*-Bestrahlung, simulieren. Dies birgt einige Limitationen bei der Interpretation der Daten. Trotz allem entsprechen die vorliegenden Resultate den Ergebnissen anderer Studien in unterschiedlichen biologischen Systemen, die zeigten, dass EGF an zahlreichen durch E₂ hervorgerufenen Effekten *in vitro* und *in vivo* beteiligt ist [47, 64].

Die dargestellten Ergebnisse könnten außerdem hinsichtlich des Alterungs-Phänotyps von Fibroblasten relevant sein. Interessanterweise geht die altersabhängige Aktivierung von Fibroblasten einher mit einer verminderten HA-Synthese und einem geringeren Ansprechen der HA-Regulation auf Wachstumsfaktoren [115]. EGF scheint in diesem Prozess involviert zu sein, da die EGF-Signaltransduktion eine wichtige Rolle als Kofaktor bei der TGFβ₁-induzierten HA-Synthese spielt [84, 85]. Des Weiteren wirkt EGF als pro-proliferativer Stimulus auf Fibroblasten und die alterungsbedingte Abnahme der Proliferation wird teilweise durch eine verminderte Expression des EGFR hervorgerufen [71, 82]. EGF scheint folglich dem alterungsbedingten Phänotyp entgegenzuwirken, einem Prozess bei dem HA und HA-vermittelten Signalen vermutlich eine entscheidende Rolle zukommt. Schlussfolgernd ist es demnach wahrscheinlich, dass die Induktion von EGF durch E₂ in Keratinozyten und die parakrine Stimulation von HA und Versican in dermalen Fibroblasten zu der Abschwächung des alterungsbedingten zellulären Phänotyps durch E₂ beitragen.

In vitro-Studien liefern zahlreiche Informationen über die Funktionen der einzelnen Matrix-Moleküle wie z.B. Kollagen, HA und Versican. Trotz allem ist es offensichtlich, dass im Rahmen von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen die Veränderungen der Matrix durch ein Zusammenspiel unterschiedlicher Matrix-Komponenten charakterisiert sind. Beispielhaft für mögliche Auswirkungen einer veränderten Matrix-Zusammensetzung sind eine verminderte mikromechanische Krafteinwirkung auf die Zellen, modifizierte Matrix-Rezeptor-Signale z.B. über Integrine und Aktivierung von alternativen Rezeptoren, wie den *toll like* Rezeptoren, durch degradierte Matrixbestandteile und dadurch vermittelte „Gefahren-Signale“ [87]. Umbauvorgänge der Matrix sind gekennzeichnet durch eine drastische Veränderung des Mikroumfelds der Zellen und führen als Konsequenz zu Antworten auf zellulärer Ebene. Zu diesem Zeitpunkt ist unbekannt, welche Konsequenzen die komplexen Veränderungen der Matrixkomponenten während der Alterung auf den Phänotyp von Zellen, aber auch der gesamten Haut haben. Trotz allem erscheint der Befund, dass die aktinisch gealterte Matrix sich durch einen verminderten HA- und einen erhöhten Versican-Gehalt auszeichnet, in diesem Zusammenhang von Bedeutung zu sein.

Für Versican sind 4 Spleißvarianten bekannt, die sich durch eine unterschiedliche Anzahl an Glukosaminoglykan-Bindungsstellen und daher durch unterschiedliche Molekulargewichte und Gehalt an Chondroitinsulfat auszeichnen [122]. Die Funktionen der verschiedenen Spleißvarianten scheinen unterschiedlich, teilweise gegensätzlich und abhängig vom

biologischen System zu sein [81]. Die aktuellen Daten weisen darauf hin, dass Versican-V2 ein Zielmolekül der E₂/EGF-Regulation in der Haut ist. Obwohl die genaue Funktion von Versican-V2-Spleißvariante in der Haut noch nicht untersucht wurde, scheint ihr eine Rolle bei der Regulation der Matrix-Anordnung im zentralen Nervensystem zuzukommen [25]. So konnte in Versican-V2 *knockout*-Mäusen gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Versican-V2 im Ranvier-Schnürring essentiell für die Ausbildung des HA/Tenascin-R/Phosphacan-Komplexes ist. Versican-V2 könnte folglich auch im Rahmen der Haut-Homöostase und Haut-Alterung funktionell wichtig für die Matrix-Anordnung sein.

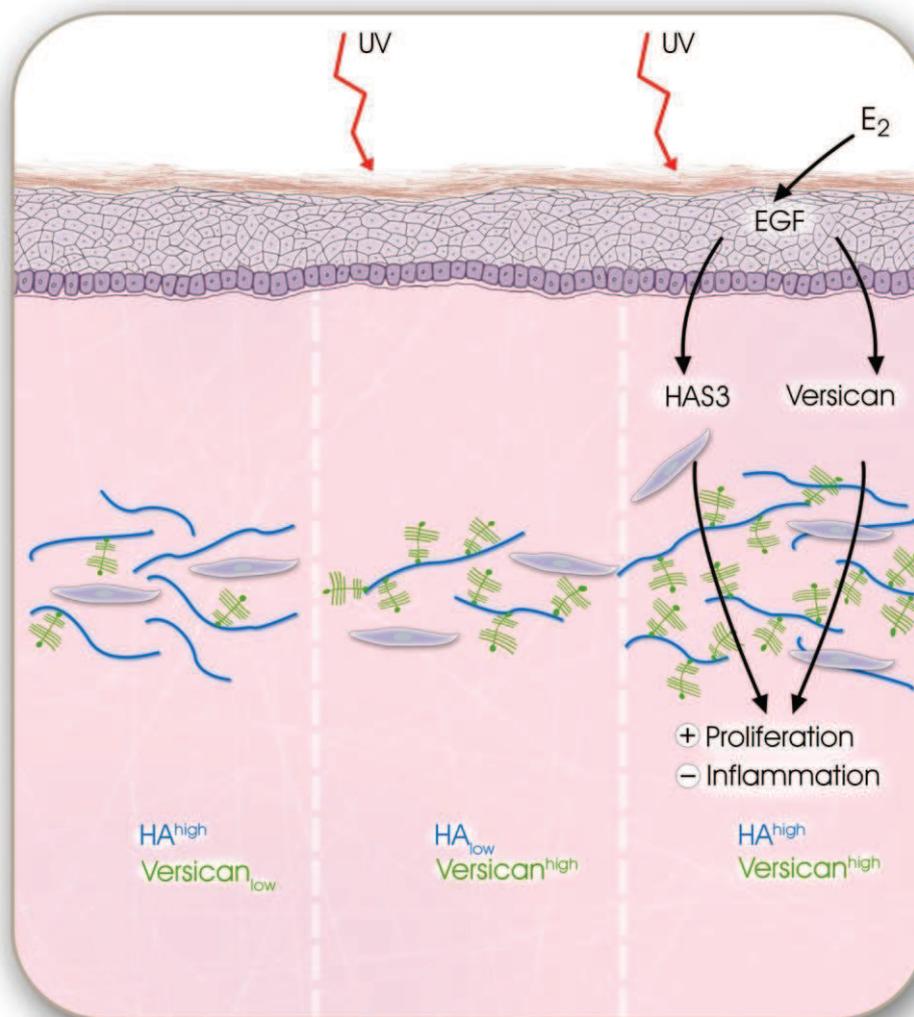


Abbildung 50 UVB und E₂ führen zu Veränderungen der dermalen Matrix. Schematische Darstellung zur Zusammenfassung der Arbeitshypothese, welche aus den vorliegenden Daten generiert wurde. Nach chronischer Bestrahlung verändert sich die dermale Matrix von einer HA-reichen und Versican-armen Matrix mit normaler proliferativer und inflammatorischer Aktivität (links) zu einer HA-armen und Versican-reichen Matrix mit geringer proliferativer und hoher inflammatorischer Aktivität (Mitte). E₂ führt zu einer erhöhten EGF-Sekretion in der Epidermis und somit über einen parakrinen Mechanismus zu einer Modulation der dermalen Matrix. Diese zeichnet sich durch einen hohen HA- und Versican-Gehalt aus und ist charakterisiert durch eine erhöhte proliferative und verminderte inflammatorische Aktivität (rechts).

In der vorliegenden Untersuchung wurde die proliferative Kapazität von Fibroblasten in der Dermis eng mit HAS3 und dem HA/Versican-Gehalt korreliert. Dies geht einher mit den bereits berichteten proliferationssteigernden Eigenschaften einer HA- und Versican-reichen Matrix (Abbildung 50) [29]. Des Weiteren verminderte E_2 deutlich den Gehalt an inflammatorischen Makrophagen und die MCP1-, IL6-, TNF α - und COX2-Expression nach UVB-Bestrahlung der Haut. Vice Versa war die Expression inflammatorischer Marker in UVB-bestrahlten OVX-Mäusen am höchsten, bei denen zugleich die EZM durch einen niedrigen HA- und erhöhten Versican-Gehalt charakterisiert war. Es wird angenommen, dass die supramolekulare Struktur der perizellulären Matrix bestimmt, ob sich die Matrix homöostatisch [91], pro-inflammatorisch [21] oder pro-migratorisch [29] verhält. Die dargestellten Daten suggerieren zwar einen starken Zusammenhang zwischen proliferativen und inflammatorischen Prozessen in Zusammenhang mit den Veränderungen der HA/Versican-Matrix, sind jedoch nicht beweisführend. Aus diesem Grund sollten zukünftige Experimente zeigen, ob das Verhältnis von HA zu Versican Auswirkungen auf die inflammatorische und proliferative Antwort in Folge von UVB-Strahlung hat.

Zusammenfassend soll festgehalten werden, dass es E_2 während der extrinsischen Hautalterung einen positiven Modulator von HA- und Versican darstellt. Die möglicherweise protektiven Funktionen von E_2 auf die dermale Matrix werden über einen parakrinen, EGF-vermittelten Mechanismus ausgeübt.

8.3 AUSBLICK

In der vorliegenden Studie werden zwei Modulatoren der EZM im Rahmen der Hautalterung vorgestellt. Die hier charakterisierten zugrundeliegenden Regulations-Mechanismen bieten zahlreiche Angriffspunkte für weitere Untersuchungen und Entwicklungen.

Durch KF hervorgerufene Modifikationen der perizellulären HA Matrix sind möglicherweise ein wichtiger Grund für strukturelle und qualitative Veränderungen der Dermis während der Hautalterung. Diese Hypothese sollte in zukünftigen Studien *in vivo* überprüft werden. Im Falle eines positiven Befundes eröffnen sich zahlreiche neue Strategien um der Schädigung der HA-Matrix entgegen zu wirken. Ein möglicher Angriffspunkt ist die Verwendung von MMP-Inhibitoren. Aber auch die Inhibition von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin blockierenden Stoffen sowie Aktivator des Zytoskeletts erscheinen vielversprechend. Grundlegende Voraussetzung beim Eingriff in elementare zelluläre Mechanismen, wie der Regulation des Zytoskeletts, ist natürlich die ernsthafte Erwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses.

Von großem Interesse bei der E_2 -bedingten Modulation der HA- und Versican-Matrix ist vor allem das Zusammenspiel der beiden Komponenten. Es wird angenommen, dass die supramolekulare Struktur der perizellulären Matrix darüber entscheidet, ob die Matrix homöostatisch, proliferationssteigernd oder migrationssteigernd wirkt. Aus diesem Grund sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden welche Rolle das Verhältnis von HA zu Versican beim Verlauf von inflammatorischen und alterungsbedingten Prozessen einnimmt. Des Weiteren bietet der in dieser Untersuchung nahegelegte EGF vermittelte parakrine Signalweg zahlreiche Angriffspunkte zur pharmakologischen Intervention bei der Hautalterung. Beispielsweise seien hier Modulatoren des EGF-Rezeptors und Derivate von E_2 genannt.

Sowohl die negative als auch die positive Modulation der HA-Matrix stellen grundlegende Prinzipien dar, die neben Ihrer Rolle bei der Hautalterung auch für andere pathologische Prozesse wie die Atherosklerose oder Tumorgenese von Interesse sein könnten.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Klinisch manifestiert sich die extrinsisch gealterte Haut durch das Auftreten von Falten, Gewebeschlaffheit und einem ledrigen Erscheinungsbild. Kausal verknüpft mit diesen Symptomen sind histologische und ultrastrukturelle Veränderungen der extrazellulären Matrix (EZM), im Speziellen eine deutliche Abnahme des Hyaluronsäure(HA)-Gehalts in der Dermis. Welche regulatorischen Mechanismen diesen Veränderungen zugrunde liegen ist bislang weitgehend unbekannt. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, potentielle Modulatoren der HA Matrix zu identifizieren. Ein Hauptmerkmal der Umstrukturierung der EZM durch Sonneneinstrahlung ist die Entstehung von Kollagenfragmenten (KF) durch Matrix Metalloproteinasen. Die Stimulation von dermalen Fibroblasten mit KF *in vitro* führte zu einer verminderten HA-Synthese und einer Abnahme der HA-Synthase 2-mRNA-Expression. Es konnte gezeigt werden, dass KF $\alpha_v\beta_3$ -Integrine aktivieren und über eine Inhibition der RhoA-Kinase eine Degradation des Aktin-Zytoskeletts bedingen. Dies führt im Anschluss zu einer verminderten Translokation von pERK1/2 in den Zellkern und einer nachgeschalteten reduzierten HAS2-Transkription. KF wirken folglich als negative Modulatoren der HA-Matrix, die die extrazelluläre und perizelluläre HA-Matrix vermindern. Im Gegensatz zu KF wird Estradiol (E_2) ein positiver Effekt auf die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Haut zugeschrieben. Zur Untersuchung des Einflusses von E_2 auf die HA-Matrix wurde bei skh-1 Nacktmäusen die endogene Hormonproduktion durch Ovariectomie depletiert. Anschließend wurde den Tieren ein Placebo- oder E_2 -freisetzendes-Pellet implantiert. Der Einfluss der extrinsischen Alterung wurde durch UVB-Bestrahlung imitiert. Extrinsisch gealterte Tiere zeigten einen deutlichen Verlust an HA, der durch die Behandlung mit E_2 aufgehoben werden konnte. Versican, ein HA assoziiertes Proteoglykan, lag in UVB-bestrahlten und E_2 -behandelten Tieren erhöht vor. Einhergehend mit der Erhöhung des HA-Gehalts der Dermis konnte eine Induktion der HA-Synthase 3 beobachtet werden. Es zeigte sich, dass diese Regulation auf einem indirekten Mechanismus beruhte. Hierbei führt E_2 vermutlich zu einer erhöhten Sekretion von EGF in Keratinozyten, welches im Anschluss auf parakrinem Weg die Induktion der HAS3 und Versican hervorruft und somit eine positive Modulation der HA-/Versican-Matrix herbeiführt. Diese veränderte Matrix ist vermutlich an den proliferationssteigernden und inflammationshemmenden Effekten von E_2 beteiligt. Zusammenfassend konnten somit zwei völlig neue Mechanismen, welche an der Regulation der HA-Matrix im Rahmen der extrinsischen Alterung beteiligt sind, charakterisiert werden. Zudem gelang es erstmalig einen direkten negativen Regulator der HA-Synthase 2 zu identifizieren.

10SUMMARY

Extrinsically aged skin is clinically characterized by wrinkling, laxity and a leather like appearance. These symptoms of actinic aging are accompanied by histological and ultrastructural changes of the connective tissue, specifically by a loss of hyaluronan (HA) in the dermis. The regulatory mechanisms underlying these alterations are up to date largely unknown. Aim of the present study was therefore to identify modulators of the extracellular matrix (ECM) with respect to their effect on the papillary dermis during photoaging. One major characteristic of UVB-evoked structural changes of the ECM are the emergence of collagen fragments due to the upregulation of matrix metalloproteinases. Stimulation of dermal fibroblast with collagen fragments (CF) *in vitro* led to reduced HA-synthesis and downregulation of HA-synthase 2 mRNA expression. It was found, that CF activate $\alpha_v\beta_3$ -Integrins and thereby let to resolution of the actin cytoskeleton by inhibition of the RhoA-kinase. Consequently translocation of pERK1/2 into the nucleus was inhibited which resulted in decreased HA-synthase 2 transcription. Thus, CF act as negative regulators of HA, by reducing the extracellular and pericellular HA-Matrix. In comparison to CF, a positive effect on the structural and functional characteristics of the skin is attributed to estradiol (E_2). To investigate the influence of E_2 on the HA-Matrix the endogenous hormone production of hairless *skh-1* mice was depleted by ovariectomy. Subsequently placebo or E_2 controlled release pellets were implanted. UVB-irradiation was employed to mimic extrinsic aging. Extrinsically aged mice showed a marked decline of HA in the papillary dermis which could be abolished by E_2 treatment. Versican, a HA-binding proteoglycan, was augmented after both UVB and E_2 treatment. Accompanied by the induction of HA an increase of HA-synthase 3 was detected. Furthermore, it was found that this effect was dependent on a paracrine mechanism: E_2 led to an upregulation of EGF-secretion in keratinocytes, which in turn induced HA-synthase 3 and Versican expression in dermal fibroblast. E_2 therefore is a positive modulator of the HA-/Versican-Matrix. The altered matrix might be part of the proliferative and anti-inflammatory response of the dermal matrix to E_2 . In conclusion two novel regulatory mechanism are presented, which are involved in the response of the HA-Matrix to extrinsic aging. Furthermore CF are the first direct inhibitors of the HA-synthase 2 expression.

11 LITERATURVERZEICHNIS

1. AFFINITO, P., ET AL., *EFFECTS OF POSTMENOPAUSAL HYPOESTROGENISM ON SKIN COLLAGEN*. MATURITAS, 1999. **33**(3): P. 239-47.
2. AHMED, M. AND G.C. KUNDU, *OSTEOPONTIN SELECTIVELY REGULATES P70S6K/MTOR PHOSPHORYLATION LEADING TO NF-KAPPAB DEPENDENT AP-1-MEDIATED ICAM-1 EXPRESSION IN BREAST CANCER CELLS*. MOL CANCER, 2010. **9**: P. 101.
3. ALLSOPP, R.C., ET AL., *TELOMERE LENGTH PREDICTS REPLICATIVE CAPACITY OF HUMAN FIBROBLASTS*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1992. **89**(21): P. 10114-8.
4. APLIN, A.E., ET AL., *INTEGRIN-MEDIATED ADHESION REGULATES ERK NUCLEAR TRANSLOCATION AND PHOSPHORYLATION OF ELK-1*. J CELL BIOL, 2001. **153**(2): P. 273-82.
5. ASHCROFT, G.S., ET AL., *ESTROGEN ACCELERATES CUTANEOUS WOUND HEALING ASSOCIATED WITH AN INCREASE IN TGF-BETA1 LEVELS*. NAT MED, 1997. **3**(11): P. 1209-15.
6. AVERBECK, M., ET AL., *IN SITU PROFILING AND QUANTIFICATION OF CYTOKINES RELEASED DURING ULTRAVIOLET B-INDUCED INFLAMMATION BY COMBINING DERMAL MICRODIALYSIS AND PROTEIN MICROARRAYS*. EXP DERMATOL, 2006. **15**(6): P. 447-54.
7. AVERBECK, M., ET AL., *DIFFERENTIAL REGULATION OF HYALURONAN METABOLISM IN THE EPIDERMAL AND DERMAL COMPARTMENTS OF HUMAN SKIN BY UVB IRRADIATION*. J INVEST DERMATOL, 2007. **127**(3): P. 687-97.
8. BERNSTEIN, E.F., ET AL., *DIFFERENTIAL EXPRESSION OF THE VERSICAN AND DECORIN GENES IN PHOTOAGED AND SUN-PROTECTED SKIN. COMPARISON BY IMMUNOHISTOCHEMICAL AND NORTHERN ANALYSES*. LABORATORY INVESTIGATION; A JOURNAL OF TECHNICAL METHODS AND PATHOLOGY, 1995. **72**(6): P. 662-9.
9. BISSELL, M.J., H.G. HALL, AND G. PARRY, *HOW DOES THE EXTRACELLULAR MATRIX DIRECT GENE EXPRESSION?* J THEOR BIOL, 1982. **99**(1): P. 31-68.
10. BRENNAN, M., ET AL., *MATRIX METALLOPROTEINASE-1 IS THE MAJOR COLLAGENOLYTIC ENZYME RESPONSIBLE FOR COLLAGEN DAMAGE IN UV-IRRADIATED HUMAN SKIN*. PHOTOCHEM PHOTOBIO, 2003. **78**(1): P. 43-8.
11. BRINCAT, M., ET AL., *SKIN COLLAGEN CHANGES IN POSTMENOPAUSAL WOMEN RECEIVING DIFFERENT REGIMENS OF ESTROGEN THERAPY*. OBSTET GYNECOL, 1987. **70**(1): P. 123-7.
12. BRULS, W.A., H. VAN WEELDEN, AND J.C. VAN DER LEUN, *TRANSMISSION OF UV-RADIATION THROUGH HUMAN EPIDERMAL LAYERS AS A FACTOR INFLUENCING THE MINIMAL ERYTHEMA DOSE*. PHOTOCHEM PHOTOBIO, 1984. **39**(1): P. 63-7.
13. BRUNET, A., ET AL., *NUCLEAR TRANSLOCATION OF P42/P44 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE IS REQUIRED FOR GROWTH FACTOR-INDUCED GENE EXPRESSION AND CELL CYCLE ENTRY*. EMBO J, 1999. **18**(3): P. 664-74.
14. CALABRO, A., V.C. HASCALL, AND R.J. MIDURA, *ADAPTATION OF FACE METHODOLOGY FOR MICROANALYSIS OF TOTAL HYALURONAN AND CHONDROITIN SULFATE COMPOSITION FROM CARTILAGE*. GLYCOBIOLOGY, 2000. **10**(3): P. 283-93.
15. CARRINO, D.A., ET AL., *AGE-RELATED CHANGES IN THE PROTEOGLYCANS OF HUMAN SKIN. SPECIFIC CLEAVAGE OF DECORIN TO YIELD A MAJOR CATABOLIC FRAGMENT IN ADULT SKIN*. J BIOL CHEM, 2003. **278**(19): P. 17566-72.
16. CASTELO-BRANCO, C., M. DURAN, AND J. GONZALEZ-MERLO, *SKIN COLLAGEN CHANGES RELATED TO AGE AND HORMONE REPLACEMENT THERAPY*. MATURITAS, 1992. **15**(2): P. 113-9.
17. CHEN, J., ET AL., *ALPHA(V) INTEGRIN, P38 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE, AND UROKINASE PLASMINOGEN ACTIVATOR ARE FUNCTIONALLY LINKED IN INVASIVE BREAST CANCER CELLS*. J BIOL CHEM, 2001. **276**(51): P. 47901-5.
18. DAI, G., ET AL., *CHRONIC ULTRAVIOLET B IRRADIATION CAUSES LOSS OF HYALURONIC ACID FROM MOUSE DERMIS BECAUSE OF DOWN-REGULATION OF HYALURONIC ACID SYNTHASES*. THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, 2007. **171**(5): P. 1451-61.
19. DANEN, E.H., ET AL., *THE FIBRONECTIN-BINDING INTEGRINS ALPHA5BETA1 AND ALPHAVBETA3 DIFFERENTIALLY MODULATE RHOA-GTP LOADING, ORGANIZATION OF CELL MATRIX ADHESIONS, AND FIBRONECTIN FIBRILLOGENESIS*. J CELL BIOL, 2002. **159**(6): P. 1071-86.
20. DAVIS, G.E., *AFFINITY OF INTEGRINS FOR DAMAGED EXTRACELLULAR MATRIX: ALPHA V BETA 3 BINDS TO DENATURED COLLAGEN TYPE I THROUGH RGD SITES*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, 1992. **182**(3): P. 1025-31.

21. DE LA MOTTE, C.A., ET AL., *MONONUCLEAR LEUKOCYTES PREFERENTIALLY BIND VIA CD44 TO HYALURONAN ON HUMAN INTESTINAL MUCOSAL SMOOTH MUSCLE CELLS AFTER VIRUS INFECTION OR TREATMENT WITH POLY(I.C)*. J BIOL CHEM, 1999. **274**(43): P. 30747-55.
22. DE LA MOTTE, C.A., ET AL., *MONONUCLEAR LEUKOCYTES BIND TO SPECIFIC HYALURONAN STRUCTURES ON COLON MUCOSAL SMOOTH MUSCLE CELLS TREATED WITH POLYINOSINIC ACID:POLYCYTIDYLIC ACID: INTER-ALPHA-TRYPSIN INHIBITOR IS CRUCIAL TO STRUCTURE AND FUNCTION*. AM J PATHOL, 2003. **163**(1): P. 121-33.
23. DE OLIVEIRA, C.A. AND B. MANTOVANI, *LATRUNCULIN A IS A POTENT INHIBITOR OF PHAGOCYTOSIS BY MACROPHAGES*. LIFE SCI, 1988. **43**(22): P. 1825-30.
24. DENDA, M., ET AL., *AGE- AND SEX-DEPENDENT CHANGE IN STRATUM CORNEUM SPHINGOLIPIDS*. ARCH DERMATOL RES, 1993. **285**(7): P. 415-7.
25. DOURS-ZIMMERMANN, M.T., ET AL., *VERSICAN V2 ASSEMBLES THE EXTRACELLULAR MATRIX SURROUNDING THE NODES OF RANVIER IN THE CNS*. THE JOURNAL OF NEUROSCIENCE : THE OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, 2009. **29**(24): P. 7731-42.
26. DOURS-ZIMMERMANN, M.T. AND D.R. ZIMMERMANN, *A NOVEL GLYCOSAMINOGLYCAN ATTACHMENT DOMAIN IDENTIFIED IN TWO ALTERNATIVE SPLICE VARIANTS OF HUMAN VERSICAN*. J BIOL CHEM, 1994. **269**(52): P. 32992-8.
27. DUNN, L.B., ET AL., *DOES ESTROGEN PREVENT SKIN AGING? RESULTS FROM THE FIRST NATIONAL HEALTH AND NUTRITION EXAMINATION SURVEY (NHANES I)*. ARCH DERMATOL, 1997. **133**(3): P. 339-42.
28. ELHAGE, R., ET AL., *17 BETA-ESTRADIOL PREVENTS FATTY STREAK FORMATION IN APOLIPOPROTEIN E-DEFICIENT MICE*. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL, 1997. **17**(11): P. 2679-84.
29. EVANKO, S.P., J.C. ANGELLO, AND T.N. WIGHT, *FORMATION OF HYALURONAN- AND VERSICAN-RICH PERICELLULAR MATRIX IS REQUIRED FOR PROLIFERATION AND MIGRATION OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS*. ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL, 1999. **19**(4): P. 1004-13.
30. FINKBEINER, S., *NEW ROLES FOR INTRONS: SITES OF COMBINATORIAL REGULATION OF CA²⁺- AND CYCLIC AMP-DEPENDENT GENE TRANSCRIPTION*. SCI STKE, 2001. **2001**(94): P. PE1.
31. FISHER, G.J., ET AL., *MOLECULAR BASIS OF SUN-INDUCED PREMATURE SKIN AGEING AND RETINOID ANTAGONISM*. NATURE, 1996. **379**(6563): P. 335-9.
32. FISHER, G.J., ET AL., *PATHOPHYSIOLOGY OF PREMATURE SKIN AGING INDUCED BY ULTRAVIOLET LIGHT*. N ENGL J MED, 1997. **337**(20): P. 1419-28.
33. FRASER, J.R., T.C. LAURENT, AND U.B. LAURENT, *HYALURONAN: ITS NATURE, DISTRIBUTION, FUNCTIONS AND TURNOVER*. J INTERN MED, 1997. **242**(1): P. 27-33.
34. FUCHS, K.O., ET AL., *THE EFFECTS OF AN ESTROGEN AND GLYCOLIC ACID CREAM ON THE FACIAL SKIN OF POSTMENOPAUSAL WOMEN: A RANDOMIZED HISTOLOGIC STUDY*. CUTIS, 2003. **71**(6): P. 481-8.
35. GENDIMENICO, G.J., ET AL., *TOPICAL ESTROGENS: THEIR EFFECTS ON CONNECTIVE TISSUE SYNTHESIS IN HAIRLESS MOUSE SKIN*. ARCH DERMATOL RES, 2002. **294**(5): P. 231-6.
36. GENUTH, S., ET AL., *GLYCATION AND CARBOXYMETHYLLYSINE LEVELS IN SKIN COLLAGEN PREDICT THE RISK OF FUTURE 10-YEAR PROGRESSION OF DIABETIC RETINOPATHY AND NEPHROPATHY IN THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL AND EPIDEMIOLOGY OF DIABETES INTERVENTIONS AND COMPLICATIONS PARTICIPANTS WITH TYPE 1 DIABETES*. DIABETES, 2005. **54**(11): P. 3103-11.
37. GILCHREST, B.A., *A REVIEW OF SKIN AGEING AND ITS MEDICAL THERAPY*. BR J DERMATOL, 1996. **135**(6): P. 867-75.
38. GOSPODAROWICZ, D., G. GREENBURG, AND C.R. BIRDWELL, *DETERMINATION OF CELLULAR SHAPE BY THE EXTRACELLULAR MATRIX AND ITS CORRELATION WITH THE CONTROL OF CELLULAR GROWTH*. CANCER RES, 1978. **38**(11 Pt 2): P. 4155-71.
39. GRIFFITHS, C.E., ET AL., *RESTORATION OF COLLAGEN FORMATION IN PHOTODAMAGED HUMAN SKIN BY TRETINOIN (RETINOIC ACID)*. N ENGL J MED, 1993. **329**(8): P. 530-5.
40. GROSMAN, N., E. HVIDBERG, AND J. SCHOU, *THE EFFECT OF OESTROGENIC TREATMENT ON THE ACID MUCOPOLYSACCHARIDE PATTERN IN SKIN OF MICE*. ACTA PHARMACOL TOXICOL (COPENH), 1971. **30**(5): P. 458-64.
41. HACZYNSKI, J., ET AL., *HUMAN CULTURED SKIN FIBROBLASTS EXPRESS ESTROGEN RECEPTOR ALPHA AND BETA*. INT J MOL MED, 2002. **10**(2): P. 149-53.
42. HALL, J.M., J.F. COUSE, AND K.S. KORACH, *THE MULTIFACETED MECHANISMS OF ESTRADIOL AND ESTROGEN RECEPTOR SIGNALING*. J BIOL CHEM, 2001. **276**(40): P. 36869-72.
43. HEIDEBRECHT, H.J., ET AL., *P100: A NOVEL PROLIFERATION-ASSOCIATED NUCLEAR PROTEIN SPECIFICALLY RESTRICTED TO CELL CYCLE PHASES S, G2, AND M*. BLOOD, 1997. **90**(1): P. 226-33.
44. HELDIN, P., T.C. LAURENT, AND C.H. HELDIN, *EFFECT OF GROWTH FACTORS ON HYALURONAN SYNTHESIS IN CULTURED HUMAN FIBROBLASTS*. THE BIOCHEMICAL JOURNAL, 1989. **258**(3): P. 919-22.

45. HERZENBERG, L.A. AND R.G. SWEET, *FLUORESCENCE-ACTIVATED CELL SORTING*. SCI AM, 1976. **234**(3): p. 108-17.
46. HUVENEERS, S. AND E.H. DANEN, *ADHESION SIGNALING - CROSSTALK BETWEEN INTEGRINS, SRC AND RHO*. J CELL SCI, 2009. **122**(PT 8): p. 1059-69.
47. IGNAR-TROWBRIDGE, D.M., ET AL., *COUPLING OF DUAL SIGNALING PATHWAYS: EPIDERMAL GROWTH FACTOR ACTION INVOLVES THE ESTROGEN RECEPTOR*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1992. **89**(10): p. 4658-62.
48. ITANO, N. AND K. KIMATA, *MAMMALIAN HYALURONAN SYNTHASES*. IUBMB LIFE, 2002. **54**(4): p. 195-9.
49. KANDA, N. AND S. WATANABE, *REGULATORY ROLES OF SEX HORMONES IN CUTANEOUS BIOLOGY AND IMMUNOLOGY*. J DERMATOL SCI, 2005. **38**(1): p. 1-7.
50. KAWAMURA, S., S. MIYAMOTO, AND J.H. BROWN, *INITIATION AND TRANSDUCTION OF STRETCH-INDUCED RHOA AND RAC1 ACTIVATION THROUGH CAVEOLAE: CYTOSKELETAL REGULATION OF ERK TRANSLOCATION*. J BIOL CHEM, 2003. **278**(33): p. 31111-7.
51. KNOTT, A., ET AL., *DEREGULATION OF VERSICAN AND ELASTIN BINDING PROTEIN IN SOLAR ELASTOSIS*. BIOGERONTOLOGY, 2009. **10**(2): p. 181-90.
52. LAEMMLI, U.K., *CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING THE ASSEMBLY OF THE HEAD OF BACTERIOPHAGE T4*. NATURE, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
53. LEBARON, R.G., D.R. ZIMMERMANN, AND E. RUOSLAHTI, *HYALURONATE BINDING PROPERTIES OF VERSICAN*. J BIOL CHEM, 1992. **267**(14): p. 10003-10.
54. LEE, D.Y., ET AL., *INTEGRIN-MEDIATED EXPRESSION OF BONE FORMATION-RELATED GENES IN OSTEOBLAST-LIKE CELLS IN RESPONSE TO FLUID SHEAR STRESS: ROLES OF EXTRACELLULAR MATRIX, SHC, AND MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE*. J BONE MINER RES, 2008. **23**(7): p. 1140-9.
55. LIU, Y., ET AL., *RHO KINASE-INDUCED NUCLEAR TRANSLOCATION OF ERK1/ERK2 IN SMOOTH MUSCLE CELL MITOGENESIS CAUSED BY SEROTONIN*. CIRC RES, 2004. **95**(6): p. 579-86.
56. MAEKAWA, M., ET AL., *SIGNALING FROM RHO TO THE ACTIN CYTOSKELETON THROUGH PROTEIN KINASES ROCK AND LIM-KINASE*. SCIENCE, 1999. **285**(5429): p. 895-8.
57. MAHEUX, R., ET AL., *A RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED STUDY ON THE EFFECT OF CONJUGATED ESTROGENS ON SKIN THICKNESS*. AM J OBSTET GYNECOL, 1994. **170**(2): p. 642-9.
58. MAJORA, M., ET AL., *FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF MITOCHONDRIAL DNA DELETIONS IN HUMAN SKIN FIBROBLASTS: INCREASED CONTRACTILE STRENGTH IN COLLAGEN LATTICES IS DUE TO OXIDATIVE STRESS-INDUCED LYSYL OXIDASE ACTIVITY*. AM J PATHOL, 2009. **175**(3): p. 1019-29.
59. MAKRANTONAKI, E. AND C.C. ZOUBOULIS, *MOLECULAR MECHANISMS OF SKIN AGING: STATE OF THE ART*. ANN N Y ACAD SCI, 2007. **1119**: p. 40-50.
60. MASIERO, L., ET AL., *REGULATION OF THE RHOA PATHWAY IN HUMAN ENDOTHELIAL CELL SPREADING ON TYPE IV COLLAGEN: ROLE OF CALCIUM INFLUX*. J CELL SCI, 1999. **112** (PT 19): p. 3205-13.
61. MONTGOMERY, A.M., R.A. REISFELD, AND D.A. CHERESH, *INTEGRIN ALPHA V BETA 3 RESCUES MELANOMA CELLS FROM APOPTOSIS IN THREE-DIMENSIONAL DERMAL COLLAGEN*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1994. **91**(19): p. 8856-60.
62. MOON, A. AND D.G. DRUBIN, *THE ADF/COFILIN PROTEINS: STIMULUS-RESPONSIVE MODULATORS OF ACTIN DYNAMICS*. MOL BIOL CELL, 1995. **6**(11): p. 1423-31.
63. NARUMIYA, S., T. ISHIZAKI, AND N. WATANABE, *RHO EFFECTORS AND REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON*. FEBS LETT, 1997. **410**(1): p. 68-72.
64. NELSON, K.G., ET AL., *EPIDERMAL GROWTH FACTOR REPLACES ESTROGEN IN THE STIMULATION OF FEMALE GENITAL-TRACT GROWTH AND DIFFERENTIATION*. PROC NATL ACAD SCI U S A, 1991. **88**(1): p. 21-5.
65. OH, J.H., ET AL., *CHANGES IN GLYCOSAMINOGLYCANS AND RELATED PROTEOGLYCANS IN INTRINSICALLY AGED HUMAN SKIN IN VIVO*. EXP DERMATOL, 2011. **20**(5): p. 454-6.
66. PASONEN-SEPANEN, S., ET AL., *EGF UPREGULATES, WHEREAS TGF-BETA DOWNREGULATES, THE HYALURONAN SYNTHASES HAS2 AND HAS3 IN ORGANOTYPIC KERATINOCYTE CULTURES: CORRELATIONS WITH EPIDERMAL PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION*. J INVEST DERMATOL, 2003. **120**(6): p. 1038-44.
67. PIENIMAKI, J.P., ET AL., *EPIDERMAL GROWTH FACTOR ACTIVATES HYALURONAN SYNTHASE 2 IN EPIDERMAL KERATINOCYTES AND INCREASES PERICELLULAR AND INTRACELLULAR HYALURONAN*. J BIOL CHEM, 2001. **276**(23): p. 20428-35.
68. POUYSSEUR, J., V. VOLMAT, AND P. LENORMAND, *FIDELITY AND SPATIO-TEMPORAL CONTROL IN MAP KINASE (ERKS) SIGNALING*. BIOCHEM PHARMACOL, 2002. **64**(5-6): p. 755-63.

69. PUNNONEN, R., P. VAAJALAHTI, AND K. TEISALA, *LOCAL OESTRIOL TREATMENT IMPROVES THE STRUCTURE OF ELASTIC FIBERS IN THE SKIN OF POSTMENOPAUSAL WOMEN*. ANN CHIR GYNAECOL SUPPL, 1987. **202**: P. 39-41.
70. PUTNAM, A.J., ET AL., *SRC, PKC α , AND PKC δ ARE REQUIRED FOR ALPHAV β 3 INTEGRIN-MEDIATED METASTATIC MELANOMA INVASION*. CELL COMMUN SIGNAL, 2009. **7**: P. 10.
71. REENSTRA, W.R., M. YAAR, AND B.A. GILCHREST, *EFFECT OF DONOR AGE ON EPIDERMAL GROWTH FACTOR PROCESSING IN MAN*. EXP CELL RES, 1993. **209**(1): P. 118-22.
72. RITTIE, L., ET AL., *DECREASED CONTRACTION OF GLYCATED COLLAGEN LATTICES COINCIDES WITH IMPAIRED MATRIX METALLOPROTEINASE PRODUCTION*. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN, 1999. **264**(2): P. 488-92.
73. ROBEY, E., ET AL., *AN ACTIVATED FORM OF NOTCH INFLUENCES THE CHOICE BETWEEN CD4 AND CD8 T CELL LINEAGES*. CELL, 1996. **87**(3): P. 483-92.
74. ROCK, K. AND J.W. FISCHER, *[ROLE OF THE EXTRACELLULAR MATRIX IN EXTRINSIC SKIN AGING]*. HAUTARZT, 2011. **62**(8): P. 591-7.
75. ROSHAN, S., S. NADER, AND P. ORLANDER, *REVIEW: AGEING AND HORMONES*. EUR J CLIN INVEST, 1999. **29**(3): P. 210-3.
76. SATOR, P.G., ET AL., *A PROSPECTIVE, RANDOMIZED, DOUBLE-BLIND, PLACEBO-CONTROLLED STUDY ON THE INFLUENCE OF A HORMONE REPLACEMENT THERAPY ON SKIN AGING IN POSTMENOPAUSAL WOMEN*. CLIMACTERIC, 2007. **10**(4): P. 320-34.
77. SATOR, P.G., ET AL., *THE INFLUENCE OF HORMONE REPLACEMENT THERAPY ON SKIN AGEING: A PILOT STUDY*. MATURITAS, 2001. **39**(1): P. 43-55.
78. SAVVAS, M., ET AL., *TYPE III COLLAGEN CONTENT IN THE SKIN OF POSTMENOPAUSAL WOMEN RECEIVING OESTRADIOL AND TESTOSTERONE IMPLANTS*. BR J OBSTET GYNAECOL, 1993. **100**(2): P. 154-6.
79. SCHOLZEN, T. AND J. GERDES, *THE KI-67 PROTEIN: FROM THE KNOWN AND THE UNKNOWN*. J CELL PHYSIOL, 2000. **182**(3): P. 311-22.
80. SCHWARTZ, E., *CONNECTIVE TISSUE ALTERATIONS IN THE SKIN OF ULTRAVIOLET IRRADIATED HAIRLESS MICE*. J INVEST DERMATOL, 1988. **91**(2): P. 158-61.
81. SHENG, W., ET AL., *THE ROLES OF VERSICAN V1 AND V2 ISOFORMS IN CELL PROLIFERATION AND APOPTOSIS*. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, 2005. **16**(3): P. 1330-40.
82. SHIRAHA, H., ET AL., *AGING FIBROBLASTS PRESENT REDUCED EPIDERMAL GROWTH FACTOR (EGF) RESPONSIVENESS DUE TO PREFERENTIAL LOSS OF EGF RECEPTORS*. J BIOL CHEM, 2000. **275**(25): P. 19343-51.
83. SHUSTER, S., M.M. BLACK, AND E. MCVITIE, *THE INFLUENCE OF AGE AND SEX ON SKIN THICKNESS, SKIN COLLAGEN AND DENSITY*. BR J DERMATOL, 1975. **93**(6): P. 639-43.
84. SIMPSON, R.M., ET AL., *AGE-RELATED CHANGES IN PERICELLULAR HYALURONAN ORGANIZATION LEADS TO IMPAIRED DERMAL FIBROBLAST TO MYOFIBROBLAST DIFFERENTIATION*. AM J PATHOL, 2009. **175**(5): P. 1915-28.
85. SIMPSON, R.M., ET AL., *AGING FIBROBLASTS RESIST PHENOTYPIC MATURATION BECAUSE OF IMPAIRED HYALURONAN-DEPENDENT CD44/EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR SIGNALING*. AM J PATHOL, 2010. **176**(3): P. 1215-28.
86. SPICER, A.P., ET AL., *CHROMOSOMAL LOCALIZATION OF THE HUMAN AND MOUSE HYALURONAN SYNTHASE GENES*. GENOMICS, 1997. **41**(3): P. 493-7.
87. STERN, R., *HYALURONAN CATABOLISM: A NEW METABOLIC PATHWAY*. EUR J CELL BIOL, 2004. **83**(7): P. 317-25.
88. STERN, R., *HYALURONAN CATABOLISM: A NEW METABOLIC PATHWAY*. EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, 2004. **83**(7): P. 317-25.
89. STERN, R., *COMPLICATED HYALURONAN PATTERNS IN SKIN: ENLIGHTENMENT BY UVB?* J INVEST DERMATOL, 2007. **127**(3): P. 512-3.
90. STERN, R., A.A. ASARI, AND K.N. SUGAHARA, *HYALURONAN FRAGMENTS: AN INFORMATION-RICH SYSTEM*. EUR J CELL BIOL, 2006. **85**(8): P. 699-715.
91. STERN, R. AND H.I. MAIBACH, *HYALURONAN IN SKIN: ASPECTS OF AGING AND ITS PHARMACOLOGIC MODULATION*. CLIN DERMATOL, 2008. **26**(2): P. 106-22.
92. STUHLMEIER, K.M. AND C. POLLASCHEK, *DIFFERENTIAL EFFECT OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA (TGF- β) ON THE GENES ENCODING HYALURONAN SYNTHASES AND UTILIZATION OF THE P38 MAPK PATHWAY IN TGF- β -INDUCED HYALURONAN SYNTHASE 1 ACTIVATION*. J BIOL CHEM, 2004. **279**(10): P. 8753-60.
93. SUDEL, K.M., ET AL., *TIGHT CONTROL OF MATRIX METALLOPROTEINASE-1 ACTIVITY IN HUMAN SKIN*. PHOTOCHEM PHOTOBIO, 2003. **78**(4): P. 355-60.
94. TAKAHASHI, M., ET AL., *PLASMA LEPTIN LEVELS AND BODY FAT DISTRIBUTION*. HORM METAB RES, 1996. **28**(12): P. 751-2.

95. TAMMI, R., ET AL., *HYALURONAN SYNTHASE INDUCTION AND HYALURONAN ACCUMULATION IN MOUSE EPIDERMIS FOLLOWING SKIN INJURY*. J INVEST DERMATOL, 2005. **124**(5): p. 898-905.
96. TAMMI, R.H. AND M.I. TAMMI, *HYALURONAN ACCUMULATION IN WOUNDED EPIDERMIS: A MEDIATOR OF KERATINOCYTE ACTIVATION*. J INVEST DERMATOL, 2009. **129**(8): p. 1858-60.
97. TERMEER, C., ET AL., *OLIGOSACCHARIDES OF HYALURONAN ACTIVATE DENDRITIC CELLS VIA TOLL-LIKE RECEPTOR 4*. J EXP MED, 2002. **195**(1): p. 99-111.
98. TOOLE, B.P., *HYALURONAN: FROM EXTRACELLULAR GLUE TO PERICELLULAR CUE*. NAT REV CANCER, 2004. **4**(7): p. 528-39.
99. TOOLE, B.P., *HYALURONAN: FROM EXTRACELLULAR GLUE TO PERICELLULAR CUE*. NATURE REVIEWS. CANCER, 2004. **4**(7): p. 528-39.
100. TOOLE, B.P. AND V.C. HASCALL, *HYALURONAN AND TUMOR GROWTH*. AM J PATHOL, 2002. **161**(3): p. 745-7.
101. TRAUTINGER, F., *MECHANISMS OF PHOTODAMAGE OF THE SKIN AND ITS FUNCTIONAL CONSEQUENCES FOR SKIN AGEING*. CLIN EXP DERMATOL, 2001. **26**(7): p. 573-7.
102. TSUKAHARA, K., ET AL., *OVARECTOMY IS SUFFICIENT TO ACCELERATE SPONTANEOUS SKIN AGEING AND TO STIMULATE ULTRAVIOLET IRRADIATION-INDUCED PHOTOAGEING OF MURINE SKIN*. BR J DERMATOL, 2004. **151**(5): p. 984-94.
103. UITTO, J., *UNDERSTANDING PREMATURE SKIN AGING*. N ENGL J MED, 1997. **337**(20): p. 1463-5.
104. UZUKA, M., ET AL., *INDUCTION OF HYALURONIC ACID SYNTHETASE BY ESTROGEN IN THE MOUSE SKIN*. BIOCHIM BIOPHYS ACTA, 1981. **673**(4): p. 387-93.
105. VAN LEEUWEN, F.N., ET AL., *LYSOPHOSPHATIDIC ACID: MITOGEN AND MOTILITY FACTOR*. BIOCHEM SOC TRANS, 2003. **31**(Pt 6): p. 1209-12.
106. VARANI, J., ET AL., *INHIBITION OF TYPE I PROCOLLAGEN PRODUCTION IN PHOTODAMAGE: CORRELATION BETWEEN PRESENCE OF HIGH MOLECULAR WEIGHT COLLAGEN FRAGMENTS AND REDUCED PROCOLLAGEN SYNTHESIS*. J INVEST DERMATOL, 2002. **119**(1): p. 122-9.
107. VARANI, J., ET AL., *REDUCED FIBROBLAST INTERACTION WITH INTACT COLLAGEN AS A MECHANISM FOR DEPRESSED COLLAGEN SYNTHESIS IN PHOTODAMAGED SKIN*. J INVEST DERMATOL, 2004. **122**(6): p. 1471-9.
108. VARANI, J., ET AL., *INHIBITION OF TYPE I PROCOLLAGEN SYNTHESIS BY DAMAGED COLLAGEN IN PHOTOAGED SKIN AND BY COLLAGENASE-DEGRADED COLLAGEN IN VITRO*. AM J PATHOL, 2001. **158**(3): p. 931-42.
109. VARANI, J., ET AL., *INHIBITION OF TYPE I PROCOLLAGEN SYNTHESIS BY DAMAGED COLLAGEN IN PHOTOAGED SKIN AND BY COLLAGENASE-DEGRADED COLLAGEN IN VITRO*. THE AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, 2001. **158**(3): p. 931-42.
110. VERDIER-SEVRAIN, S., F. BONTE, AND B. GILCHREST, *BIOLOGY OF ESTROGENS IN SKIN: IMPLICATIONS FOR SKIN AGING*. EXP DERMATOL, 2006. **15**(2): p. 83-94.
111. VERDIER-SEVRAIN, S., ET AL., *ESTRADIOL INDUCES PROLIFERATION OF KERATINOCYTES VIA A RECEPTOR MEDIATED MECHANISM*. FASEB J, 2004. **18**(11): p. 1252-4.
112. VERZIJL, N., ET AL., *AGE-RELATED ACCUMULATION OF MAILLARD REACTION PRODUCTS IN HUMAN ARTICULAR CARTILAGE COLLAGEN*. THE BIOCHEMICAL JOURNAL, 2000. **350 Pt 2**: p. 381-7.
113. VON WNUCK LIPINSKI, K., ET AL., *INTEGRIN-MEDIATED TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION OF INHIBITOR OF APOPTOSIS PROTEINS PROTECTS SMOOTH MUSCLE CELLS AGAINST APOPTOSIS INDUCED BY DEGRADED COLLAGEN*. CIRC RES, 2006. **98**(12): p. 1490-7.
114. VON WNUCK LIPINSKI, K., ET AL., *DEGRADED COLLAGEN INDUCES CALPAIN-MEDIATED APOPTOSIS AND DESTRUCTION OF THE X-CHROMOSOME-LINKED INHIBITOR OF APOPTOSIS (XIAP) IN HUMAN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS*. CARDIOVASC RES, 2006. **69**(3): p. 697-705.
115. WEBBER, J., ET AL., *HYALURONAN ORCHESTRATES TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA1-DEPENDENT MAINTENANCE OF MYOFIBROBLAST PHENOTYPE*. J BIOL CHEM, 2009. **284**(14): p. 9083-92.
116. WEBER, S., ET AL., *GENOTYPING OF HUMAN PLATELET ANTIGEN-1 BY GENE AMPLIFICATION AND LABELLING IN ONE SYSTEM AND AUTOMATED FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY*. BR J HAEMATOL, 2002. **116**(4): p. 839-43.
117. WEIGEL, P.H., V.C. HASCALL, AND M. TAMMI, *HYALURONAN SYNTHASES*. J BIOL CHEM, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
118. WENK, J., ET AL., *UV-INDUCED OXIDATIVE STRESS AND PHOTOAGING*. CURR PROBL DERMATOL, 2001. **29**: p. 83-94.
119. WHITE, D.P., P.T. CASWELL, AND J.C. NORMAN, *ALPHA V BETA3 AND ALPHA5BETA1 INTEGRIN RECYCLING PATHWAYS DICTATE DOWNSTREAM RHO KINASE SIGNALING TO REGULATE PERSISTENT CELL MIGRATION*. J CELL BIOL, 2007. **177**(3): p. 515-25.

120. WIGGIN, G.R., ET AL., *MSK1 AND MSK2 ARE REQUIRED FOR THE MITOGEN- AND STRESS-INDUCED PHOSPHORYLATION OF CREB AND ATF1 IN FIBROBLASTS*. MOL CELL BIOL, 2002. **22**(8): P. 2871-81.
121. WIGHT, T.N., *VERSICAN: A VERSATILE EXTRACELLULAR MATRIX PROTEOGLYCAN IN CELL BIOLOGY*. CURR OPIN CELL BIOL, 2002. **14**(5): P. 617-23.
122. WIGHT, T.N., *VERSICAN: A VERSATILE EXTRACELLULAR MATRIX PROTEOGLYCAN IN CELL BIOLOGY*. CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, 2002. **14**(5): P. 617-23.
123. WLASCHEK, M., ET AL., *SOLAR UV IRRADIATION AND DERMAL PHOTOAGING*. J PHOTOCHEM PHOTOBIO B, 2001. **63**(1-3): P. 41-51.
124. WU, Y., ET AL., *VERSICAN PROTECTS CELLS FROM OXIDATIVE STRESS-INDUCED APOPTOSIS*. MATRIX BIOLOGY : JOURNAL OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR MATRIX BIOLOGY, 2005. **24**(1): P. 3-13.
125. WU, Y.J., ET AL., *THE INTERACTION OF VERSICAN WITH ITS BINDING PARTNERS*. CELL RES, 2005. **15**(7): P. 483-94.
126. YANAGISHITA, M., *ISOLATION OF PROTEOGLYCANS FROM CELL CULTURES AND TISSUES*. METHODS MOL BIOL, 2001. **171**: P. 3-8.
127. ZHANG, B., ET AL., *A HIGHLY EFFICIENT AND CONSISTENT METHOD FOR HARVESTING LARGE VOLUMES OF HIGH-TITRE LENTIVIRAL VECTORS*. GENE THER, 2001. **8**(22): P. 1745-51.

12 APPENDIX

12.1 LÖSUNGEN

12.1.1 *ELUTIONSPUFFER*

0,1 M Tris

0,1 M Na-Acetat

0,025% (3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat) (CHAPS)

12.1.2 *QUELLPUFFER*

0,1 M Tris

0,1 m Na-Acetat

0,02% NaN₃

pH 7,3 (mit Essigsäure anpassen)

12.1.3 *LAUFPUFFER*

0,5M Acetat

0,02%NaN₃

0,025 CHAPS

12.1.4 *PRONASE PUFFER*

100mmol/L Tris-HCl, pH 8,1

1mmol/L CaCl₂

1500 U/ml heparin

12.1.5 *PBS*

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

1,5 mM KH₂PO₄

8,3 mM Na₂HPO₄ pH 7,4

12.1.6 *TBST*

100mM Tris HCL pH 7,4

1,5mM NaCl

0,1% Tween

12.1.7 RIPA

50mM Tris-HCl pH 7.4
150mM NaCl
1% Triton X-100
1% Sodium Deoxycholat
0,1% SDS

12.1.8 2X LÄMMLI

150 mM Tris-base pH 7
20% Glycerol
4% SDS
8% Mercaptoethanol

12.1.9 BLOCKIERLÖSUNG

2% BSA
10% FCS
In 1x PBS

12.1.10 MEDIUM 1

17,6 ml MEM 10x
5,10 ml NaHCO₃ 7,5%
0,88 ml L-Glutamin (Endkonzentration 1,76mM)
0,88 ml Natriumpyruvat (Endkonzentration 0,88 mM)
0,88 ml NEA (endkonzentration 0,88x)
0,088 ml Penicillin-Streptomycin (Endkonzentration 8,8U/8,8µg/ml)
75,0 ml dH₂O

12.1.11 MEDIUM 2

50 ml MEM 25mM Hepes
0,5 ml L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM)
0,5 ml Natriumpyruvat (Endkonzentration 1 mM)
0,5 ml NEA (Endkonzentration 1x)
0,1 ml Penicillin-Streptomycin (Endkonzentration 20U/20µg/ml)
5 ml FKS (Endkonzentration 10%)

12.1.12 MEDIUM 3

3,22 ml Medium 1

0,63 ml FKS

0,2 ml 0,1N NaOH

0,2 ml Medium 2

12.2 PRIMER

<u>Gene</u>	<u>Primer Sequenz</u>
humanes CD44	f 5'-GCTATTGAAAGCCTTGCAGAG-3' r 5'-CGCAGATCGATTTGAATATAACC-3'
humanes COX2	f 5'-TGAGTGTGGGATTTGACCG-3' r 5'-TGTGTTTGGAGTGGGTTTCA-3'
humanes EGF	f 5'-AGTTTTTCTGAATGGGTCAAGG-3' r 5'-TCCAATTTATTGCCATTCCAG-3'
humanes GAPDH	f 5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' r 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'
humanes HAS1	f 5'- TACAACCAGAAGTTCCTGGG -3' r 5'- CTGGAGGTGTA CTTGGTAGC-3'
humanes HAS2	f 5'-GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA-3' r 5'- TCCAACCATGGGATCTTCTT-3'
humanes HAS3v1	f 5'- GAGATGTCCAGATCCTCAACAA-3' r 5'- CCCACTAATACTGACACAC-3'
humanes HYAL1	f 5'-CCAAGGAATCATGTCAGGCCATCAA-3' r 5'-CCCACTGGTCACGTTTCAGG-3'
humanes HYAL2	f 5'-GGCTTAGTGAGATGGACCTC-3' r 5'-CCGTGTCAGGTAATCTTTGAG-3'
humanes RHAMM	f 5'-GAATATGAGAGCTCTAAGCCTG-3' r 5'-CCATCATACTCCTCATCTTTGTC-3'
humanes Versican pan	f 5'-AGACTGTCAGATATCCCATCC-3' r 5'-AATCCATAAGTCCTGACTCCT-3'

humanes Versican V1	f 5'-CGTCGAATGAGTGATTTGAG-3' r 5'-TTTCAGCCATTAGATCATGCAC-3'
humanes Versican V2	f 5'-AAGACAGGACCTGATCGCT-3' r 5'-AGTGGCTCCATTACGACAGG-3'
humanes Versican V3	f 5'-ACGACCTGATCGCTGCAA-3' r 5'-CAAGTGGCTCCATTACGACA-3'
humanes Versican Vo	f 5'-ACCAGGACCTGATCGCTGCAA-3' r 5'-GTTCAATTTGCAGCGATCAG-3'
murines CD44	f 5'-CAAGTTTTGGTGGCACACAG-3' r 5'-CTGTAGCGGCCATTTTTCTC-3'
murines COX2	f 5'-CCGGACTGGATTCTATGGTG-3' r 5'-CCTTGAAGTGGGTCAGGATG-3'
murines EGF	f 5'-GCCACGCTTACATTCATTCC-3' r 5'-ATCGCCTTGCTTTTCAACAC-3'
murines E₂R α	f 5'-AGCTGCTCCTCCACTTGGT-3' r 5'-GGCGTCGATTGTCAGAATTAG-3'
murines E₂R β	f 5'-TACGGTGTCTGGTCCTGTGA-3' r 5'-TACACTGATTCGTGGCTGGA-3'
murines GAPDH	f 5'-TGGCAAAGTGGAGATTGTTGCC-3' r 5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'
murines HAS1	f 5'-TATGCTACCAAGTATACCTCG-3' r 5'-TCTCGGAAGTAAGATTTGGAC-3'
murines HAS2	f 5'-CGGTCTCTCAAATTCATCTG-3' r 5'-ACAATGCATCTTGTTTCAGCTC-3'
murines HAS3v1	f 5'-GATGTCCAAATCCTCAACAAG-3' r 5'-CCCACTAATACATTGCACAC-3'
murines HYAL1	f 5'-AAGTACCAAGGAATCATGCC-3' r 5'-CTCAGGATAACTTGGATGGC-3'
murines HYAL2	f 5'-GGTGGACCTTATCTCTACCAT-3' r 5'-TATTGGCAGGTCTCCATACTT-3'
murines IL6	f 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGGA-3' r 5'-GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA-3'

murines Ki-67	f 5'-CCAGCTGTCCTCAAGACAATC-3' r 5'-CACTGGAAGTCCTGCCTGAT-3'
murines Mac2	f 5'-TGAGAGTGGCAAACCATTCA-3' r 5'-GTCACCACTGATCCCCAGTT-3'
murines MCP1 (CcL2)	f 5'-CCCAATGAGTAGGCTGGAGA-3' r 5'-TCTGGACCCATTCTTCTTG-3'
murines RHAMM	f 5'-GCCACTCAGAAGGACCTCAC-3' r 5'-TGCACAGCTAATTTCTTGGATG-3'
murines TGFβ1	f 5'-CTAATGGTGGACCGCAACA-3' r 5'-ACTGCTTCCCGAATGTCTGA-3'
murines TGFβ2	f 5'-CGAGGAGTACTACGCCAAGG-3' r 5'-GTAGAAAGTGGGCGGGATG-3'
murines TGFβ3	f 5'-TTCGACATGATCCAGGGACT-3' r 5'-TCTCCACTGAGGACACATTGA-3'
murines TNFα	f 5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3' r 5'-AGCTGCTCCTCCACTTGGT-3'
murines TPX2	f 5'-TCCCTGGATGCTAAGAGAGC-3' r 5'-TTTCAACAGAGGCAACATGG-3'
murines Versican pan	f 5'-ACCATGTCACTGGCTGTGG-3' r 5'-AGCGGCAAAGTTCAGAGTGT-3'
murines Versican V1	f 5'-GCCTACTGCTTTAAACGTCGA-3' r 5'-GCAAACAGATCATGCAGTGG-3'
murines Versican V2	f 5'-ACAGGACCTGATCTCTGCAAAA-3' r 5'-CCATTCCGACAAGGGTTAGA-3'
murines Versican V3	f 5'-ACGACCTGATCTCTGCAA-3' r 5'-CCATTCCGACAAGGGTTAGA-3'
murines Versican Vo	f 5'-AAGACAGGTCGATTGAGTGATAT-3' r 5'-GCAAACAGATCATGCAGTGG-3'

13 DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. J.W. Fischer für die Überlassung des interessanten Themas, die fortwährende Unterstützung und die vielen anregenden und motivierenden Diskussionen. Insbesondere möchte ich mich zudem für die zahlreichen interessanten und lehrreichen Erfahrungen im In- und Ausland bedanken, die mir in den letzten vier Jahren ermöglicht wurden.

Allen Kollegen an den Instituten in Düsseldorf und Essen möchte ich für die fachliche Unterstützung im Labor und das wirklich großartige Arbeitsklima danken.

Bei Frau Sieberg, Frau Lohmann und Frau Montag bedanke ich mich für die geduldige und immer freundliche Unterstützung bei der Bewältigung von administrativen und organisatorischen Dingen im Unialltag.

Bettina Mause, Annika Zimmermann und Tanja Lehmann danke ich für die experimentelle Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Labor.

Ariane Melchior Becker und Till Freudenberger möchte ich für all die Antworten auf meine Fragen, die Hilfe und vor allem auch für die netten Gespräche danken.

Ein herzlicher Dank an Sören Twarock, Julia Müller, Johanna Hoffmann und Inga Kretschmer für die immense Hilfe im Labor, sowie für die schöne, turbulente und lustige Zeit. So viele Erinnerungen an gemeinsame Erlebnisse bringen mich immer wieder zum Lachen. Eure Freundschaft hat diese Zeit besonders gemacht!

Last but definitely not least, möchte ich ein weiteres großes Dankeschön an meine Eltern, meine Großmütter und meinen Freund Andreas Vogt aussprechen. Es erfüllt mich eine unaussprechlich große Dankbarkeit, wenn ich an all die vielen Gespräche und Situationen in den letzten Jahren denke, bei denen ihr mir mit großer Geduld, Anteilnahme und Aufmunterung beigestanden habt. Ihr seid die Besten und ohne eure Unterstützung hätte ich so manche Situation sicherlich nicht gemeistert!

14 LEBENS LAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

14.1 VERÖFFENTLICHUNGEN

14.1.1 FACHZEITSCHRIFTEN

Röck K., Meusch M., Fuchs N., Tigges J., Zipper P., Fritsche E., Krutmann J., Homey B., Reifemberger J., Fischer J.W. Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging by release of EGF from keratinocytes. *J Biol Chem. in 2nd revision*

Freudenberger T., Röck K., Dai G., Dorn S., Mayer P., Heim H.K., Fischer J.W. Estradiol inhibits hyaluronic acid synthase expression in human vascular smooth muscle cells. 2011 Nov;106(6):1099-109. *Basic Res Cardiol.*

Röck K., Grandoch M., Majora M., Krutmann J., Fischer J.W. Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to UVB: New insights into mechanisms of matrix remodelling. 2011 May 20;286(20):18268-76 *J Biol Chem.*

Nagy N., Freudenberger T., Melchior-Becker A., Röck K., Ter Braak M., Jastrow H., Kinzig M., Lucke S., Suvorava T., Kojda G., Weber A.A., Sörgel F., Levkau B., Ergün S., Fischer J.W. Inhibition of hyaluronan synthesis accelerates murine atherosclerosis: novel insights into the role of hyaluronan synthesis. 2010 Nov;122(22):2313-22, *Circulation.*

Röck K., Fischer K., Fischer J.W. Hyaluronan Used for Intradermal Injections Is Incorporated into the Pericellular Matrix and Promotes Proliferation in Human Skin Fibroblasts in vitro. *Dermatology.*

Twarock S., Röck K., Sarbia M., Weber A.A., Jänicke R.U., Fischer J.W., Synthesis of hyaluronan in oesophageal cancer cells is uncoupled from the prostaglandin-cAMP pathway. 2009 May; 157(2):234-43, *Br J Pharmacol.*

Schmidt S., Röck K., Sahre M., Burkhardt O., Brunner M., Lobmeyer M.T., Derendorf H., Effect of protein binding on the pharmacological activity of highly bound antibiotics. 2008 Nov; 52(11):3994-4000, *Antimicrob Agents Chemother.*

14.1.2 REVIEWS

Röck K., Fischer J.W. Die Rolle der extrazellulären Matrix in der extrinsischen Hautalterung. 2011 Aug;62(8):591-7. *Der Hautarzt*

14.1.3 VERÖFFENTLICHTE KONGRESSBEITRÄGE

Röck K., Majora M., Krutman J., Fischer J.W. UVB-induced cleavage of collagen causes inhibition of hyaluronan synthesis: New insights into matrix remodelling caused by extrinsic aging. Mar 2011 *Volume 331 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Röck K., Meusch M., Fuchs N., Zipper P., Tigger J., Homey B., Fritsche E., Reifenberger J., Fischer J.W. Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photo aging by release of EGF from keratinocytes. Mar 2011 *Volume 331 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Freudenberger T., Röck K., Dai G., Mayer P., Heim H.K., Schrör K., Fischer J.W. Estradiol-mediated ERalpha-dependent inhibition of HAS1-mRNA-expression is causally involved in inhibition of proliferation in vascular smooth muscle cells. Mar 2011 *Volume 331 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Röck K., Meusch M., Fuchs N., Zipper P., Freudenberger T., Krutmann J., Reifenberger J., Fischer J.W. Estrogen augments dermal hyaluronan and proteoglycans during extrinsic skin ageing in mice. Mar 2010 *Volume 381 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

Röck K., Rosen M., Fischer J.W., Insulin like growth factor and tumor necrosis factor alpha induce hyaluronan synthesis in human vascular smooth muscle cells Apr 2009 *Volume 379 Suppl.1 Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*

14.1.4 PATENTE

Röck K., Fischer J.W., deutsche Patentanmeldung DE 10 2010 013 281.0 (2010): Neue Strategien zur Verminderung der Hautalterung.

14.2 AUSGEWÄHLTE ORIGINALARBEITEN UND MANUSKRIPTE

Collagen Fragments Inhibit Hyaluronan Synthesis in Skin Fibroblasts in Response to Ultraviolet B (UVB)

NEW INSIGHTS INTO MECHANISMS OF MATRIX REMODELING^{*,§}

Received for publication, November 8, 2010, and in revised form, March 14, 2011. Published, JBC Papers in Press, March 17, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.201665

Katharina Röck[‡], Maria Grandoch[‡], Marc Majora[§], Jean Krutmann[§], and Jens W. Fischer^{‡1}

From the [‡]Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, 40225 Düsseldorf and the [§]IUF-Leibniz Institute for Environmental Medicine, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40021 Düsseldorf, Germany

UVB irradiation causes characteristic features of skin aging including remodeling of the dermal extracellular matrix. A key feature during this process is the up-regulation of matrix metalloproteinases and cleavage of collagen. Hyaluronic acid (HA), a major component of the dermal matrix, decreases after chronic UVB exposure. However, the factors that govern the decline of HA synthesis during the course of actinic aging are largely unknown. The aim of the present study was to explore whether collagen degradation causes inhibition of HA synthesis in human skin fibroblasts. After treatment of fibroblasts with collagen fragments (CF) *in vitro*, resolution of the actin cytoskeleton and inhibition of HA secretion occurred because of specific down-regulation of hyaluronan synthase 2 (HAS2) expression. The $\alpha_v\beta_3$ -agonist, RGDS, latrunculin A, and an inhibitor of Rho-activated kinase inhibited HAS2 expression. Conversely, blocking antibodies to $\alpha_v\beta_3$ abolished the down-regulation of HAS2 and the cytoskeletal effects. Furthermore, inhibition of cofilin phosphorylation in response to CF was prevented by $\alpha_v\beta_3$ -blocking antibodies. The key role of ERK signaling was shown by reduced nuclear accumulation of phosphoERK and of ELK-1 phosphorylation in response to CF. In addition, the ERK inhibitor PD98059 reduced HAS2 expression. Also, UVB irradiation of fibroblasts caused down-regulation of HAS2, which was sensitive to matrix metalloproteinase inhibitors and to $\alpha_v\beta_3$ -blocking antibodies. In conclusion, these data suggest that CF activate $\alpha_v\beta_3$ -integrins and in turn inhibit Rho kinase (ROCK) signaling and nuclear translocation of phosphoERK, resulting in reduced HAS2 expression. Therefore, a novel mechanism is presented how proteolytic collagen cleavage may inhibit HA synthesis in dermal fibroblasts during extrinsic skin aging.

UVB irradiation is a key factor during extrinsic skin aging. About 5% of the UVB light reaches the upper dermis and thereby also affects dermal fibroblasts (1). UVB-induced damage accumulates and causes pronounced changes in the appearance and the structure of the skin (2). A hallmark of skin aging

is cleavage of collagen by matrix metalloproteinases (MMPs)² that is not completely reconstituted by *de novo* collagen synthesis (3). Instead the repeated damage of collagenous networks leaves the skin with accumulating micro defects that cause wrinkling of the skin and impaired elasticity in the long term (2). However, photoaging of the skin also affects the phenotype of embedded cells such as keratinocytes, fibroblasts, and dendritic cells, either by direct effects of irradiation on the cells or indirectly by the remodeled and aged ECM. In contrast to collagen, little is known about the molecular mechanisms that control the remodeling of other ECM molecules within the dermal matrix in response to UVB irradiation. The present study focuses on hyaluronan (HA), which is a major component of the dermal ECM (4). HA is an unbranched polymeric carbohydrate consisting of alternating disaccharide units (D-glucuronic acid $\beta(1-3)$ -D-N-acetyl-glucosamine $\beta(1-4)$). HA is synthesized at the plasma membrane by HA synthases 1–3 (HAS1–3) that assemble activated UDP-glucosamine and glucuronic acid and extrude the growing HA polymer into the extracellular compartment (5). HA serves as a scaffold for the ECM because it allows multiple interactions with HA-binding proteins such as versican, tumor necrosis factor-stimulated gene 6, or serum proteins such as inter- α -trypsin inhibitor (6). Thereby HA is thought to critically determine the extracellular micromilieu and cellular phenotypes. Cellular signaling of HA is mediated by CD44 and RHAMM (receptor for hyaluronan-mediated motility), which are thought to mediate pro-migratory and pro-proliferative effects in fibroblasts (7, 8). On the organ level, HA is a major contributor to the water content of the skin, the turgidity, and the diffusion gradients (4). Loss of HA has been associated with skin aging (9–11). However, little is known about the molecular mechanisms that are responsible for the loss of HA during actinic aging. It has been described before that transforming growth factor β receptor II is down-regulated in the skin of chronically irradiated mice (12). It is therefore possible that decreased growth factor expression or growth factor signaling is an important mechanism of how the decline of HA production occurs. In line with this assumption is the fact that up to now, direct negative regulators of HA synthesis have not been identified in dermal fibroblasts. In the present study, the possibility was considered that cross-talk may exist between

* This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Collaborative Research Center (SFB) 728 (Grants TP C6 and TP C1).

§ The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1–3.

¹ To whom correspondence should be addressed: Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany. Tel.: 49-211-8112500; Fax: 49-211-8114781; E-mail: jens.fischer@uni-duesseldorf.de.

² The abbreviations used are: MMP, matrix metalloproteinases; CF, collagen fragments; ECM, extracellular matrix; HA, hyaluronic acid; HAS, hyaluronan synthase; HABP, HA-binding protein; CREB, cyclic AMP-response element-binding protein; ROCK, Rho kinase; p, phospho.

collagen fragmentation and loss of HA. Collagen fragments (CF) are known to be bioactive. In smooth muscle cells, CF cause cleavage of focal adhesion kinase (13) and inhibit apoptosis by activation of $\alpha_v\beta_3$ -integrins (14). Interestingly in skin fibroblasts, CF inhibit *de novo* collagen synthesis (15). Therefore, the specific aim was to investigate whether CF regulate HA synthesis in human dermal fibroblasts and thereby identify a possible link between UVB-induced collagen cleavage and loss of HA during actinic aging.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Reagents were obtained from the indicated sources: latrunculin A, Y27632, and lysophosphatidic acid from Sigma-Aldrich (Munich, Germany); *Streptomyces* hyaluronidase from MP Biomedicals Germany (Eschwege, Germany); $\alpha_v\beta_3$ -blocking antibody LM609 and the respective isotype control from Millipore (Schwalbach, Germany); MMP inhibitor I (300 nM/liter), anisomycin (10 μ M), and SP600125 (10 μ M) from Sigma-Aldrich; and PD98059 and SB203580 (1 μ M) from Merck (Darmstadt, Germany). Collagen neopeptides were detected by immunostaining using collagen 2 3/4C_{short} polyclonal rabbit antibody (IBEX; Mont Royal, Canada).

Cell Culture—Human dermal fibroblasts derived from male and female donors were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany) and maintained in monolayer cultures in Dulbecco's modified Eagle's Medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mmol/liter L-glutamine, and antibiotics (100 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin-G). The cells were maintained at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidified air.

Type I collagen gels (3.0 mg/ml collagen type I derived from bovine skin) were prepared as described previously (14) by neutralizing the collagen solution (PureCol[®] Advanced BioMatrix, Tucson, AZ) with DMEM and incubation at 37 °C for 24 h until complete polymerization. CF were prepared by digestion of the collagen gels with 2 mg/ml collagenase type 3 (Worthington Biochemical Corp.) at 37 °C for 30 min. Afterward, collagenase activity was inhibited by the addition of an equal volume of DMEM containing 10% FBS. The solution was diluted with DMEM to a final concentration of 125 μ g/ml CF.

Three-dimensional fibroblast cultures were prepared by seeding 100,000 cells into 500 μ l of the above described neutralized collagen solution. To prevent attachment to the dish, the cell suspension was incubated in mineral oil (Sigma-Aldrich) for 24 h and transferred to DMEM containing 10% FCS after polymerization. UVB irradiation of the cells was performed with a Bio-Sun irradiation system (Vilbert Lourmat; Munich, Germany) containing two 30-watt UVB sources (312 nm). Dermal equivalents were prepared as described previously (16). Fluorescence-assisted cell sorting (FACS) was performed using annexin V-Alexa Fluor 488 antibody (Cell Signaling Technology, Boston, MA) as described previously (17). Cells were gated according to their scatter properties, and the mean fluorescence of Alexa Fluor 488 was determined. As positive control, staurosporine (Sigma-Aldrich) was used.

Affinity Histochemistry—Cells were fixed in acid-formalin/ethanol (3.7% formaldehyde/PBS, 70% ethanol, and 5% glacial acetic acid, all v/v). After rinsing with PBS, cells were stained for

HA using a biotinylated HA-binding protein (bHABP, Seikagaku, Tokyo, Japan) followed by streptavidin-FITC (Dako, Carpinteria, CA) in PBS containing 1% bovine serum albumin as described previously (18). As negative control, cells were digested with *Streptomyces* hyaluronidase prior to staining, which abolished HA staining (data not shown). Imaging of the cells was performed using a Zeiss Axio Observer Z1 microscope and a 63 \times objective.

Immunocytochemistry—Cells were fixed in 3.7% formalin and permeabilized with 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). After rinsing with PBS, actin stress fibers were stained by FITC-phalloidin (Sigma-Aldrich; 1:1000). pERK was detected using pERK primary antibody (Cell Signaling Technology; 1:1000) followed by Cy3-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Nuclei were counterstained by Hoechst 33342 solution (Invitrogen; Darmstadt, Germany; 1:10000). Nuclear translocation of pERK was detected using a Zeiss LSM 700 microscope and a 63 \times objective (see Fig. 5C) or Zeiss Axio Observer Z1 ApoTome microscope and a 63 \times objective (supplemental Fig. S3).

Determination of the HA Concentration in Fibroblast Cell Culture Supernatants—HA released into the culture medium was measured with an HABP-based commercial kit according to the manufacturer's instructions (Corgenix, Broomfield, CO) 24 h after stimulation (19). The quantity of HA was calculated as the ratio of HA and total cellular protein.

Size Exclusion Chromatography of HA—Dermal fibroblasts were incubated with 20 μ Ci/ml [³H]glucosamine for 24 h in the presence and absence of collagen fragments. The conditioned, [³H]glucosamine-labeled medium was divided equally. One-half was digested with hyaluronidase (*Streptomyces* hyaluronidase, 0.5 units of enzyme/200 μ l). Subsequently, both samples were prepurified on a column of Sephadex G50 (Sigma-Aldrich) to separate non-incorporated [³H]glucosamine from the tritiated macromolecular fraction. Comparison of the relative molecular size of secreted HA was performed as described previously (20) using Sephacryl S-1000 (GE Healthcare; Munich, Germany). Only the hyaluronidase-sensitive counts that represent the [³H]glucosamine-labeled HA were plotted.

Real Time RT-PCR—Total RNA from fibroblasts was isolated using RNeasy total RNA kits (Qiagen; Hilden, Germany). The RNA concentration was determined via photometric measurement at 260/280. Total RNA (aliquots of 1000 ng) was transcribed into cDNA using the SuperScript III first strand synthesis system for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR, Invitrogen, Karlsruhe, Germany). To analyze the mRNA expression in human fibroblasts, primers were designed employing Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) based on published cDNA sequences. Primer sequences are given in Table 1.

Each real time RT-PCR was performed in triplicate, and the mean value was calculated. PCR was carried out using SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) as described (12). The 2^{(- $\Delta\Delta C(T)$)} method was used for comparison of the relative expression in RT-PCR between control and treated cells.

Immunoblotting—For Western blot analysis, whole cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose, and the following primary antibodies were used:

Collagen Fragments Inhibit Hyaluronan Synthesis

pERK1/2, ERK1/2, pELK-1, Cofilin, pCofilin, poly(ADP-ribose) polymerase, p38, and pp38 (Cell Signaling Technology) and β -tubulin (Sigma-Aldrich). They were detected by infrared fluorescent-coupled secondary antibodies allowing fluorescent detection on a LI-COR Odyssey infrared imaging system.

Statistical Analysis—All data sets were analyzed either by analysis of variance and the Bonferroni post hoc test or by Student's *t* test as appropriate. Data are presented as means \pm S.E. Statistical significance was assigned at the level of $p < 0.05$.

RESULTS

Collagen Fragments Inhibit HA Synthesis and HAS2 Expression—CF were generated by collagenase type 3 digestion of purified bovine collagen type 1. Skin fibroblasts were incubated with these CF for 24 h. In preliminary experiments (supplemental Fig. S1, A–D), a dose-response experiment using CF at 50–250 $\mu\text{g/ml}$ was performed, revealing slightly increased apoptosis starting at 250 $\mu\text{g/ml}$ as evidenced by annexin V FACS

analysis. Classical poly(ADP-ribose) polymerase cleavage was not detected up to 250 $\mu\text{g/ml}$. Fibroblast proliferation measured as [^3H]thymidine incorporation was suppressed starting at 150 $\mu\text{g/ml}$. Therefore, CF were used in all subsequent experiments at 125 $\mu\text{g/ml}$ to avoid anti-proliferative or pro-apoptotic effects. The morphology of fibroblast-treated CF (125 $\mu\text{g/ml}$) was dramatically changed, characterized by reduced spreading (Fig. 1A) and retraction. However, microscopic surveillance indicated recovery up to 96 h in cells after the addition of CF (supplemental Fig. S1D). Furthermore, pericellular HA strands were markedly reduced (Fig. 1B), and the amount of HA secreted into the conditioned medium was decreased. In addition, the size distribution of secreted HA was shifted to lower molecular mass as evidenced by Sephacryl S-1000 chromatography of [^3H]glucosamine-labeled HA. Analysis of the relative amount of HAS mRNA transcripts revealed that HAS2 was the prominent isoform, accounting for more than 95% of HAS transcripts (Fig. 1E). CF caused differential regulation of HAS isoenzymes, as indicated by increased HAS1 mRNA, decreased HAS2 mRNA, and unchanged HAS3 mRNA levels (Fig. 1F). Based on quantitative real time RT-PCR, HAS2 is the most abundant HAS isoform. Therefore, the data suggest that inhibition of HAS2 mRNA is responsible for decreased HA secretion in response to CF. HAS isoforms are thought to generate HA of different chain length. HAS2 and HAS1 synthesize higher molecular weight HA as compared with HAS3 (21). Therefore, the decrease of HAS2 expression likely also explains the loss of the high molecular weight fractions in the supernatants of CF-treated fibroblasts. However, in addition, the mRNA expression of hyaluronidases 1 and -2 was analyzed and revealed 2-fold increased hyaluronidase 2 mRNA (data not

TABLE 1
Primer sequences used for quantification of gene expression

Gene	Primer sequence
Human HAS1	5'-TACAACCAGAAGTTCCTGGG-3' 5'-CTGGAGGTGTAAGTGGTAGC-3'
Human HAS2	5'-GTGGATTATGTACAGGTTGTGA-3' 5'-TCCAACCATGGGATCTTCTT-3'
Human HAS3v1	5'-GAGATGTCCAGATCCTCAACAA-3' 5'-CCCCTAATACACTGCACAC-3'
Human Hyal1	5'-CCAAGGAATCATGTCCAGGCCATCAA-3' 5'-CCCCTAGTGCAGTTCAGG-3'
Human Hyal2	5'-GGCTTAGTGAGATGGACCTC-3' 5'-CCGTGTCAGGTAATCTTTGAG-3'
Human MMP1	5'-TGTGGTGTCTCACAGCTTCC-3' 5'-CTGGCTCCCATCATCTTC-3'
Human GAPDH	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3' 5'-TGAGGTCATGAAGGGGTC-3'

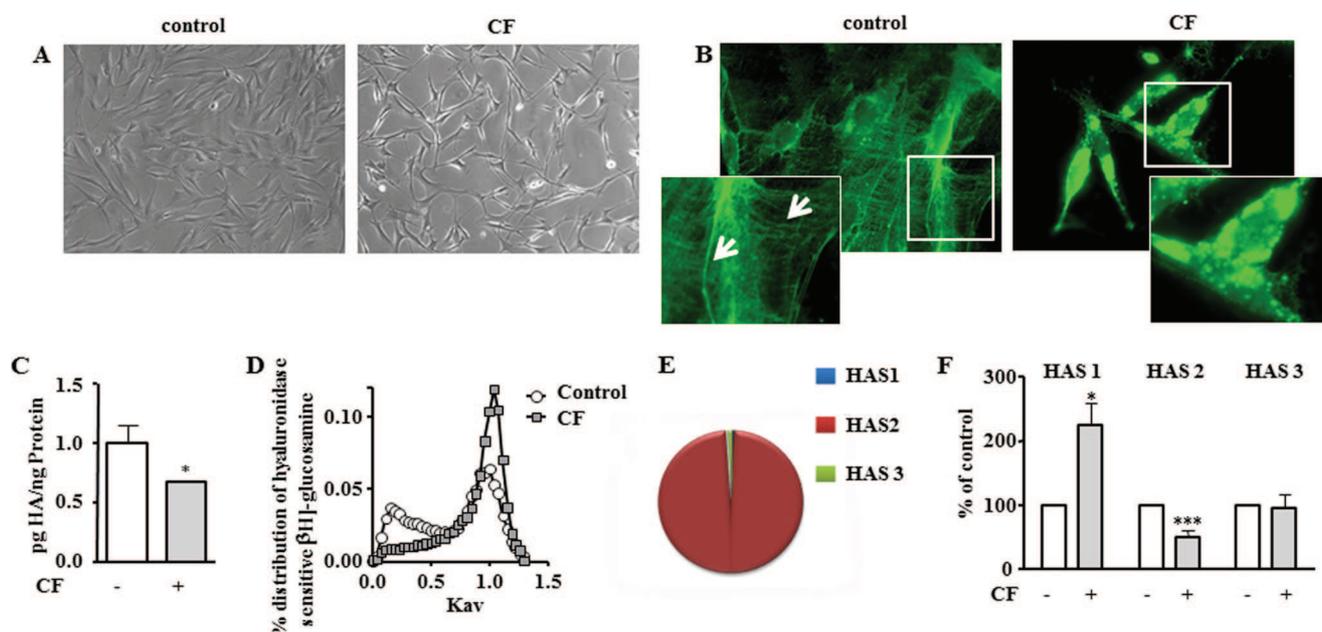


FIGURE 1. Inhibition of HA synthesis by CF. Human skin fibroblasts were incubated for 24 h with CF (125 $\mu\text{g/ml}$) generated by digestion of type I collagen gels. *A*, change in morphology of fibroblasts in response to CF, 63 \times magnification. *B*, pericellular HA was preserved by acid-formalin/ethanol fixation and stained with biotinylated HABP and streptavidin-FITC, 63 \times magnification; *insets*, at 200 \times magnification. *Arrows* point at strands of pericellular HA. *C*, HA secretion into the medium. *D*, molecular weight distribution of [^3H]glucosamine-labeled HA as determined by Sephacryl S1000 chromatography. *E*, pie chart of relative mRNA expression of HAS isoforms as determined by real time RT-PCR. *F*, regulation of HAS isoforms in response to CF as determined by real time RT-PCR; $n = 3$ –6, mean \pm S.E., *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.01$.

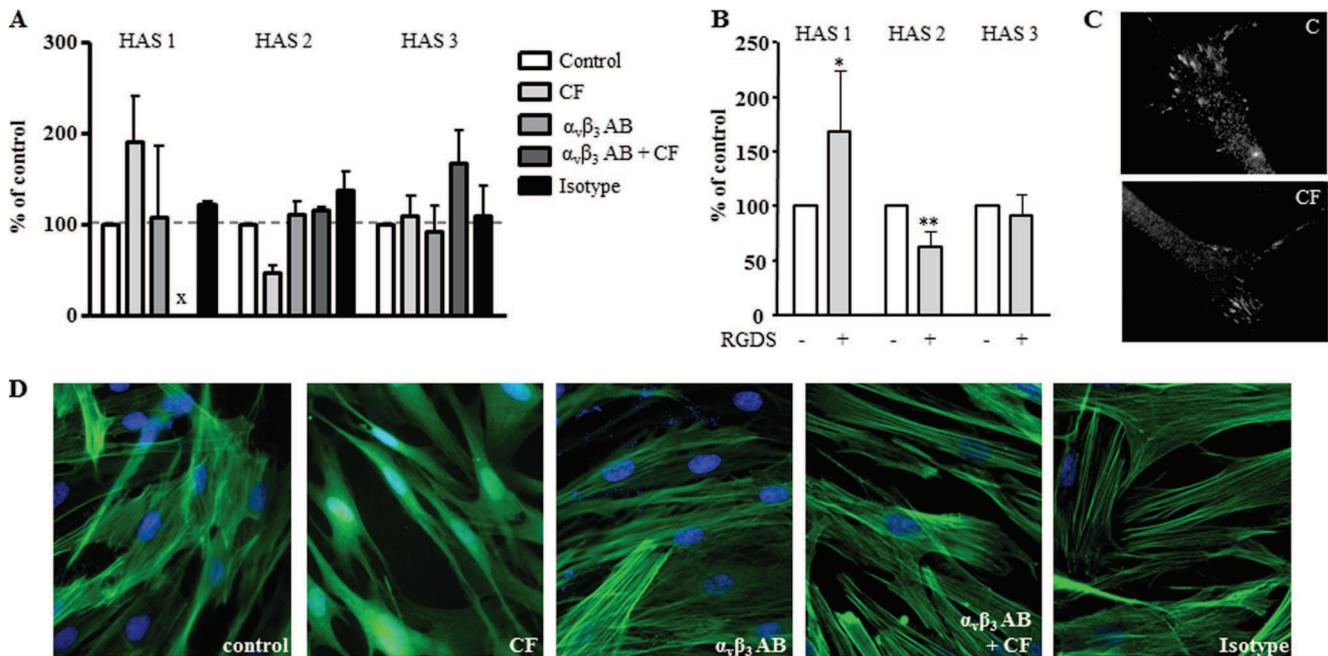


FIGURE 2. $\alpha_v\beta_3$ -Integrin activation mediates HAS regulation by CF. *A*, preincubation with the $\alpha_v\beta_3$ -blocking antibody LM609 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24 h) inhibited regulation of HAS isoforms by CF as determined by real time RT-PCR, *B*, HAS isoform expression in response to the $\alpha_v\beta_3$ -agonist RGDS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$); $n = 3-5$, mean \pm S.E., $*$, $p < 0.05$; x , not detectable. *C*, $\alpha_v\beta_3$ immunostaining of untreated and CF-treated fibroblasts at 24 h. *D*, actin stress fibers visualized by phalloidin staining; magnification 63 \times . Non-immune isotype IgG served as control.

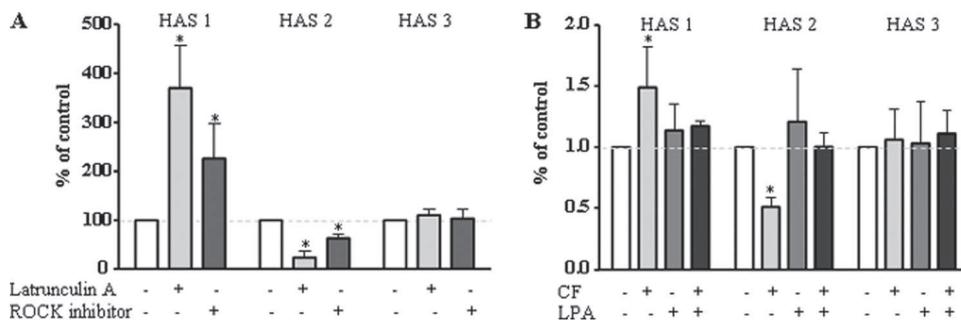


FIGURE 3. **Inhibition of ROCK regulates HAS expression.** mRNA expression in human fibroblasts was determined by real time RT-PCR. *A*, mRNA expression after incubation with latrunculin A (3 $\mu\text{mol}/\text{liter}$, 24 h) or the ROCK inhibitor Y27632 (10 $\mu\text{mol}/\text{liter}$, 24 h). *B*, the ROCK activator lysophosphatidic acid (LPA, 300 nmol/liter) plus or minus CF was added for 24 h; $n = 3-5$, mean \pm S.E., $*$, $p < 0.05$.

shown), hinting toward involvement of HA degradation in the molecular weight shift.

$\alpha_v\beta_3$ -Integrin Signaling Inhibits HAS2 Expression—Collagen fragments have been shown to activate $\alpha_v\beta_3$ -integrin signaling in vascular smooth muscle cells (22). Therefore, CF were used in the presence and absence of blocking antibodies to $\alpha_v\beta_3$. As shown in Fig. 2*A*, these blocking antibodies abolished both the CF-induced up-regulation of HAS1 and down-regulation of HAS2. Furthermore, the $\alpha_v\beta_3$ -agonist RGDS (23, 24) induced HAS1 and reduced HAS2 expression (Fig. 2*B*). Immunocytochemistry revealed expression of $\alpha_v\beta_3$ -integrin in a pattern resembling focal adhesions and was not changed by CF (Fig. 2*C*). CF also caused partial disruption of actin stress fibers, which underlies the morphological change presented in Fig. 1. Interestingly the changes of morphology and actin stress fibers were also prevented by preincubation with blocking $\alpha_v\beta_3$ -antibodies (Fig. 2*D*). Therefore, the data strongly suggested that $\alpha_v\beta_3$ -integrin signaling mediated the effects of CF on HAS expression, HA synthesis, and the actin cytoskeleton.

Inhibition of ROCK and ERK Signaling Mediates CF Effects on HAS2 Expression—Next the downstream effectors of $\alpha_v\beta_3$ -integrin signaling that might cause down-regulation of HAS2 were investigated. $\alpha_v\beta_3$ is known to signal through various pathways depending on the cell type and the experimental conditions (25–27). Because CF and $\alpha_v\beta_3$ had a pronounced effect on the cytoskeleton and HAS2, it was addressed whether these two effects were interrelated. Interestingly, disruption of the actin cytoskeleton by latrunculin A (28) resulted in the same pattern of HAS isoform expression as compared with CF (Fig. 3*A*). HAS1 was induced, HAS2 was inhibited, and HAS3 was unchanged by latrunculin A. Furthermore, the Rho kinase (ROCK) inhibitor Y27632 increased HAS1, decreased HAS2, and had no effect on HAS3 expression. A role of ROCK was further supported by the use of the ROCK activator lysophosphatidic acid (29, 30), which blocked the effect of CF on HAS expression (Fig. 3*B*). ROCK is known to cause via LIM-kinase the phosphorylation of cofilin (31), which in the phosphorylated state loses its actin-depolymerizing activity. Actin cyto-

Collagen Fragments Inhibit Hyaluronan Synthesis

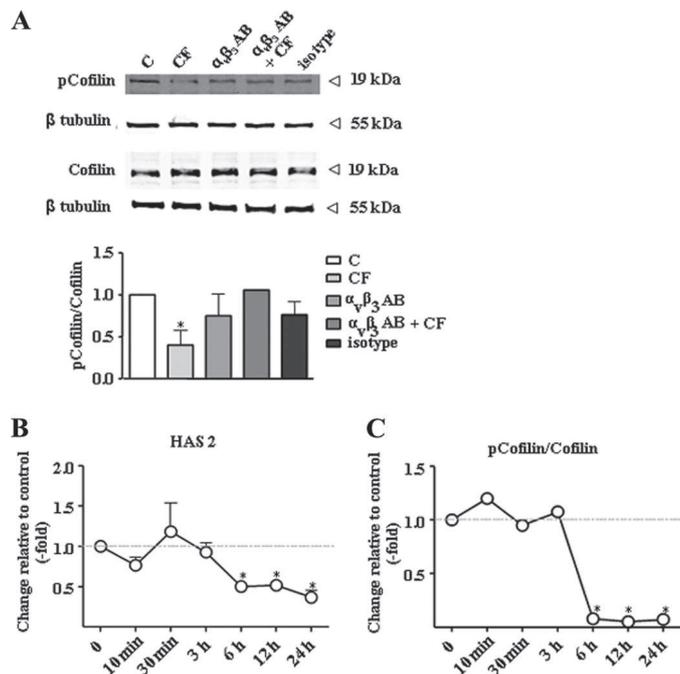


FIGURE 4. CF inhibit cofilin phosphorylation. *A*, phosphorylated cofilin and cofilin were detected by immunoblotting 24 h after the addition of CF plus or minus $\alpha_v\beta_3$ -blocking antibody LM609 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or the IgG control (*C*). *B*, time course of HAS2 mRNA expression as determined by real time RT-PCR. *C*, time course of cofilin phosphorylation as evidenced by immunoblotting; $n = 3$, mean \pm S.E., $*$, $p < 0.05$.

skeleton in turn is essential for the translocation of phosphorylated ERK1/2 into the nucleus (32). Therefore, it was tested whether cofilin phosphorylation was specifically affected by CF and $\alpha_v\beta_3$ -integrin signaling. Indeed Cofilin phosphorylation was significantly reduced by CF, and this response was abrogated by blocking $\alpha_v\beta_3$ -antibodies (Fig. 4*A*). Furthermore, the time course of HAS2 down-regulation and inhibition of cofilin phosphorylation were similar (Fig. 4, *B* and *C*). Actin filaments contribute to the formation of compartments and translocation pathways to facilitate signaling. In this context, it has been shown that pERK translocation into the nucleus is in part dependent on the cytoplasmic actin network (33). Therefore, it was considered that CF-mediated activation of $\alpha_v\beta_3$ may inhibit HAS2 expression via the effects on the cytoskeleton and in turn interference with ERK1/2 translocation in the nucleus. In line with this hypothesis, the ERK inhibitor PD98059 specifically inhibited HAS2 expression (Fig. 5*A*). However, the phosphorylation of ERK1/2 as measured by immunoblotting in total cell lysates was increased in response to CF (Fig. 5*B*). Therefore, immunocytochemistry and confocal imaging were used to investigate whether translocation of ERK1/2 into the nucleus was affected by CF. As shown in Fig. 5*C*, nuclear pERK1/2 was significantly reduced in response to CF in human skin fibroblasts. After UVB irradiation of skin fibroblasts, decreased nuclear pERK1/2 was detected by confocal microscopy and the MMP inhibitor restored the nuclear ERK1/2 content (supplemental Fig. S3). In addition to nuclear targeting of pERK1/2, the transcription activator ELK-1 was less phosphorylated in response to CF, supporting the hypothesis that nuclear ERK1/2 activity was in fact reduced in response to CF. In conclusion, these results are consistent with

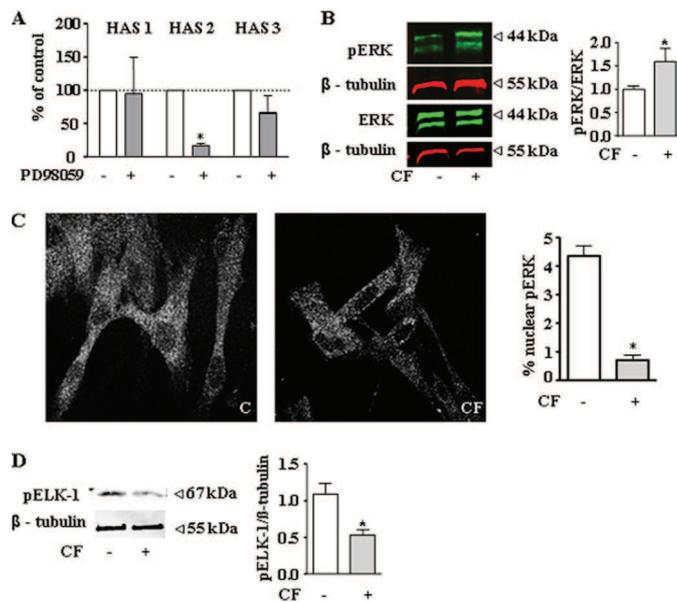


FIGURE 5. Inhibition of nuclear ERK1/2 activity by CF. *A*, the ERK inhibitor PD98059 (10 $\mu\text{mol}/\text{liter}$) inhibited HAS2 mRNA expression as determined by real time PCR. *B*, ERK and phosphoERK in response to CF as determined in total cell lysates after 24 h. *C*, nuclear translocation of pERK was visualized and quantified by immunostaining and confocal imaging (63 \times magnification). For quantitative analysis, four images per slide of three independent experiments were analyzed. Using ImageJ, total pERK and nuclear pERK were measured, and the percentage of nuclear pERK was calculated for each image. *Panel C* indicates control *D*, the nuclear ERK substrate pELK-1 was detected by immunoblotting of total cell lysates; $n = 3-4$, mean \pm S.E., $*$, $p < 0.05$.

a role of $\alpha_v\beta_3$ -mediated signaling of CF that causes inhibition of ROCK and actin-dependent translocation of ERK1/2 into the nucleus and thus inhibits HAS2 transcription.

HAS1 mRNA expression was up-regulated in response to CF in an $\alpha_v\beta_3$ -dependent manner as well as can be concluded by the results shown in Figs. 1*F* and 2, *A* and *B*. To identify the responsible downstream signaling, three different MAPK inhibitors were used. Although inhibition of ERK1/2 and Jun N-terminal kinase had no effect (data not shown), the p38 inhibitor SB203580 inhibited HAS1 mRNA induction by CF (supplemental Fig. S2), and anisomycin, a p38 activator (not shown), increased HAS1 mRNA. Increased p38 phosphorylation in response to CF was detected and occurred at the same time (24 h) as the induction of HAS1 mRNA. Furthermore, blocking antibodies to $\alpha_v\beta_3$ -integrins inhibited CF-induced p38 phosphorylation (supplemental Fig. 2). Collectively these data strongly suggest that HAS1 is induced by $\alpha_v\beta_3$ -integrins via p38 at the same time at which HAS2 is suppressed via inhibition of ROCK.

UVB-induced Collagen Cleavage and $\alpha_v\beta_3$ -Signaling Inhibit HAS2 Expression in Dermal Equivalents—Next it was tested whether exposure of fibroblast cultures and dermal equivalents to UVB irradiation affects HAS2 expression. First collagen fragmentation in response to UVB irradiation was visualized by collagen neopeptide staining in dermal equivalents. After a single dose of UVB, the appearance of collagen neopeptides (34) was monitored during the course of 96 h (Fig. 6, *A* and *B*). In addition, mRNA was isolated from the dermal equivalents during the indicated times after UVB irradiation. Induction of MMP1 mRNA expression was detected 48 h after UVB expo-

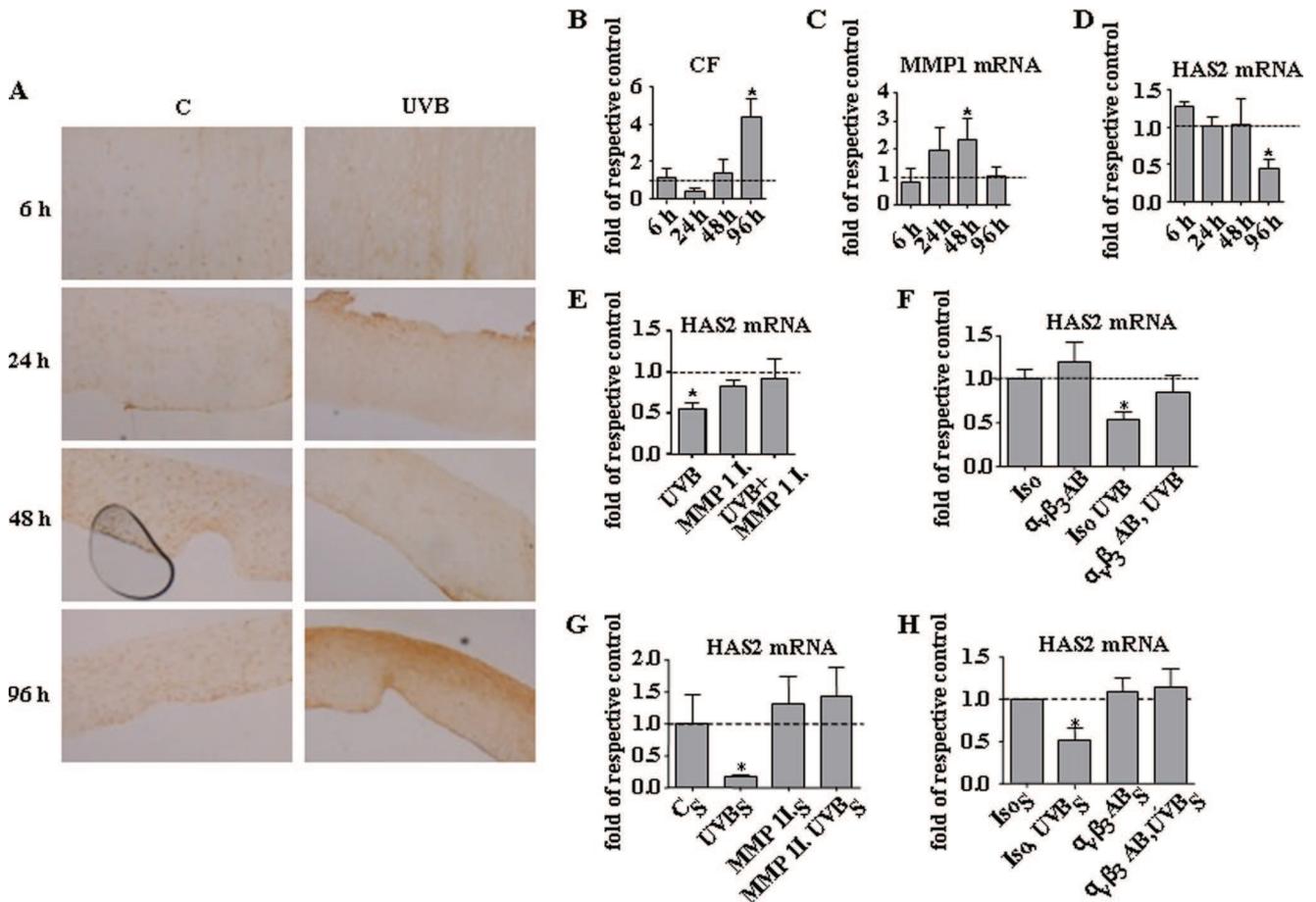


FIGURE 6. **UVB-induced collagen cleavage inhibits HAS2 via $\alpha_v\beta_3$.** A–D, human fibroblasts were grown in collagen gels to form dermal equivalents. A and B, time course of collagen neopeptide accumulation in response to UVB (10 mJ/cm²) as determined by immunostaining using collagen 2³/4C_{short} polyclonal rabbit antibody. Panel C indicates control. C, MMP1 mRNA expression. D, HAS2 mRNA expression. E and F, three-dimensional cultures of fibroblasts in collagen gels were subjected to irradiation with UVB (100 mJ/cm²). After 24 h, HAS2 mRNA was determined in the presence of the MMP inhibitor I (MMP 1 I, 300 nmol/liter) (E) or the $\alpha_v\beta_3$ -blocking antibody LM609 ($\alpha_v\beta_3$ AB, 5 μ g/ml) or isotype control (Iso, 5 μ g/ml) (F). G and H, polymeric collagen (120 μ g/ml) was added to the medium of monolayer cultures of human skin fibroblasts (C₃). Subsequently, the cultures were subjected to UVB irradiation (UVB₃, 100 mJ/cm²) in the presence (G) or absence (H) of MMP inhibitor I (300 nmol/liter) (G) or $\alpha_v\beta_3$ -blocking antibody LM609 ($\alpha_v\beta_3$ AB₃, 5 μ g/ml) or isotype control (Iso₃, 5 μ g/ml) (H) for 24 h. Subsequently HAS2 mRNA was determined by real time PCR; n = 3, mean \pm S.E., *, p < 0.05.

sure (Fig. 6C). Notably the decline of HAS2 mRNA expression in response to UVB occurred at 96 h, which was after the peak of MMP1 expression and at the same time when the highest accumulation of collagen neopeptides was detected (Fig. 6D). In three-dimensional cultures of human fibroblasts in collagen gels, the MMP1 inhibitor abolished UVB-mediated decrease of HAS2 expression (Fig. 6E). To prove that the endogenously generated collagen fragments signal through $\alpha_v\beta_3$ -integrins, the blocking antibody LM609 was applied to the three-dimensional cultures prior to UVB irradiation. As shown in Fig. 6F, the blocking $\alpha_v\beta_3$ -antibody indeed inhibited HAS2 down-regulation.

To further prove that endogenous CF generated in response to UVB down-regulate HAS2, fibroblasts were incubated with collagen and were irradiated to allow cleavage of collagen in response to UVB-induced MMP activity. After 3 days, these supernatants were removed and added without further treatment to fibroblasts to investigate the effect of the endogenous CF in the supernatants. The glucose concentration of this high glucose medium was not reduced significantly by the 3 days of conditioning (data not shown). After 24 h, a significant down-

regulation of HAS2 expression was detected. In line with the previous experiments, this down-regulation was sensitive to both the MMP1 inhibitor and the $\alpha_v\beta_3$ -blocking antibodies (Fig. 6, G and H).

Therefore, the data support the conclusion that UVB-mediated MMP induction and collagen cleavage generate $\alpha_v\beta_3$ -integrin-mediated signals that inhibit ROCK activity and subsequently nuclear activity of ERK1/2. In turn, decreased ERK1/2 activity leads to down-regulation of HAS2 expression and thus decrease of extracellular and pericellular HA (schematic drawing in Fig. 7).

DISCUSSION

HA is synthesized by dermal fibroblasts, which incorporate HA as a quantitative and functionally important component into the dermal ECM. HA is found to a lesser extent in the healthy epidermis but is induced in keratinocytes upon wounding (35). The role of HA during skin aging is of interest because loss of HA is thought to be involved in the actinic aging response. However, also other roles of HA have been reported such as the pro-inflammatory action of low molecular weight

Collagen Fragments Inhibit Hyaluronan Synthesis

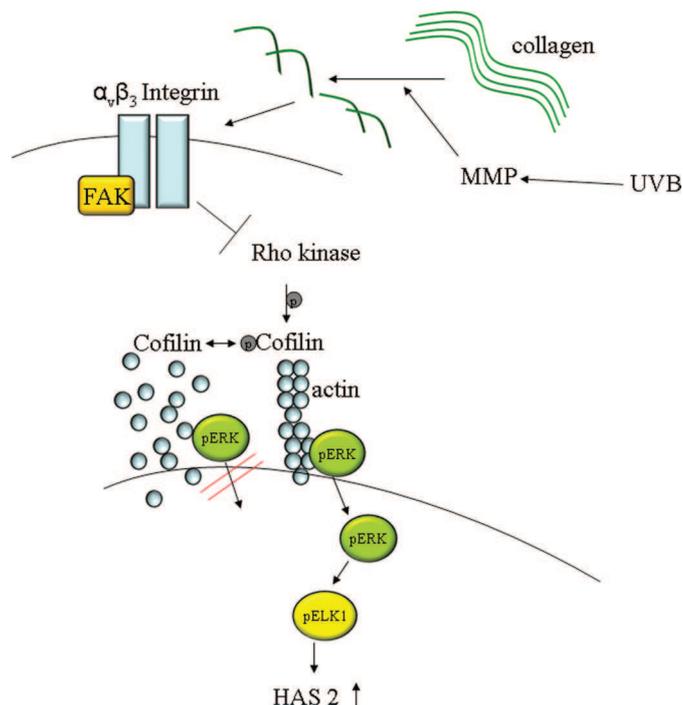


FIGURE 7. Schematic drawing of the proposed mechanism of HAS2 down-regulation in response to UVB. UVB induces MMP1 expression and degradation of polymeric collagen to CF. The present data suggest that CF activate $\alpha_v\beta_3$ -integrins, which inhibit ROCK activity and cofilin phosphorylation. Consequently translocation of pERK in the nucleus and transcriptional activation of HAS2 are suppressed. FAK, focal adhesion kinase.

HA and of HA cables (36, 37). In this regard, it is very interesting that during the acute response to UVB irradiation of the skin, HA synthesis is induced in keratinocytes and low molecular weight HA is detected, which may be involved in the transient inflammatory response during sunburn (38, 39). The regulatory mechanisms that are responsible for the loss of HA during photoaging have not been fully identified yet.

Previous studies have indicated that proteolysis of type I collagen exposes cryptic RGD integrin-binding motifs (39, 40) that attribute new biological activities to CF as compared with native fibrillar collagen. For example, CF have been shown to inhibit apoptosis via $\alpha_v\beta_3$ -integrin signaling in vascular smooth muscle cells (22).

Degradation of fibrillar collagen type I and III occurs in response to UVB irradiation of the skin and likely causes the aging phenotype of chronically sun-exposed skin (2, 41). The degradation of collagen into CF is mediated by MMPs that are up-regulated in response to UVB (2, 3). The induction of MMPs in response to UVB is the result of at least three mechanisms: (i) induction of MMPs in keratinocytes and diffusion of MMPs to the papillary dermis; (ii) induction of cytokines such as IL1 in the epidermis and/or the dermis and subsequent induction of MMPs by IL-1 in a paracrine and autocrine manner; and (iii) induction of MMPs by UVB in fibroblasts in the papillary dermis.

Of note, CF were thought to reduce *de novo* synthesis of collagen as compared with sun-protected skin (42). This was confirmed *in vitro* by the finding that *de novo* synthesis of type I procollagen is indeed inhibited after MMP1-mediated partial degradation of fibrillar collagen in human skin fibroblasts cul-

tured in three-dimensional collagen gels (43, 44). Thus degradation of collagen during actinic aging generates bioactive fragments that induce alternative signaling and contribute to the matrix remodeling and altered cellular phenotypes. In line with these findings, fibroblasts in the dermis are attached to collagen fibrils, are well spread, and display abundant cytoplasmic actin fibrils (45). In contrast, after actinic aging, fibroblasts interact with collagen fragments rather than with fibrils and are characterized by less spreading and less actin (45). In the experiments presented here, a similar effect was shown; CF reduced spreading and cytoplasmic actin in human skin fibroblasts.

The major aim of the present study was to explore whether a cross-talk might exist between collagen degradation by MMPs and regulation of HA synthesis in human skin fibroblasts. Indeed we observed that CF caused loss of the pericellular HA matrix and strongly reduced HA secretion in human skin fibroblasts. CF activate different integrins as compared with polymeric collagen. Specifically activation of $\alpha_v\beta_3$ -integrins has been shown before to mediate CF signaling in vascular smooth muscle cells (22). The use of blocking $\alpha_v\beta_3$ -antibodies in the present study proved that this integrin also mediates the down-regulation of HAS2 and the cytoskeletal effects in response to CF. The ROCK family of Rho-associated protein kinases is essential for F-actin assembly (46). The finding that latrunculin A and the ROCK inhibitor mimicked the effect of CF on HAS2 isoform expression suggested that the cytoskeleton and ROCK-mediated signals were involved. It is known that $\alpha_v\beta_3$ -integrins are associated with low RhoA-ROCK activity in part through interference with the recycling pathway of $\alpha_5\beta_1$ -integrin (47, 48).

ROCK is known to participate in nucleocytoplasmic trafficking of signaling molecules by its effects on assembly of cellular stress fibers (33, 46). Cofilin is essential for turnover of actin filaments, and Cofilin activity is regulated by phosphorylation (49). Specifically, Rho-ROCK signaling activates the LIM-kinase, and LIM-kinase phosphorylates cofilin, which in turn results in stabilization of actin filaments (50). Therefore, it was investigated whether the phosphorylation of cofilin was responsive to CF. Indeed it is shown here that CF induced $\alpha_v\beta_3$ -integrin-dependent phosphorylation of cofilin.

Furthermore, nuclear translocation of ERK1/2 is required for its effects on gene regulation (32, 51). In addition, it has been demonstrated that translocation of ERK1/2 to the nucleus can require RhoA/ROCK signaling (52, 53). Interestingly the content of pERK1/2 in the nucleus was decreased in response to CF, and an ERK1/2 inhibitor inhibited HAS2 expression. As a direct target of the MAP kinase pathways, the transcription factor Elk-1 is known to be coupled to ERK entry into the nucleus (33). Thus as readout for nuclear pERK1/2 activity, the phosphorylation of ELK-1 was detected and found to be decreased.

Downstream of ERK are several nuclear transcription factors, among them cyclic AMP-response element-binding protein (CREB), which is activated via mitogen- and stress-activated kinase (MSK) (54). Because the first 2250 bp of the HAS2 promoter contain three response elements for CREB1 (55), it is likely that HAS2 transcription is induced by pERK1/2-CREB activation and that this is the effector mechanism of HAS2 transcription that is interfered with by CF signaling. In summary,

the present data on signaling are consistent with activation of $\alpha_v\beta_3$ -integrins by CF and subsequent inhibition of ROCK and cofilin phosphorylation, which ultimately led to inhibition of pERK translocation and transcriptional activation of HAS2.

HAS2 appeared to be the predominant isoform in skin fibroblasts, based on the results of the quantitative real time RT-PCR. This assumption was further supported by the fact that the extent of HAS2 down-regulation correlated with the decrease of HA secretion. In parallel to HAS2 down-regulation, induction of HAS1 occurred in response to CF. The up-regulation of HAS1 was also dependent on $\alpha_v\beta_3$ -integrins and mediated downstream by activation of p38, as shown by inhibitors. The activation of p38 by $\alpha_v\beta_3$ -integrins has been shown before (56), and induction of HAS1 by p38 activation was reported in human fibroblast-like synoviocytes (57). The induction of HAS1 may represent a counter regulation in response to HAS2 suppression. However, quantitatively and functionally, HAS1 induction is likely less important because HAS1 is expressed at such a low level that the 2–3-fold up-regulation in response to CF may not contribute significantly to total HA synthesis. Therefore, the mechanistic experiments addressing the effects of UVB irradiation were focused mainly on HAS2 expression. The use of dermal equivalents and collagen gels allowed us to investigate the effect of UVB on fibroblasts in a three-dimensional collagen matrix similar to those used before by Varani *et al.* (43). As a result, down-regulation of HAS2 occurred after induction of MMP1 and at the time of maximal collagen neopeptide accumulation. Furthermore, UVB-induced down-regulation of HAS2 was sensitive to MMP1 inhibition and $\alpha_v\beta_3$ -integrin blockage. Collectively the present data suggest a novel pathway that couples HA synthesis to collagen matrix turnover, similar to inhibition of *de novo* collagen synthesis by CF (43).

During skin aging, this might be detrimental because collagen cleavage in response to UVB may thereby also induce loss of HA from the skin at the same time at which collagen structure and *de novo* synthesis are impaired. Because HA is thought to be important for cell proliferation and migration within the skin, this mechanism may contribute to the impaired regenerative capacity of aged skin.

The present finding may also be relevant from the standpoint of HAS regulation in general. Almost all regulatory systems that have been described before induce HA, such as various growth factors and cytokines. Here a direct negative regulatory pathway was identified that might also be important for physiological and pathophysiological processes where extensive remodeling of the collagenous extracellular matrix takes place, such as tumor progression, myocardial, or vascular remodeling.

Acknowledgment—We kindly thank Bettina Mausa for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Bruls, W. A., van Weelden, H., and van der Leun, J. C. (1984) *Photochem. Photobiol.* **39**, 63–67
- Fisher, G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1997) *N. Engl. J. Med.* **337**, 1419–1428
- Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1996) *Nature* **379**, 335–339
- Manuskiatti, W., and Maibach, H. I. (1996) *Int. J. Dermatol.* **35**, 539–544
- Itano, N., and Kimata, K. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 816–820
- Day, A. J., and Prestwich, G. D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 4585–4588
- Toole, B. P., Wight, T. N., and Tammi, M. I. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 4593–4596
- Yoneda, M., Yamagata, M., Suzuki, S., and Kimata, K. (1988) *J. Cell Sci.* **90**, 265–273
- Margelin, D., Medaisko, C., Lombard, D., Picard, J., and Fourtanier, A. (1996) *J. Invest. Dermatol.* **106**, 505–509
- Takahashi, Y., Ishikawa, O., Okada, K., Kojima, Y., Igarashi, Y., and Miyachi, Y. (1996) *J. Dermatol. Sci.* **11**, 129–133
- Takahashi, Y., Ishikawa, O., Okada, K., Ohnishi, K., and Miyachi, Y. (1995) *J. Dermatol. Sci.* **10**, 139–144
- Dai, G., Freudenberg, T., Zipper, P., Melchior, A., Grether-Beck, S., Rabausch, B., de Groot, J., Twarock, S., Hanenberg, H., Homey, B., Krutmann, J., Reifenberger, J., and Fischer, J. W. (2007) *Am. J. Pathol.* **171**, 1451–1461
- Carragher, N. O., Levkau, B., Ross, R., and Raines, E. W. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 619–630
- von Wnuck Lipinski, K., Keul, P., Lucke, S., Heusch, G., Wohlschlaeger, J., Baba, H. A., and Levkau, B. (2006) *Cardiovasc. Res.* **69**, 697–705
- Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J. H., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Fisher, G. J., and Voorhees, J. J. (2000) *J. Invest. Dermatol.* **114**, 480–486
- Majora, M., Wittkamp, T., Schuermann, B., Schneider, M., Franke, S., Grether-Beck, S., Wilichowski, E., Bernerd, F., Schroeder, P., and Krutmann, J. (2009) *Am. J. Pathol.* **175**, 1019–1029
- Weber, A. A., Przytulski, B., Schumacher, M., Zimmermann, N., Gams, E., Hohlfeld, T., and Schrör, K. (2002) *Br. J. Haematol.* **117**, 424–426
- Evanko, S. P., Angello, J. C., and Wight, T. N. (1999) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1004–1013
- Twarock, S., Tammi, M. I., Savani, R. C., and Fischer, J. W. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 23276–23284
- Wilkinson, T. S., Potter-Perigo, S., Tsoi, C., Altman, L. C., and Wight, T. N. (2004) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **31**, 92–99
- Itano, N., Sawai, T., Yoshida, M., Lenas, P., Yamada, Y., Imagawa, M., Shinomura, T., Hamaguchi, M., Yoshida, Y., Ohnuki, Y., Miyauchi, S., Spicer, A. P., McDonald, J. A., and Kimata, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25085–25092
- von Wnuck Lipinski, K., Keul, P., Ferri, N., Lucke, S., Heusch, G., Fischer, J. W., and Levkau, B. (2006) *Circ. Res.* **98**, 1490–1497
- Ortega-Velázquez, R., Díez-Marqués, M. L., Ruiz-Torres, M. P., González-Rubio, M., Rodríguez-Puyol, M., and Rodríguez Puyol, D. (2003) *FASEB J.* **17**, 1529–1531
- Marchand-Brynaert, J., Detrait, E., Noiset, O., Boxus, T., Schneider, Y. J., and Remacle, C. (1999) *Biomaterials* **20**, 1773–1782
- Putnam, A. J., Schulz, V. V., Freiter, E. M., Bill, H. M., and Miranti, C. K. (2009) *Cell Commun. Signal* **7**, 10
- Lee, D. Y., Yeh, C. R., Chang, S. F., Lee, P. L., Chien, S., Cheng, C. K., and Chiu, J. J. (2008) *J. Bone Miner Res.* **23**, 1140–1149
- Ahmed, M., and Kundu, G. C. (2010) *Mol. Cancer* **9**, 101
- de Oliveira, C. A., and Mantovani, B. (1988) *Life Sci.* **43**, 1825–1830
- van Leeuwen, F. N., Giepmans, B. N., van Meeteren, L. A., and Moolenaar, W. H. (2003) *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 1209–1212
- Masiero, L., Lapidus, K. A., Ambudkar, I., and Kohn, E. C. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 3205–3213
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999) *Science* **285**, 895–898
- Pouysségur, J., Volmat, V., and Lenormand, P. (2002) *Biochem. Pharmacol.* **64**, 755–763
- Aplin, A. E., Stewart, S. A., Assoian, R. K., and Juliano, R. L. (2001) *J. Cell Biol.* **153**, 273–282
- Billinghurst, R. C., Dahlberg, L., Ionescu, M., Reiner, A., Bourne, R., Rora-beck, C., Mitchell, P., Hambor, J., Diekmann, O., Tschesche, H., Chen, J., Van Wart, H., and Poole, A. R. (1997) *J. Clin. Invest.* **99**, 1534–1545
- Tammi, R. H., and Tammi, M. I. (2009) *J. Invest. Dermatol.* **129**,

Collagen Fragments Inhibit Hyaluronan Synthesis

- 1858–1860
36. Stern, R., Asari, A. A., and Sugahara, K. N. (2006) *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 699–715
37. de la Motte, C. A., Hascall, V. C., Drazba, J., Bandyopadhyay, S. K., and Strong, S. A. (2003) *Am. J. Pathol.* **163**, 121–133
38. Averbeck, M., Gebhardt, C. A., Voigt, S., Beilharz, S., Anderegg, U., Termeer, C. C., Sleeman, J. P., and Simon, J. C. (2007) *J. Invest. Dermatol.* **127**, 687–697
39. Montgomery, A. M., Reisfeld, R. A., and Cheresch, D. A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 8856–8860
40. Davis, G. E. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1025–1031
41. Fligiel, S. E., Varani, J., Datta, S. C., Kang, S., Fisher, G. J., and Voorhees, J. J. (2003) *J. Invest. Dermatol.* **120**, 842–848
42. Griffiths, C. E., Russman, A. N., Majmudar, G., Singer, R. S., Hamilton, T. A., and Voorhees, J. J. (1993) *N. Engl. J. Med.* **329**, 530–535
43. Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S. E., Datta, S. C., Wang, Z. Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G. J., and Voorhees, J. J. (2001) *Am. J. Pathol.* **158**, 931–942
44. Varani, J., Perone, P., Fligiel, S. E., Fisher, G. J., and Voorhees, J. J. (2002) *J. Invest. Dermatol.* **119**, 122–129
45. Varani, J., Schuger, L., Dame, M. K., Leonard, C., Fligiel, S. E., Kang, S., Fisher, G. J., and Voorhees, J. J. (2004) *J. Invest. Dermatol.* **122**, 1471–1479
46. Narumiya, S., Ishizaki, T., and Watanabe, N. (1997) *FEBS Lett.* **410**, 68–72
47. Danen, E. H., Sonneveld, P., Brakebusch, C., Fassler, R., and Sonnenberg, A. (2002) *J. Cell Biol.* **159**, 1071–1086
48. White, D. P., Caswell, P. T., and Norman, J. C. (2007) *J. Cell Biol.* **177**, 515–525
49. Moon, A., and Drubin, D. G. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 1423–1431
50. Huvneers, S., and Danen, E. H. (2009) *J. Cell Sci.* **122**, 1059–1069
51. Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., and Pouyssegur, J. (1999) *EMBO J.* **18**, 664–674
52. Kawamura, S., Miyamoto, S., and Brown, J. H. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31111–31117
53. Liu, Y., Suzuki, Y. J., Day, R. M., and Fanburg, B. L. (2004) *Circ. Res.* **95**, 579–586
54. Wiggan, G. R., Soloaga, A., Foster, J. M., Murray-Tait, V., Cohen, P., and Arthur, J. S. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2871–2881
55. Makkonen, K. M., Pasonen-Seppänen, S., Törrönen, K., Tammi, M. I., and Carlberg, C. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 18270–18281
56. Chen, J., Baskerville, C., Han, Q., Pan, Z. K., and Huang, S. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 47901–47905
57. Stuhlmeier, K. M., and Pollaschek, C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 8753–8760

Estradiol Protects Dermal Hyaluronan/Versican Matrix during Photoaging by Release of Epidermal Growth Factor from Keratinocytes^{*S}

Received for publication, February 14, 2012, and in revised form, March 23, 2012. Published, JBC Papers in Press, April 9, 2012, DOI 10.1074/jbc.M112.353151

Katharina Röck[‡], Michael Meusch[‡], Nikola Fuchs[‡], Julia Tigges[§], Petra Zipper[¶], Ellen Fritsche[§], Jean Krutmann[§], Bernhard Homey[¶], Julia Reifenberger[¶], and Jens W. Fischer^{‡,1}

From the [‡]Institut für Pharmakologie and Klinische Pharmakologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, the [§]IUF-Leibniz Institute for Environmental Medicine, and the [¶]Department of Dermatology, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany

Background: Skin aging involves UVB-induced degeneration of the dermal extracellular matrix.

Results: Estrogen induces epidermal growth factor expression in keratinocytes thereby stimulating hyaluronan synthase 3 and versican expression in dermal fibroblasts of UVB-irradiated skin.

Conclusion: Paracrine release of epidermal growth factor in response to estrogen maintains hyaluronan and versican-rich extracellular matrix.

Significance: Estrogen prevents specific aging responses in the hyaluronan matrix of photoaged skin.

Hyaluronan (HA) and versican are key components of the dermis and are responsive to ultraviolet (UV)B-induced remodeling. The aim of this study was to explore the molecular mechanisms mediating the effects of estrogen (E_2) on HA-rich extracellular matrix during photoaging. Hairless *skh-1* mice were irradiated with UVB (three times, 1 minimal erythema dose (80 mJ/cm²), weekly) for 10 weeks, and endogenous sex hormone production was abrogated by ovariectomy. Subcutaneous substitution of E_2 by means of controlled-release pellets caused a strong increase in the dermal HA content in both irradiated and nonirradiated skin. The increase in dermal HA correlated with induction of HA synthase HAS3 by E_2 . Expression of splice variant 2 of the HA-binding proteoglycan versican was also increased by E_2 . In search of candidate mediators of these effects, it was found that E_2 strongly induced the expression of epidermal growth factor (EGF) in UVB-irradiated epidermis *in vivo* and in keratinocytes *in vitro*. EGF in turn up-regulated the expression of HAS3 and versican V2 in dermal fibroblasts. HAS3 knockdown by shRNA caused inhibition of fibroblast proliferation. Furthermore, HAS3 and versican V2 induction by E_2 correlated positively with proliferation *in vivo*. In addition, the accumulation of inflammatory macrophages, expression of inducible cyclooxygenase 2, as well as proinflammatory monocyte chemoattractant protein 1 were decreased in response to E_2 in the dermis. Collectively, these data suggest that E_2 treatment increases the amount of dermal HA and versican V2 via paracrine release of EGF, which may be implicated in the pro-proliferative and anti-inflammatory effects of E_2 during photoaging.

Photoaging of the skin inevitably occurs at sun-exposed areas such as the face, neck, and hands. This process is characterized

by intrinsic and extrinsic aging responses and by an overlap with photo-carcinogenesis under certain circumstances (1). The role of the ECM² of the skin in this aging process is well established. In particular, the cleavage of collagen by matrix metalloproteinases has been demonstrated (2). The partially degraded collagen network heals imperfectly through *de novo* collagen synthesis, leaving microscars in the skin. Collagen fragments that are released as a result of matrix metalloproteinase-induced collagen cleavage are bioactive and participate in the regulation of fibroblast phenotype during photoaging. Moreover, collagen fragments reduce *de novo* synthesis of dermal collagen (3). Thus, matrix degradation and altered matrix expression influence fibroblast phenotypes and may thereby perpetuate UVB-induced aging responses. Other dermal ECM molecules are also reportedly affected by UVB irradiation, particularly hyaluronan (HA) and proteoglycans (4–7). HA is abundant in the dermis and is thought to contribute to water content, turgidity of the skin, and the diffusion of soluble factors and nutrients (5). Furthermore, HA can support the proliferative phenotype of fibroblasts and possibly opposes apoptosis (8, 9). HA is synthesized at the plasma membrane by HA synthase isoenzymes-1, -2, and -3 (HAS1–3) (10). These enzymes extrude HA into the extracellular space after assembly of UDP-glucuronic acid and UDP-*N*-acetyl-*D*-glucosamine into a growing chain of $\beta(1-3)$ -linked *D*-glucuronic acid and *N*-acetyl-*D*-glucosamine disaccharides. The repeating disaccharides are linked by hexosaminidic $\beta(1-4)$ bonds that form high molecular weight HA of up to 10⁷ Da and up to 20 μ m in length (11). HAS isoenzymes are expressed at a relatively low copy number per cell but can rapidly produce large amounts of HA. In addition to transcriptional regulation of HAS enzymes, it has recently been shown that regulation also takes place at the

* This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft Grants SFB 728, TP C6, C1, and C4.

^S This article contains supplemental Figs. 1 and 2.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 49-211-8112500; Fax: 49-211-8114781; E-mail: jens.fischer@uni-duesseldorf.de.

² The abbreviations used are: ECM, extracellular matrix; OVX, ovariectomy; HAS, hyaluronan synthase; E2R, E_2 receptor; S, sham; P, placebo; X, OVX; bHABP, bovine HA-binding protein; RHAMM, receptor of HA-mediated motility; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; HA, hyaluronan.

post-transcriptional level through phosphorylation, glycosylation, and mono-ubiquitination (12–14). Furthermore the formation of homo- and heterodimers has now been demonstrated (13).

With respect to skin aging, it has been shown that HA is reduced by chronic UVB irradiation, and this loss likely contributes to the aged phenotype of skin (8, 15–17). However, a limited number of studies have also demonstrated either no change or increased dermal HA in response to UVB (15, 18). The latter is likely an acute response associated with heliodermatitis.

Hyaluronan is bound by versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan, through specific binding domains termed link modules that each consist of ~100 amino acids and are part of the link protein domain. The link protein domain is composed of an immunoglobulin domain and two link modules and is present in the N-terminal globular G1 domain of versican (19). Because multiple versican molecules bind to one chain of HA, large networks of HA and versican are formed. These HA and versican-rich matrices are known to critically govern the proliferative and migratory phenotype of mesenchymal cells (20). Recently, it has been demonstrated that versican accumulates in response to UVB irradiation (7). However, little is known about what the specific functions of versican might be during skin aging, how versican is regulated during skin aging, and specifically whether versican is responsive to estrogen.

Skin aging is accelerated after menopause and positive effects on the skin including increased thickness, increased moisture, decreased wrinkling, and improved wound healing responses became obvious upon estrogen treatment of postmenopausal women (21). However, hormone replacement therapy is confounded by thrombotic and malignant complications and is now restricted to short term use in selected cases (22). It is therefore of great interest to better understand the molecular mechanisms that underlie the protection of the skin matrix by E_2 . The aim of this study was to investigate the effect of E_2 on the dermal hyaluronan and versican matrix during UVB-induced skin aging by use of ovariectomized and E_2 treated hairless skh-1 mice.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

UVB Irradiation of Mice—Female hairless mice (Skh:Hr1) (Charles River Laboratories) were housed according to standard procedures. Mice were randomly assigned to either sham procedure or bilateral ovariectomy (OVX, X) at the age of 8 weeks as described previously (23). OVX mice were subdivided into four treatment groups, which received either placebo or $E_2 \pm$ UVB irradiation. E_2 treatment was performed by implantation of subcutaneous slow release hormone pellets (Innovative Research of America) prepared to dispense 1.1 $\mu\text{g}/\text{day}$ E_2 for the duration of the 10-week experimental period. Placebo (P) pellets served as control. After OVX and pellet implantation at 8 weeks, half of the mice were irradiated with UVB light and the other half served as nonirradiated controls. Sham-operated animals received placebo pellets \pm UVB irradiation. Thus, six experimental groups (Fig. 1A) were compared in total as follows: 1) sham, placebo (S,P); 2) OVX, placebo (X,P); 3) OVX, E_2

(X, E_2); 4) sham, placebo, UVB (S,P UVB); 5) OVX, placebo, UVB (X,P UVB); and 6) OVX, E_2 , UVB (X, E_2 UVB).

Animals were exposed to UVB radiation in an irradiation chamber as described previously (8) using UV lamps with fluorescent bulbs (280–320 nm with a peak at 313 nm TL 20W/12; Philips, Eindhoven, The Netherlands). UVB irradiation was performed three times per week at a dose of 80 mJ/cm² (irradiation time 1 min 36 s) equaling one minimal erythema dose over a period of 10 weeks (Fig. 1A). The light intensity was determined by means of a UV meter (Waldmann, Villingen-Schwenningen, Germany). Skin biopsies from the dorsal skin of 1 \times 1.5 cm² in size were obtained from control and UVB-irradiated animals after 10 weeks. All animal experiments were approved by the local ethical committee for animal experiments.

Histology—Skin biopsies were frozen in tissue freezing medium (Leica Nussloch, Bensheim, Germany) in liquid isopentane at -40°C , and 12- μm cryosections were prepared for immunohistochemical staining. Affinity histochemistry of HA was performed with bovine HA-binding protein (bHABP, Seikagaku, Tokyo, Japan) and detected with biotin-labeled streptavidin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Calbiochem). The following primary antibodies were used: Versican (LF99, 1:400, rabbit anti-human, kindly provided by Dr. Larry Fisher, NIDCR, National Institutes of Health, Bethesda); HAS3 (H64, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); MAC-2 (1:250, Cedarlane, Burlington, Canada); KI-67 (1:50, Novus Biological, Littleton, CO), and COX2 (1:1000, Cayman, Ann Arbor, MI). The respective biotinylated secondary antibodies (1:1000) were obtained from Calbiochem. Detection was performed using 3,3'-diaminobenzidine (Zytomed, Berlin, Germany) as a chromogen. Nuclei were stained with hemalaun solution (Merck). Negative controls without the primary antibody were performed for every antigen. No staining was detectable in the papillary dermis of any of these control stainings (data not shown).

Digital image analysis was performed using a modified approach based on Dai *et al.* (8). Bright field images (8-bit) of the stained sections were captured using a Leica DM2000 microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) at $\times 100$ magnification. For the quantification of the staining intensity, ImageJ software 1.41 Version (National Institutes of Health) was used according to instructions of ImageJ. The color deconvolution plug-in was employed to separate the color channels of hemalaun and DAB. Negative controls and strongly DAB-positive images were used to determine the thresholds and the analyzed range of signals. This procedure minimized the background interference and maximized the signal of DAB-positive tissue. Thresholds were set for the complete analysis of one antigen. The area fraction is defined as percentage of the area classified as DAB-positive. The measurement was performed in the papillary dermis excluding regions that contained hair follicles. Per skin section data from three randomly selected areas were averaged.

Cell Culture—Human dermal fibroblasts from female donors were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany), maintained in monolayer cultures in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without phenol red (Sigma), and supplemented with 10% heat-inactivated, charcoal-treated fetal

Estradiol Protects Hyaluronan/Versican Matrix from UVB

bovine serum, 2 mmol/liter L-glutamine, and antibiotics (100 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin-G). Normal human epidermal keratinocytes were purchased from PromoCell and cultured in keratinocyte media 2 (PromoCell). The cells were maintained at 37 °C, 5% CO₂ and 95% humidified air.

UVB irradiation of the cells was performed with a Bio-Sun irradiation system (Vilbert Lourmat, Munich, Germany) containing two 30-watt UVB sources (312 nm). During the UVB irradiation procedure (100 mJ/cm²; irradiation time ~10 s), cells were kept in phosphate-buffered saline solution, which was replaced by DMEM containing 10% charcoal-treated FCS with or without 100 nM β-estradiol (Sigma) immediately after the irradiation. Cells were harvested 24 h after stimulation.

For the cell media transfer experiments, NEHKs were UVB-irradiated and stimulated with E₂ as described above in keratinocyte media 2. The supernatant was collected 24 h after stimulation and was transferred to fibroblasts in the presence or absence of erlotinib (3 μM) (LC Laboratories, Woburn, MA), EGF-neutralizing antibody, or IgG isotype control (both 0.35 μg/ml, Abcam, Cambridge, UK). Fibroblasts were harvested 24 h after exposure to conditioned media.

RNA Isolation and Quantification of Gene Expression—Total RNA was isolated using RNeasy total RNA kits (Qiagen, Hilden, Germany). The RNA concentration was determined via photometric measurement at absorbance 260/280. Total RNA (1 μg) was reverse-transcribed using the SuperscriptIII first-strand synthesis system for reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) (Invitrogen). Primers to analyze target mRNA expression levels were designed employing Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) based on published mRNA sequences. The sequences are given in Table 1. Real time RT-PCR was performed in triplicate using SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems) as described (15). The 2^{-ΔΔC(T)} method was used for comparison of the relative expression between control and treated cells. A melting curve analysis was performed after every run, and a negative control containing only master mix, the primer pair, and water was included on every plate.

Knockdown of HAS3—HAS3 knockdown was achieved by usage of the MISSION™ lentiviral shRNA knockdown system (Sigma) as described previously (24). A scrambled shRNA served as control, and the anti-HAS3 hairpin sequence was 5'-CGGGCTCTACAACCTCTCTGTGGTTCTCGAGAACCA-CAGAGAGTTGTAGAGCTTTTTG-3'. FuGENE 6 (Roche Applied Science) was used for the transfer into the packaging cell line HEK293T (ATCC, Wesel, Germany). For better stability of the produced lentiviral particles, the medium was changed to Iscove's modified Dulbecco's medium after 16 h. The lentiviruses were harvested 24 h later and concentrated by centrifugation with poly-L-lysine as reported previously (25). Fibroblasts were transfected with a multiplicity of infection of 5 and kept in normal growth medium for at least 5 days before stimulation with conditioned keratinocyte medium. Before using the cells in proliferation assays, the efficacy of the lentiviral HAS3 knockdown was verified by quantitative RT-PCR (data not shown) and Western blot analysis (anti-HAS3, 1:1000, Sigma) (supplemental Fig. 1).

TABLE 1
Primer sequences used for quantification of gene expression
f indicates forward, and r indicates reverse.

Gene	Primer sequence
Human <i>CD44</i>	f, 5'-GCTATTGAAAGCCTTGCAGAG-3' r, 5'-CGCAGATCGATTGGAATATAACC-3'
Human <i>COX2</i>	f, 5'-TGAGTGTGGGATTTGACCCG-3' r, 5'-TGTGTTTGGAGTGGGTTTCA-3'
Human <i>EGF</i>	f, 5'-AGTTTTTCTGAATGGGTC AAGG-3' r, 5'-TCCAATTTATTTGCCATCCAG-3'
Human <i>GAPDH</i>	f, 5'-GTGAAGGTCCGAGTCAACG-3' r, 5'-TGAGGTCAATGAAGGGGTC-3'
Human <i>HAS1</i>	f, 5'-TACAACCAGAAGTTCCTGGG-3' r, 5'-CTGGAGGTGACTTTGGTAGC-3'
Human <i>HAS2</i>	f, 5'-GTGGATTATGTACAGGTTTGTGA-3' r, 5'-TCCAACCATGGGATCTTCTT-3'
Human <i>HAS3v1</i>	f, 5'-GAGATGCCAGATCCCTCAACA-3' r, 5'-CCCCTAATACACTGCACAC-3'
Human <i>HYAL1</i>	f, 5'-CCAAGGAATCATGTCCAGGCCATCAA-3' r, 5'-CCCCTGGTCCAGTTCAGG-3'
Human <i>HYAL2</i>	f, 5'-GGCTTAGTGAGATGGACCTC-3' r, 5'-CCGTGTCAGGTAATCTTTGAG-3'
Human <i>RHAMM</i>	f, 5'-GAATATGAGAGCTTAAAGCCCTG-3' r, 5'-CCATCATCTCCCTCATCTTTGTGC-3'
Human pan- <i>VERSICAN</i>	f, 5'-AGACTGTCAGATATCCCATCC-3' r, 5'-AATCCATAAAGTCCCTGACTCCCT-3'
Human <i>VERSICAN V1</i>	f, 5'-CGTCCGAATGAGTGATTTGAG-3' r, 5'-TTTCAGCCATTTAGATCATGCAC-3'
Human <i>VERSICAN V2</i>	f, 5'-AAGACAGGACCTGATCGCT-3' r, 5'-AGTGGCTCCATTACGACAGG-3'
Human <i>VERSICAN V3</i>	f, 5'-ACGACCTGATCGCTGCAA-3' r, 5'-CAAGTGGCTCCATTACGACA-3'
Human <i>VERSICAN Vo</i>	f, 5'-ACCAGGACCTGATCGCTGCAA-3' r, 5'-GTTTCATTTTGCAGCGATCAG-3'
Murine <i>Cd44</i>	f, 5'-CAAGTPTTGGTGGCACACAG-3' r, 5'-CTGTAGCGGCCATTTTCTC-3'
Murine <i>Cox2</i>	f, 5'-CCGACTGGATTCATGGTG-3' r, 5'-CCTTGAAGTGGGTCCAGGATG-3'
Murine <i>Egf</i>	f, 5'-GCCACGCTTACATTCATTC-3' r, 5'-ATCGCCTTGTCTTTCAACAC-3'
Murine <i>E2Ra</i>	f, 5'-AGCTGCTCCCTCCACTTGGT-3' r, 5'-GGCGTCGATTGTCAGAAATTAG-3'
Murine <i>E2RB</i>	f, 5'-TACGGTGTCTGGTCCCTGTGA-3' r, 5'-TACACTGATTCGTGGCTGGA-3'
Murine <i>Gapdh</i>	f, 5'-TGGCAAAGTGGAGATTTGTGCC-3' r, 5'-AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'
Murine <i>Has1</i>	f, 5'-TATGCTACCAAGTATACCTCG-3' r, 5'-TCTCGAAGTAAGATTTGGAC-3'
Murine <i>Has2</i>	f, 5'-CGTCTGCTCAAATTCATCTG-3' r, 5'-ACAATGCATCTTGTTCAGCTC-3'
Murine <i>Has3</i>	f, 5'-GATGTCCAAAATCCCTCAACAAG-3' r, 5'-CCCCTAATACATTTGCACAC-3'
Murine <i>Hyal1</i>	f, 5'-AAGTACCAAGGAATCATGCC-3' r, 5'-CTCAGGATAACTTGGATGGC-3'
Murine <i>Hyal2</i>	f, 5'-GGTGGACCTTATCTCTACCAT-3' r, 5'-TATTTGGCAGGTCTCCATCTT-3'
Murine <i>Il6</i>	f, 5'-GATGGATGCTACCAACTGGA-3' r, 5'-GGTACTCCAGAAGACCAGAGGA-3'
Murine <i>Ki-67</i>	f, 5'-CCAGCTGTCCCTCAAGACAATC-3' r, 5'-CACTGGAAGTCCCTGCTGAT-3'
Murine <i>Mac-2</i>	f, 5'-TGAGAGTGGCAAACCATTTCA-3' r, 5'-GTCAACACTGATCCCCAGTT-3'
Murine <i>Mcp-1 (CCL2)</i>	f, 5'-CCCAATGAGTAGGCTGGAGA-3' r, 5'-TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3'
Murine <i>Rhamm</i>	f, 5'-GCCACTCAGAAGGACCTCAC-3' r, 5'-TGCACAGCTAATTTCTTGGATG-3'
Murine <i>Tgfb1</i>	f, 5'-CTAATGGTGGACCGCAACA-3' r, 5'-ACTGCTTCCCGAATGTCTGA-3'
Murine <i>Tgfb2</i>	f, 5'-CGAGGAGTACTACGCCAAGG-3' r, 5'-GTAGAAAGTGGCGGGATG-3'
Murine <i>Tgfb3</i>	f, 5'-TTCGACATGATCCAGGGACT-3' r, 5'-TCTCCACTGAGGACACATTTGA-3'
Murine <i>Tnfa</i>	f, 5'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCC-3' r, 5'-AGCTGCTCCCTCCACTTGGT-3'
Murine <i>Tpx2</i>	f, 5'-TCCCTGGATGCTAAGAGAGC-3' r, 5'-TTTCAACAGAGGCAACATGG-3'
Murine pan- <i>Versican</i>	f, 5'-ACCATGTCACTGGCTGTGG-3' r, 5'-AGCGGCAAAGTTCAGAGTGT-3'
Murine <i>Versican V1</i>	f, 5'-GCCTACTGCTTTAAACGTCGA-3' r, 5'-GCAAACAGATCATGCAGTGG-3'
Murine <i>Versican V2</i>	f, 5'-ACAGGACCTGATCTCTGCAAAA-3' r, 5'-CCATTCCGACAAGGGTTAGA-3'
Murine <i>Versican V3</i>	f, 5'-ACGACCTGATCTCTGCAA-3' r, 5'-CCATTCCGACAAGGGTTAGA-3'
Murine <i>Versican Vo</i>	f, 5'-AAGACAGGTCCGATTTAGTGATAT-3' r, 5'-GCAAACAGATCATGCAGTGG-3'

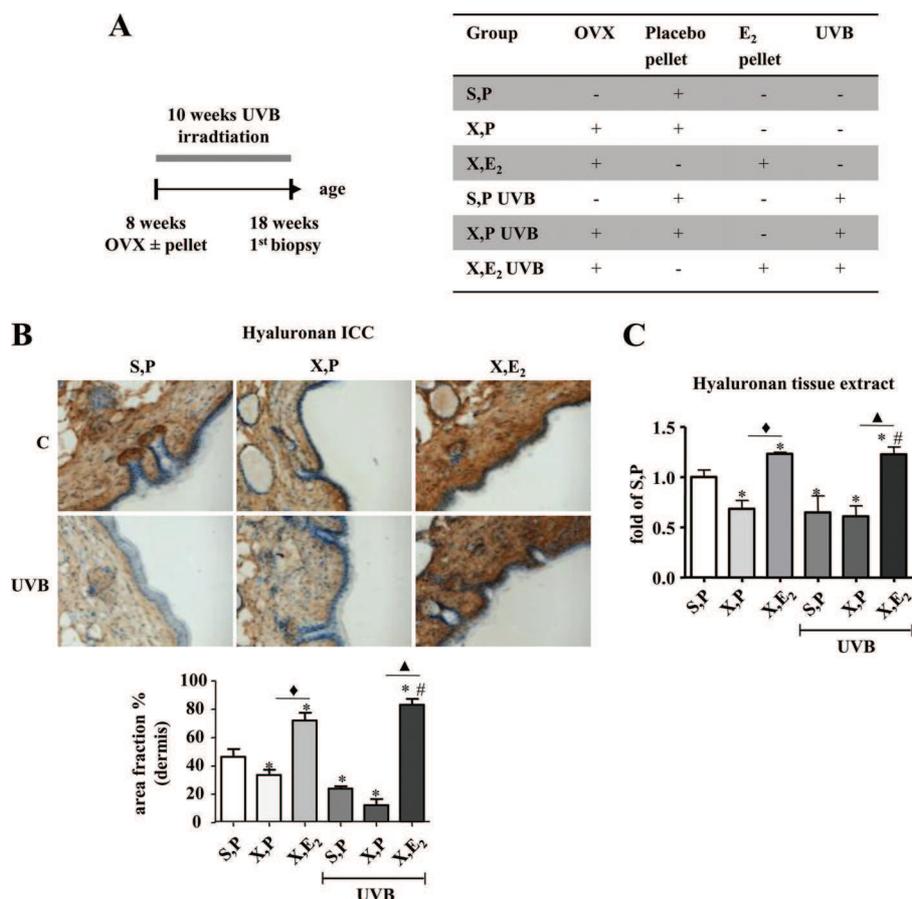


FIGURE 1. **Induction of HA by E₂ in vivo.** Hairless skh-1 mice were ovariectomized (OVX, X) at the age of 7–8 weeks or were sham-operated (S). Ovariectomized and sham-operated animals received either a subcutaneous placebo pellet (P) as control or a subcutaneous long release E₂ pellet (1.1 μ g E₂/day/mouse) (E₂). Subsequently, mice were subjected to UVB irradiation (three times 1 minimal erythema dose, weekly) for 10 weeks. At age of 18 weeks, skin biopsies were obtained, and the amount of HA was quantified. *A*, experimental protocol and abbreviations. *B*, affinity histochemistry of the skin using biotinylated bHABP and quantitative analysis (area fraction) of HA staining in the papillary dermis. *C*, measurement of HA in skin extracts using a bHABP-based kit. $\times 100$ magnification; $n = 7$ – 12 , mean \pm S.E.; *, $p < 0.05$ versus S,P; #, $p < 0.05$ versus S,P UVB; \blacklozenge , $p < 0.05$ versus X,P; \blacktriangle , $p < 0.05$ versus X,P UVB.

Determination of HA and EGF in Cell Culture Supernatants—HA concentration in the supernatants was determined using an HA test kit based on bHABP (Corgenix, Peterborough, UK) 24 h after stimulation and was normalized to total cellular protein. The EGF concentration in the supernatants was determined by EGF human ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's protocol 24 h after stimulation.

Immunoblotting—In equal aliquots of cell culture supernatants or skin extracts, versican was first enriched by DEAE ion exchange chromatography and was chondroitin ABC lyase-digested, and subsequently core proteins were separated on SDS-PAGE and Western blotted as described previously (26). LF99 (1:1000) was used as primary antibody.

HAS3 was detected by immunoblotting using anti-HAS3 antibody (H64, 1:1000 Santa Cruz Biotechnology) for murine samples and anti-HAS3 antibody (1:1000 Sigma) for human samples. β -Tubulin antibody was from Sigma (1:1000, Munich). MAC-2 was from Cedarlane (1:250, Burlington, Canada), and COX2 was from Cayman (1:1000, Ann Arbor, MI). Primary antibodies were detected by infrared fluorescent-coupled secondary antibodies (1:5000 LI-COR, Bad Homburg, Germany) allowing fluorescent detection using the LI-COR Odyssey Infrared Imaging System.

Determination of HA and EGF in Murine Skin—For HA extraction from murine skin, biopsies were lyophilized; the dry weight was determined, and samples were digested by Pronase (protease from *Streptomyces griseus*, 6 mg/ml in 100 mmol/liter Tris-HCl, pH 8, 1 mmol/liter CaCl₂, and 1500 units/ml heparin, 60 $^{\circ}$ C, 24 h; Sigma). HA was subsequently ethanol-precipitated (12 h, -20° C) and recovered by centrifugation (10,000 \times g , 4 $^{\circ}$ C, 15 min). Samples were diluted 1:20,000, and the HA concentration was determined by HA test kit based on bHABP (Corgenix, Peterborough, UK) and normalized to dry weight (27).

For determination of EGF, murine skin lysates were prepared by homogenization in modified RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% Triton X-100, 0.2% sodium deoxycholate, 0.2% SDS, 1 mM sodium EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μ g/ml aprotinin, 5 μ g/ml leupeptin). Tissue and cell debris was removed by centrifugation. EGF concentrations were determined by EGF mouse ELISA kit (Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's protocol. Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad).

Statistical Analysis—All data sets were analyzed by one-way analysis of variance and the Bonferroni post hoc test. Data pre-

Estradiol Protects Hyaluronan/Versican Matrix from UVB

sented in Fig. 5 were analyzed by Student's *t* test. Data are presented as means \pm S.E., and statistical significance was assigned at the level of $p < 0.05$.

RESULTS

E₂ Elevates Dermal HA in UVB-irradiated and Nonirradiated Skin—Hairless *skh-1* mice were ovariectomized to deplete endogenous sex hormones. The lack of E_2 was substituted in OVX mice by implantation of subcutaneous long release pellets (1.1 μ g E_2 /day/mouse). This nonirradiated group allowed the characterization of the effect of E_2 on the intrinsically aged dermal HA matrix at 18 weeks of age. OVX led to slightly reduced amounts of HA as shown by affinity histochemistry and biochemical quantification in skin extracts (Fig. 1, *B* and *C*). Of note, E_2 substitution substantially elevated dermal HA above the control level (S,P) suggesting a stimulatory effect of E_2 .

To investigate the role of estrogen during photoaging, *skh1* mice were irradiated with UVB (three times 1 minimal erythema dose (80 mJ/cm²), weekly) for 10 weeks. Subsequently, skin biopsies were collected from UVB-exposed areas. UVB-induced loss of dermal HA (S,P UVB) and again substitution of E_2 prevented the decline of HA (X, E_2 UVB) in a way that HA levels were even higher than those observed in nonirradiated, non-OVX controls (S,P, Fig. 1, *B* and *C*).

Dermal HAS3 Expression Is Responsive to E_2 in the Skin of UVB-irradiated and Nonirradiated Mice—To analyze the mechanisms that mediate the elevation of HA content in response to E_2 , mRNA expression of *Has* isoenzymes and hyaluronidases (*Hyal* 1 and 2) were analyzed. Of note, *Has3* mRNA expression was strongly induced by E_2 in nonirradiated and irradiated OVX mice (Fig. 2*A*). *HAS1* was significantly down-regulated in OVX mice that received UVB irradiation (X, P UVB). This effect was reversed by E_2 , which could therefore contribute to the recovery of HA matrix in E_2 -supplemented mice after irradiation (supplemental Fig. 2*A*). *Has2* by contrast was up-regulated after OVX (X, P), which could potentially counteract the loss of HA to some extent. The other conditions examined did not affect *Has2* expression (supplemental Fig. 2*B*). Therefore *Has3* was considered as the most important HAS isoenzyme mediating the recovery of HA matrix after E_2 substitution. Increased *Has3* expression in response to E_2 was also validated at the protein level by immunocytochemistry and immunoblotting. As a result, HAS3 protein detection confirmed the regulation of *Has3* mRNA (Fig. 2, *B* and *C*) by E_2 . Western blot analysis detected an additional band below the predicted size of HAS3 (63 kDa). The identity of the band is not known, but the detected protein showed the same expression pattern as the mature HAS3.

Nonirradiated skin also showed induction of *Hyal2* in response to OVX (supplemental Fig. 2*D*), which was prevented by E_2 substitution and could therefore contribute to decreased HA content in response to OVX and the increase of HA in response to E_2 treatment. *Hyal1* was not regulated in a fashion that could explain the observed changes in dermal HA (supplemental Fig. 2*C*). Finally, expression of the HA receptors CD44 and receptor of HA-mediated motility (*Rhamm*) were determined by real time RT-PCR (supplemental Fig. 2, *E* and *F*). *Cd44* expression was found to be unresponsive to both OVX/ E_2

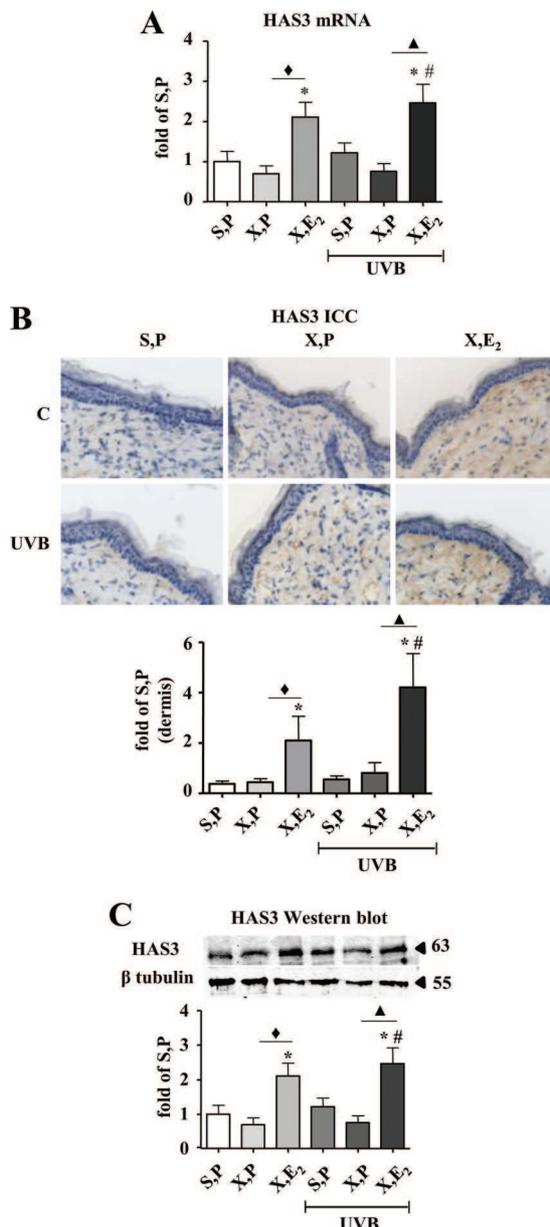


FIGURE 2. Induction of HAS3 by E_2 in vivo. HAS3 expression was determined in skin biopsies of hairless *skh-1* mice that were treated as detailed in Fig. 1. At the age of 18 weeks, skin biopsies were obtained, and the amount of HAS3 was analyzed. *A*, *Has3* mRNA expression in skin extracts. *B*, HAS3 immunostaining and quantitative image analysis of the papillary dermis. The 63-kDa band was quantified by densitometry and related to tubulin loading control (55 kDa). *C*, HAS3 immunoblotting (H64) of total skin extracts and quantitative analysis. $\times 100$ magnification; $n = 7-12$, mean \pm S.E.; *, $p < 0.05$ versus S,P; #, $p < 0.05$ versus S,P UVB; \diamond , $p < 0.05$ versus X,P; \blacktriangle , $p < 0.05$ versus X,P UVB.

and to UVB irradiation. *Rhamm*, however, was down-regulated by UVB irradiation in OVX animals, and E_2 substitution partially restored expression, suggesting that HA signaling via RHAMM is responsive to E_2 .

Quantitation of E_2 receptors by real time RT-PCR revealed that $E2R\beta$ was not detectable in the dermis of female hairless *skh-1* mice in any of the experimental groups (data not shown). In contrast, the $E2R\alpha$ receptor (supplemental Fig. 2*G*) was highly abundant, but expression was not affected by any of the experimental interventions. These data suggest that the effects of E_2 were mediated by the $E2R\alpha$ receptor.

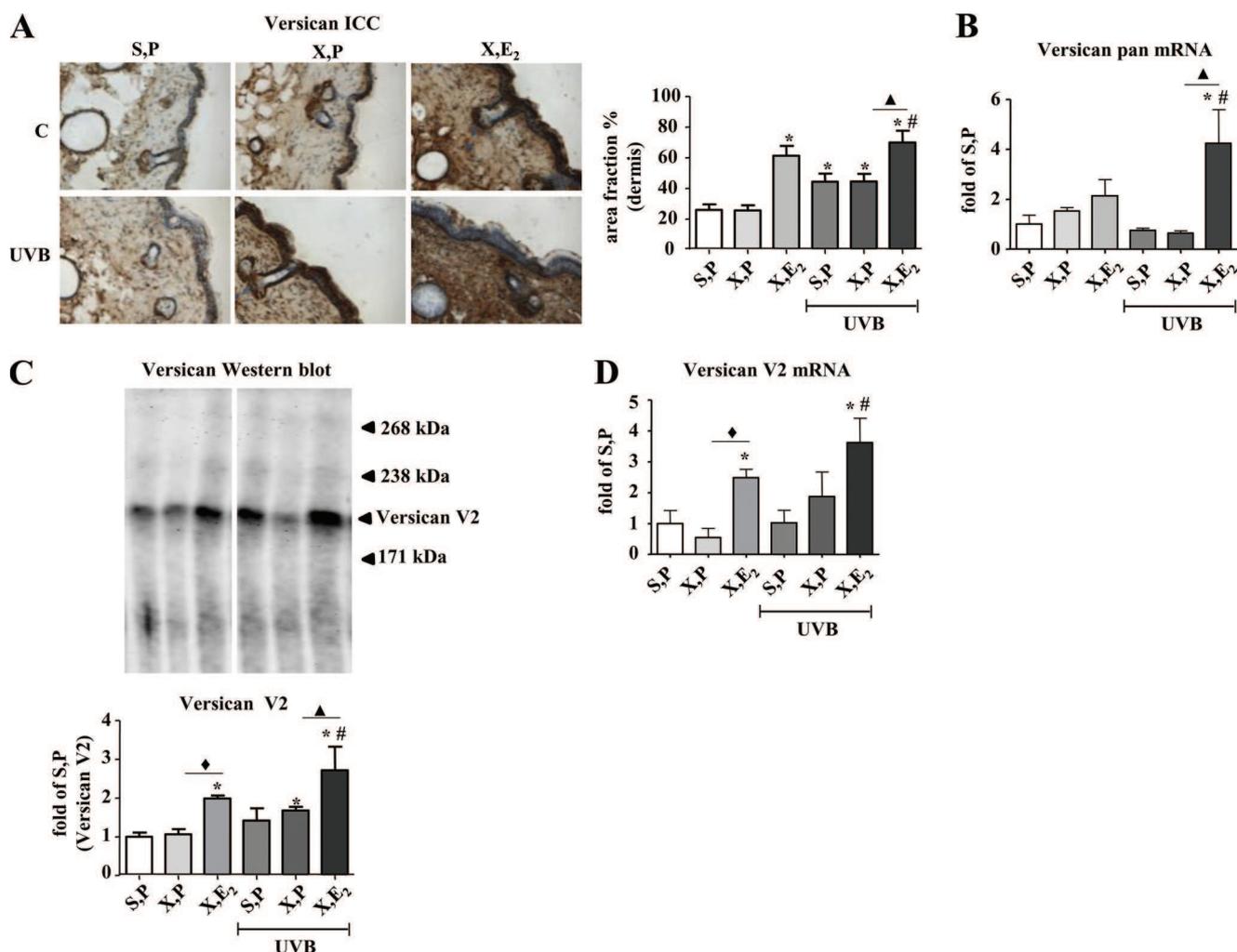


FIGURE 3. **Up-regulation of versican in response to E₂ in vivo.** Versican expression was determined in skin biopsies from hairless skh-1 mice that were treated as detailed in Fig. 1. At age of 18 weeks, skin biopsies were obtained, and the amount of versican was analyzed. *A*, pan-versican immunostaining and quantitative image analysis. *B*, mRNA expression of pan-Versican in skin extracts. *C*, pan-versican immunoblotting (LF99) from skin extracts (equal aliquots) and quantitative analysis of the main band (V2) between 238 and 171 kDa. *D*, Versican V2 mRNA expression in skin extracts. $\times 100$ magnification; $n = 7-12$, mean \pm S.E.; *, $p < 0.05$ versus S,P; #, $p < 0.05$ versus S,P UVB; ◆, $p < 0.05$ versus X,P; ▲, $p < 0.05$ versus X,P UVB.

E₂ Up-regulates Versican Content in Dermal Matrix—Subsequently, the regulation of the HA-binding proteoglycan versican was characterized. Immunostaining of versican revealed that OVX did not affect versican but that substitution of E₂ caused marked dermal versican accumulation in nonirradiated skin (X,E₂, Fig. 3A). Furthermore UVB irradiation itself raised the versican content of the dermis in the immunohistochemical staining (Fig. 3A), and this was further increased by E₂. Four splice variants of versican (V₀, V₁, V₂, and V₃) are known. To obtain a read-out of the overall versican mRNA expression, a primer that did not distinguish between the splicing variants was initially used. The mRNA expression of pan-Versican was not changed or even decreased in response to UVB (Fig. 3B), but a trend toward up-regulation was seen in X,E₂ samples, which reached statistical significance in UVB irradiated X,E₂ mice. Immunoblotting of versican in skin extracts revealed a major versican band at ~ 200 kDa, which likely represented the versican splice variant V2 (Fig. 3C) and closely resembled the regulation of versican as evidenced by immunostaining. Therefore, mRNA expression of Versican V2 was analyzed by real

time RT-PCR (Fig. 3D) and found to parallel the protein data shown in Fig. 3, A and C.

Comparable changes in versican expression were also determined in the epidermis by quantitation of immunostainings (data not shown) suggesting a similar response to E₂ in the epidermis. Therefore, part of the data from whole skin extracts (mRNA and immunoblotting) also reflect increased epidermal versican. In contrast, regulation of HAS3 was not detected in the epidermal compartment (data not shown). Future studies may address the effect of E₂ and versican specifically in the epidermis.

Thus, dermal HA and versican were markedly increased by E₂ in both nonirradiated and irradiated skin. Furthermore, the data suggest that HAS3 and versican V2 are the molecular targets of this regulation. With respect to quantitative remodeling, the UVB-irradiated dermal matrix of OVX mice is characterized by a proportional loss of HA and an increase in versican.

Effects of E₂ on HAS Isoenzymes and Versican in Dermal Fibroblasts in Vitro—The above described *in vivo* results suggest a strong effect of exogenous E₂ on the dermal HA and

Estradiol Protects Hyaluronan/Versican Matrix from UVB

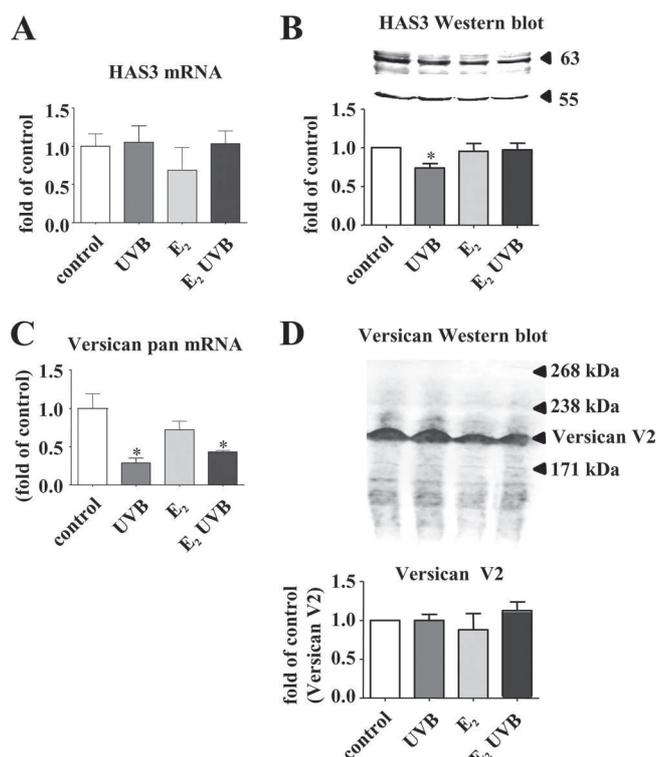


FIGURE 4. HAS3 and versican expression in human skin fibroblasts in response to UVB and E₂. Fibroblasts were either untreated, received a single dose of 100 mJ/cm² UVB, or 100 nM E₂, or both and were analyzed after 24 h. *A*, HAS3 mRNA; *B*, HAS3 immunoblotting (Sigma) and quantitative analysis in relation to tubulin as loading control (55 kDa); *C*, pan-*VERSICAN* mRNA expression; *D*, pan-versican immunoblotting (LF99, equal aliquots) and quantitative analysis of versican V2; *n* = 3–6, mean ± S.E.; *, *p* < 0.05 versus control.

versican matrix. In search of the underlying regulatory mechanisms, two possibilities were considered. First, direct transcriptional effects of E₂ on *HAS* isoenzymes and *VERSICAN* in fibroblasts may be responsible. Second, indirect effects of E₂ on the expression of growth factors that may in turn affect gene expression could be involved. Therefore, it was tested whether the *HAS* isoenzymes and *VERSICAN* are responsive to E₂ and UVB *in vitro*. In monolayer cultures of human skin fibroblasts, *HAS3* mRNA was not affected by either UVB or E₂ (Fig. 4A), although *HAS3* immunoblotting even suggested a slight decrease of *HAS3* protein after UVB exposure (Fig. 4B). pan-*VERSICAN* mRNA was down-regulated in response to UVB and UVB + E₂ (Fig. 4C). However, immunoblotting of versican from supernatants revealed no effect on versican V2 expression (Fig. 4D). Therefore, in contrast to the *in vivo* results, *HAS3* and versican were clearly not directly induced by E₂ in fibroblasts *in vitro*. Next, concentration-dependent responses of fibroblasts exposed to E₂ and UVB were examined by real time RT-PCR. Using 0.1, 1, 10, and 100 μM E₂ revealed that *HAS3* mRNA was not regulated, whereas *HAS1* and *HAS2* mRNA were even down-regulated in fibroblasts 24 h after stimulation (data not shown). Application of 10, 50, and 100 mJ UVB/cm² led to down-regulation of *HAS1* and *HAS2* at 100 mJ/cm² and a weak reduction of *HAS3* mRNA at 10 mJ/cm² (data not shown). The transcriptional down-regulation of all three *HAS* isoenzymes in response to direct UVB irradiation of fibroblasts could potentially be related to the loss of HA in response to UVB *in vivo*.

However, *in vivo* only *Has1* mRNA was slightly reduced in UVB-irradiated skin of X,P mice (supplemental Fig. 2, *A* and *B*). With respect to pan-*VERSICAN* mRNA expression, dose responses revealed that only 100 nM E₂ inhibited expression as seen in Fig. 4C, whereas lower concentrations had no effect (data not shown). After UVB irradiation, a small increase of pan-*VERSICAN* mRNA expression (1.39 ± 0.15-fold, *p* < 0.05 compared with control, *n* = 3) was detected at 10 mJ/cm², followed by significant inhibition by 100 mJ/cm² as presented in Fig. 4C. All considered, in cultured fibroblasts neither the estrogen response nor the acute UVB response mimicked the results obtained *in vivo*. Therefore, a direct regulation of the involved genes in fibroblasts by E₂ and UVB appeared unlikely to be responsible for the induction of HA and versican *in vivo* in response to E₂.

EGF Is Induced in Keratinocytes in Response to E₂ and Induces HAS3 and Versican Expression in Fibroblasts—Next, a possible paracrine mechanism was addressed. For this purpose, skin biopsies were examined with regard to differential regulation of growth factors known to be involved in the regulation of the HA matrix. Specifically, it was searched for candidates that were diminished by OVX and increased by E₂ substitution both in nonirradiated and irradiated skin. *Egf* was identified as one candidate that showed reduced mRNA expression in OVX mice, which could be rescued by E₂ in both nonirradiated and UVB-irradiated mice (Fig. 5D). *Egf* protein expression was therefore quantified in skin extracts by ELISA (Fig. 5E) confirming the induction by E₂ in nonirradiated and irradiated OVX animals. Furthermore, expression of *EGF* protein specifically in the epidermis was determined by immunostaining (Fig. 5F). The results confirmed that *EGF* is indeed induced in the epidermis and in total skin extracts by E₂. In contrast, *Tgfb1–3* mRNA patterns did not correlate with the changes of HA, *HAS3*, and versican V2 in response to E₂. Therefore, *EGF* was considered as the most promising candidate for a paracrine mediator released in response to E₂ from keratinocytes that may in turn regulate *HAS3* and versican V2 in dermal fibroblasts.

The effect of *EGF* on dermal fibroblasts was subsequently examined *in vitro*. Fig. 6 shows that *EGF* induces *HAS3* mRNA, *HAS3* protein, and HA synthesis in skin fibroblasts (Fig. 6, *A–C*). On the immunoblots, the same lower molecular weight band as described in Fig. 2C was detected. Quantification (data not shown) revealed the same regulation of this smaller protein as the mature *HAS3*. Furthermore, *EGF* induced total *VERSICAN* mRNA (Fig. 6D), versican V2 protein (Fig. 6E), and *VERSICAN V2* mRNA (Fig. 6F). Next, it was addressed whether UVB and E₂ affect the release of *EGF* from keratinocytes. Of note, E₂ induced expression and release of *EGF* in both nonirradiated and irradiated keratinocytes (Fig. 7, *A* and *B*) as determined by quantitative real time RT-PCR and ELISA. In dermal fibroblasts *EGF* expression was not stimulated by E₂ and UVB under the current experimental conditions (data not shown). Next, conditioned medium derived from keratinocytes exposed to E₂ and E₂ plus UVB was used to stimulate dermal fibroblasts as illustrated in Fig. 7C. The conditioned medium from keratinocytes exposed to E₂ and E₂ plus UVB was found to induce *HAS3* and *VERSICAN V2* mRNA expression (Fig. 7, *D* and *E*).

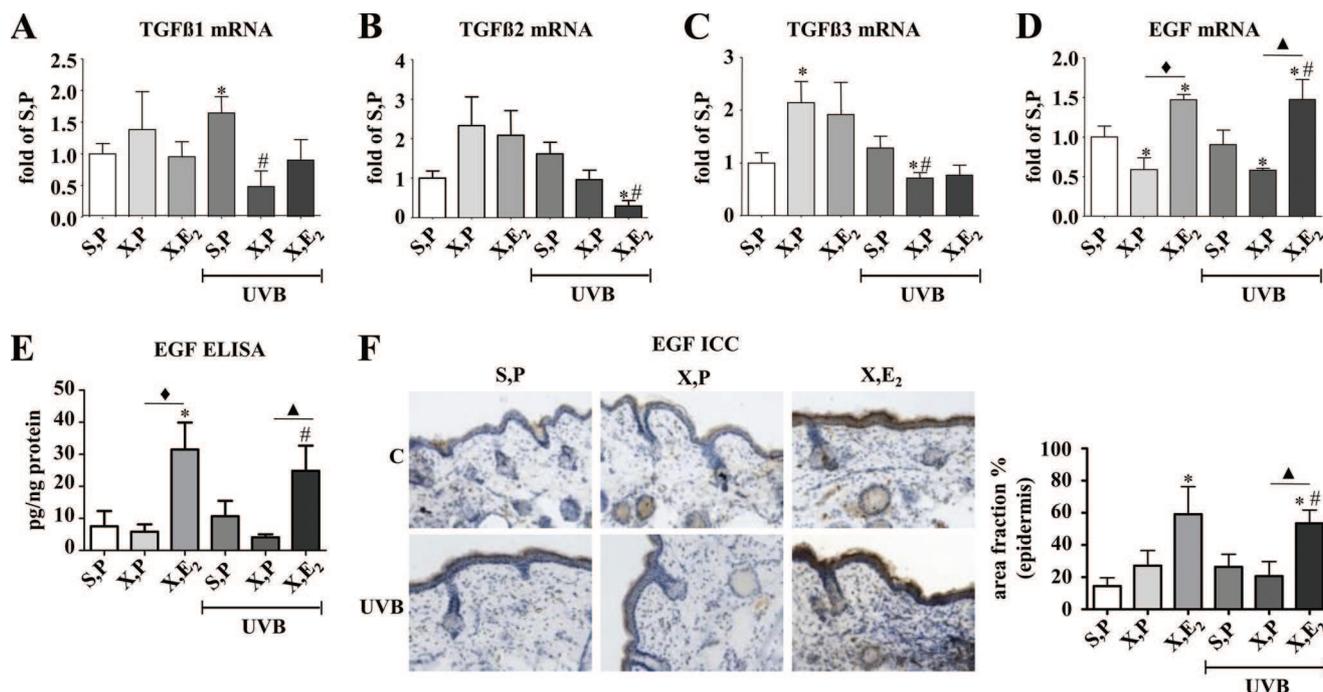


FIGURE 5. **Gene expression profile in skin biopsies in response to UVB and E₂.** Mice were treated as detailed under "Experimental Procedures" and in the legend of Fig. 1. Skin biopsies were obtained at 18 weeks of age, and mRNA expression was determined by real time RT-PCR. *A*, *Tgfb1*; *B*, *Tgfb2*; *C*, *Tgfb3*; *D*, *Egf*; *E*, EGF protein in skin extracts determined by ELISA; *F*, EGF immunostaining and quantitative image analysis specifically of the epidermis. $\times 100$ magnification; $n = 5-12$, mean \pm S.E.; *, $p < 0.05$ versus S,P; #, $p < 0.05$ versus S,P UVB; \blacklozenge , $p < 0.05$ versus X,P; \blacktriangle , $p < 0.05$ versus X,P UVB.

The induction of HAS3 mRNA and versican V2 mRNA was blocked by both an EGF receptor kinase inhibitor, erlotinib, and by a neutralizing antibody against EGF (Fig. 7, *D* and *E*). Furthermore, the supernatants of E₂-treated keratinocytes stimulated the proliferation of fibroblasts as determined by [³H]thymidine incorporation (Fig. 7*F*). This pro-proliferative effect of conditioned medium from E₂-stimulated keratinocytes was EGF-dependent because erlotinib and a neutralizing antibody against EGF were able to block the effect (Fig. 7*F*). Next, it was tested whether HAS3 induction might be responsible for this pro-proliferative effect. Indeed, lentiviral knockdown of HAS3 (suppression of HAS3 mRNA to 0.6 ± 0.1 -fold of scrambled control, $p < 0.05$, $n = 6$) prohibited proliferative response in fibroblasts induced by the conditioned keratinocyte medium (Fig. 7*G*). Therefore, it is proposed (i) that E₂ induces expression and release of EGF from keratinocytes *in vivo* and (ii) that EGF induces in a paracrine manner HAS3, HA, and versican expression in fibroblasts of the papillary dermis.

Differential Effects of E₂ on Dermal Cell Proliferation and Inflammation—Next, it was attempted to link the specific changes of dermal HA and versican to functional effects in the dermis during photoaging. The proliferation of dermal fibroblasts as determined by Ki-67 immunostaining and mRNA expression was increased by E₂ both in nonirradiated and in UVB-irradiated skin (Fig. 8, *A* and *B*). This was further supported by the induction of *Tpx2* (microtubule-associated homolog) mRNA expression, which is also indicative for proliferative activity (Fig. 8*C*). HA and versican are both thought to contribute to proliferation of dermal fibroblasts (see Fig. 7*G*). It is conceivable that this proliferative response to E₂ is in part due to HA synthesis via HAS3 and possibly also increased versican V2.

It has been suggested that HA plays a role in inflammation either as a result of generation of HA fragments or the formation of supramolecular complexes of HA and HA-binding proteins that form HA cables and allow monocyte/macrophage adhesion. Interestingly, in the UVB-irradiated dermis of OVX mice, which contained a reduced amount of HA and an elevated amount of versican, Mac-2 immunostaining, immunoblotting, and mRNA expression, indicative for macrophage content, were increased (Fig. 9, *A-C*). Furthermore, *Mac-2* mRNA and protein expression were strongly reduced by E₂ suggesting an anti-inflammatory effect of E₂ during skin aging (Fig. 9, *A-C*). To further support this hypothesis, the expression profiles of the chemokines and cytokines *Mcp-1*, *IL6*, and *Tnfa* were analyzed and found to be suppressed in at least one of the E₂-treated groups (Fig. 9, *D-F*). Finally, the expression of inducible cyclooxygenase 2 (*Cox2*) was analyzed as an indicator of inflammatory activity. *Cox2* mRNA expression and protein expression (data not shown) were also strongly suppressed by E₂ (Fig. 9*G*). In summary, the *in vivo* data are consistent with a pro-proliferative and anti-inflammatory effect of estrogen that coincided with induction of both HAS3, HA, and versican in UVB-irradiated skin (Fig. 10).

DISCUSSION

Estrogen has been known for a long time to have beneficial effects on the skin, which is particularly obvious after the onset of menopause or the initiation of estrogen treatment of postmenopausal women (21). Estrogens partially protect from skin aging by increasing thickness, reducing the wrinkling, and augmenting the moisture of the skin (28–30). It has been demonstrated that estrogen treatment prevents loss of collagen type 1 and increases *de novo* collagen synthesis (31). Furthermore,

Estradiol Protects Hyaluronan/Versican Matrix from UVB

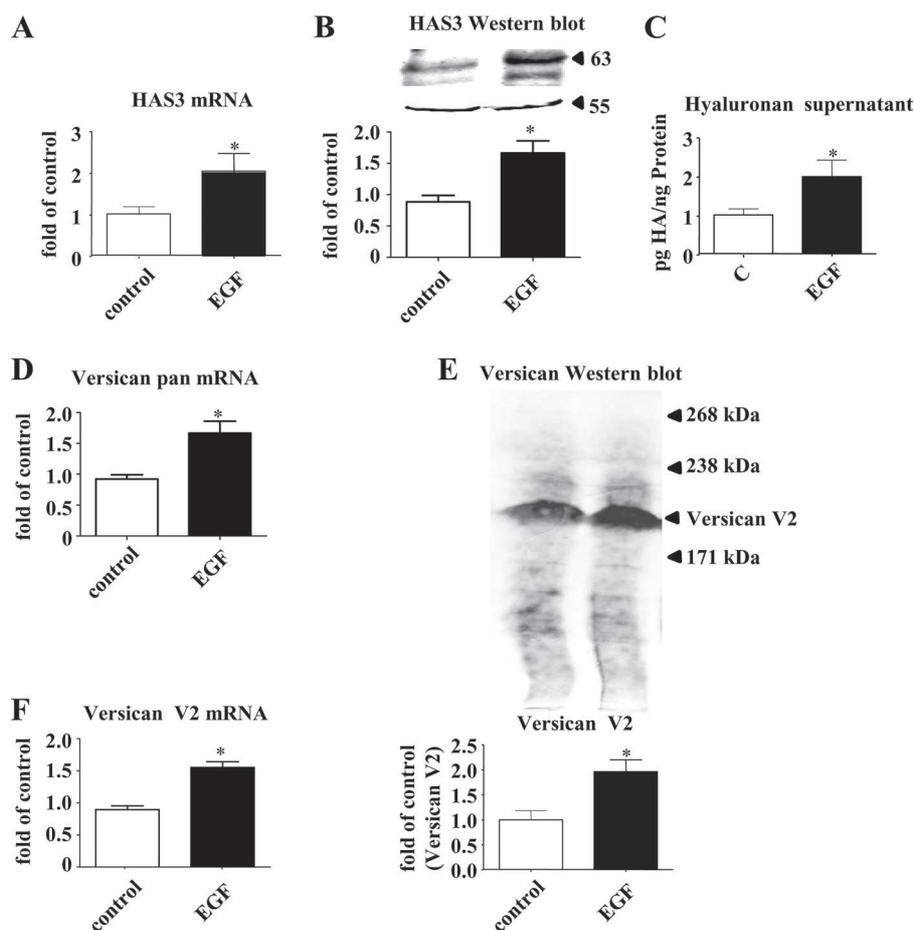


FIGURE 6. **HAS3 and versican expression in human fibroblasts in response to EGF.** Human skin fibroblasts were stimulated with EGF (10 ng/ml) for 24 h. *A*, *Has3* mRNA expression; *B*, HAS3 immunoblotting (Sigma) and quantitative analysis; *C*, HA secreted into the medium during 24 h after stimulation with EGF; *D*, pan-*VERSICAN* mRNA expression; *E*, pan-versican immunoblotting (LF 99, equal aliquots) and quantitative analysis; *F*, *VERSICAN V2* mRNA expression. $n = 3-6$, mean \pm S.E.; *, $p < 0.05$ versus control.

estrogens increase dermal glycosaminoglycans, which in turn may contribute to the thickness and moisture of the skin (32–34). Loss of HA from the skin appears to be part of the postmenopausal aging response. In male mice, the administration of estrogen increases HA content of the skin (35). However, systematic animal studies in females addressing the regulatory effect of estrogens on dermal HA, HAS isoenzymes, HA receptors, and hyaluronidases and importantly the underlying molecular mechanisms are lacking. Furthermore, to date nothing is known about how E_2 may regulate the content and function of HA and versican in the skin. Therefore, the aim of this study was to investigate changes of HA, HAS isoenzymes, hyaluronidases, HA receptors, and the HA-binding proteoglycan versican in the context of photoaging and E_2 .

This study clearly shows that E_2 is a strong inducer of dermal HA and versican in both nonirradiated skin and UVB-irradiated skin in hairless *skh-1* mice. Moreover, HAS3 was identified as the responsible target and therefore an important E_2 -dependent regulator of dermal HA homeostasis during intrinsic and extrinsic skin aging.

E_2 mediates changes in gene expression by activation of intracellular $E2R\alpha$ and $-\beta$, which translocate into the nucleus upon ligand binding and affect the expression of genes with estrogen response elements in the promoter region. In addition,

nongenomic E_2 effects occur through the GPR30 pathway (36). It has been shown that both $E2R\alpha$ and $-\beta$ are expressed in the skin and specifically in skin fibroblasts (21). However, considerable variability appears with respect to the ratio of both ER subtypes in various organs, ages, and species (37, 38). Therefore, the expression of $E2R\alpha$ and $-\beta$ was determined by real time PCR in hairless *skh-1* mice. The $E2R\alpha$ receptor was strongly expressed in the skin biopsies, whereas the $E2R\beta$ receptor was not detectable. Therefore, the above mentioned effects of E_2 on dermal HA and versican during photoaging were attributed to $E2R\alpha$. However, the contribution of nongenomic effects cannot be excluded.

Because the *in vivo* experiments suggested that induction of HAS3 and versican V2 expression likely played a key role in the estrogen response during photoaging, it was addressed whether E_2 directly induced these genes in fibroblasts. However, no evidence for direct transcriptional induction of *HAS3* and *VERSICAN V2* gene expression by E_2 was found. As an alternative explanation, the induction of paracrine factors by E_2 that subsequently induce expression of *HAS3* and *VERSICAN* appeared plausible. This hypothesis is in line with the report that E_2 indeed affects dermal ECM via paracrine mechanisms *in vivo*. It has been shown that postmenopausal loss of collagen

Estradiol Protects Hyaluronan/Versican Matrix from UVB

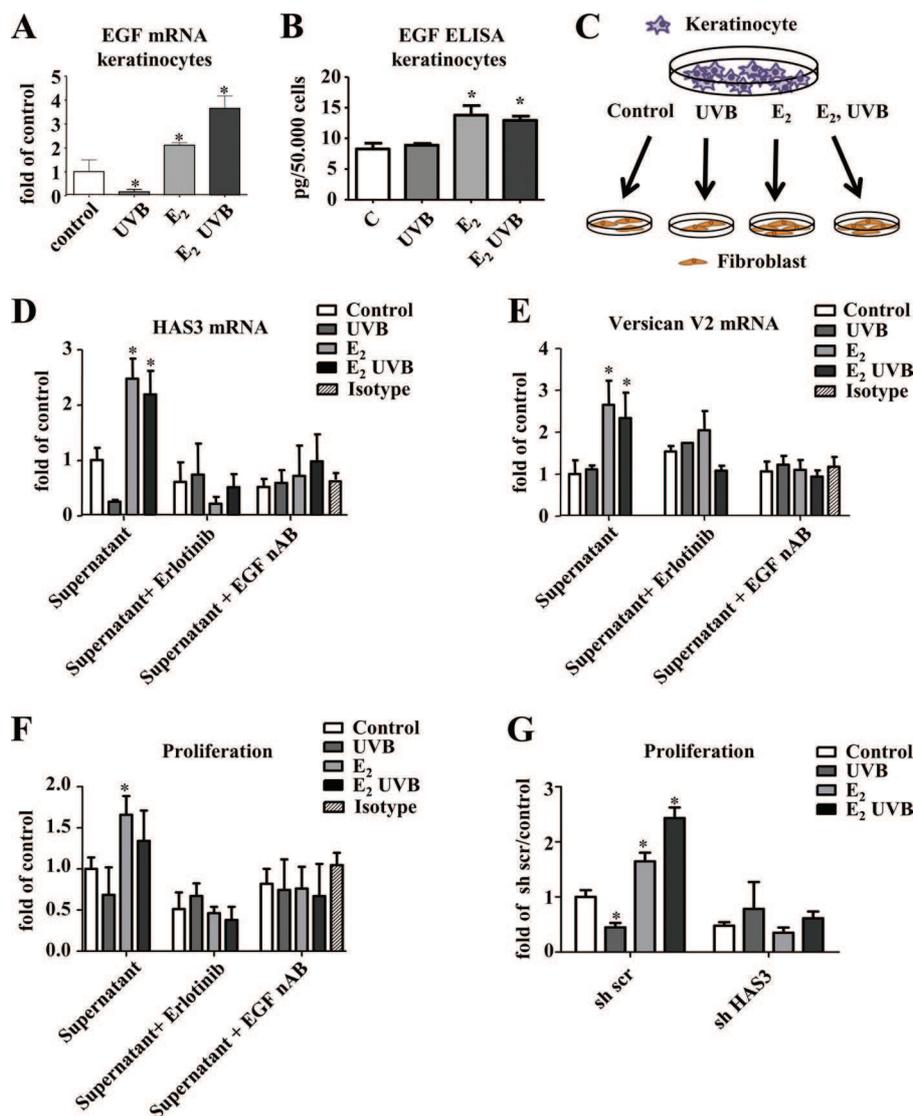


FIGURE 7. **EGF release from keratinocytes in response to E₂ and UVB.** A, keratinocytes were treated with 100 nM E₂, 100 mJ/cm² UVB, or both. After 24 h, EGF mRNA expression was analyzed by real time RT-PCR. B, EGF protein was determined by ELISA in cell culture supernatants of keratinocytes treated as described in A. C, schematic representation of the experiments shown in D–G using keratinocyte-conditioned medium to investigate paracrine EGF effects. D and E, supernatants as shown in B were used to stimulate human skin fibroblasts. After 24 h, HAS3 mRNA expression and VERSICAN V2 mRNA expression were determined by real time RT-PCR in the presence or absence of 3 μM erlotinib, EGF neutralizing antibody (EGF nAB, 0.35 μg/ml), or isotype control IgG (0.35 μg/ml). F, cell culture supernatants as in B were used to stimulate fibroblasts. [³H]Thymidine incorporation was determined as a measure of DNA synthesis and proliferation; G, [³H]thymidine incorporation in response to the supernatants as in B in fibroblasts pretreated with scrambled or HAS3-targeting lentiviral shRNA; n = 3–6, mean ± S.E.; *, p < 0.05 versus control.

might be due to lack of E₂-mediated expression of transforming growth factor β1 (TGFβ1) (39).

Here, EGF displayed an expression pattern in response to E₂ substitution that paralleled the changes of HA and HAS3 both in photoaged skin and in nonirradiated skin. Specifically, EGF mRNA and protein showed a trend to reduced expression by OVX and strong induction by E₂. EGF is known to induce the expression of HAS2 and HAS3 in keratinocytes, thereby promoting the pro-proliferative and migratory response to EGF (40, 41). Because skin extracts were used to determine EGF mRNA and protein, which reflect epidermis plus dermis, both keratinocytes and fibroblasts might be the source of EGF in response to E₂. However, immunostaining of EGF already suggested a pronounced EGF response in the epidermis. The *in vitro* experiments confirmed that E₂ indeed induced EGF

expression in keratinocytes but not in dermal fibroblasts (data not shown). Subsequently, EGF released *in vitro* in response to E₂ and UVB from keratinocytes was shown to stimulate HAS3, versican V2 expression, and proliferation in human skin fibroblasts. The pro-proliferative effect was shown to be dependent on EGF and HAS3 as shown by EGF inhibitors and lentiviral transduction with shHAS3. Therefore, it is proposed that E₂ stimulates keratinocytes to release EGF, which in turn induces HAS3 and versican V2 expression in dermal fibroblasts. The limitation of the *in vitro* experiments is that they reflect an acute response to single UVB irradiation, whereas *in vivo* repetitive chronic dosing of UVB was applied. However, the results are in agreement with the observation in other biologic systems that EGF is involved in various estrogen-induced responses (42, 43) or mimics E₂ responses (44) both *in vitro* and *in vivo*.

Estradiol Protects Hyaluronan/Versican Matrix from UVB

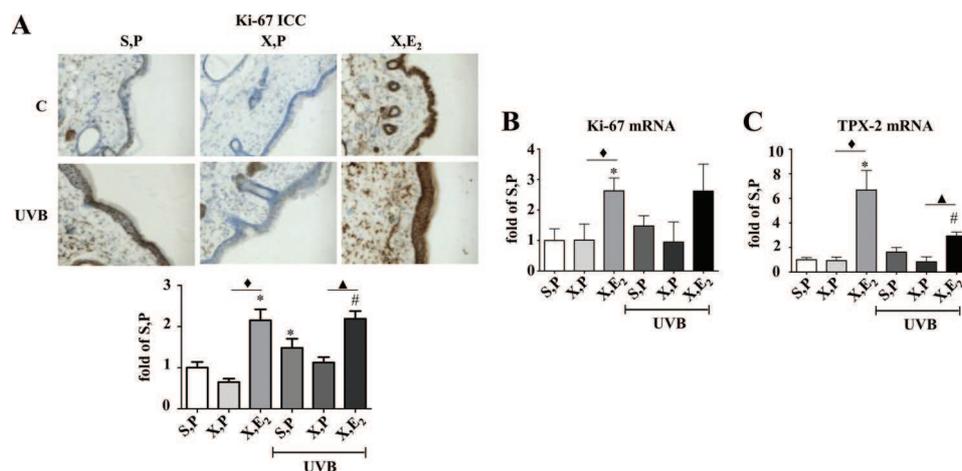


FIGURE 8. **Proliferative responses to E₂ and UVB *in vivo*.** The proliferative response was analyzed in the dermis of skin biopsies derived from 18-week-old hairless *skh-1* mice treated as described in the legend of Fig. 1. *A*, Immunohistochemistry of Ki-67 and quantitative analysis of the papillary dermis; *B*, *Ki67* mRNA expression; *C*, *TPX-2* mRNA expression. $\times 100$ magnification; $n = 3-12$, mean \pm S.E.; *, $p < 0.05$ versus S,P; #, $p < 0.05$ versus S,P UVB; ♦, $p < 0.05$ versus X,P; ▲, $p < 0.05$ versus X,P UVB.

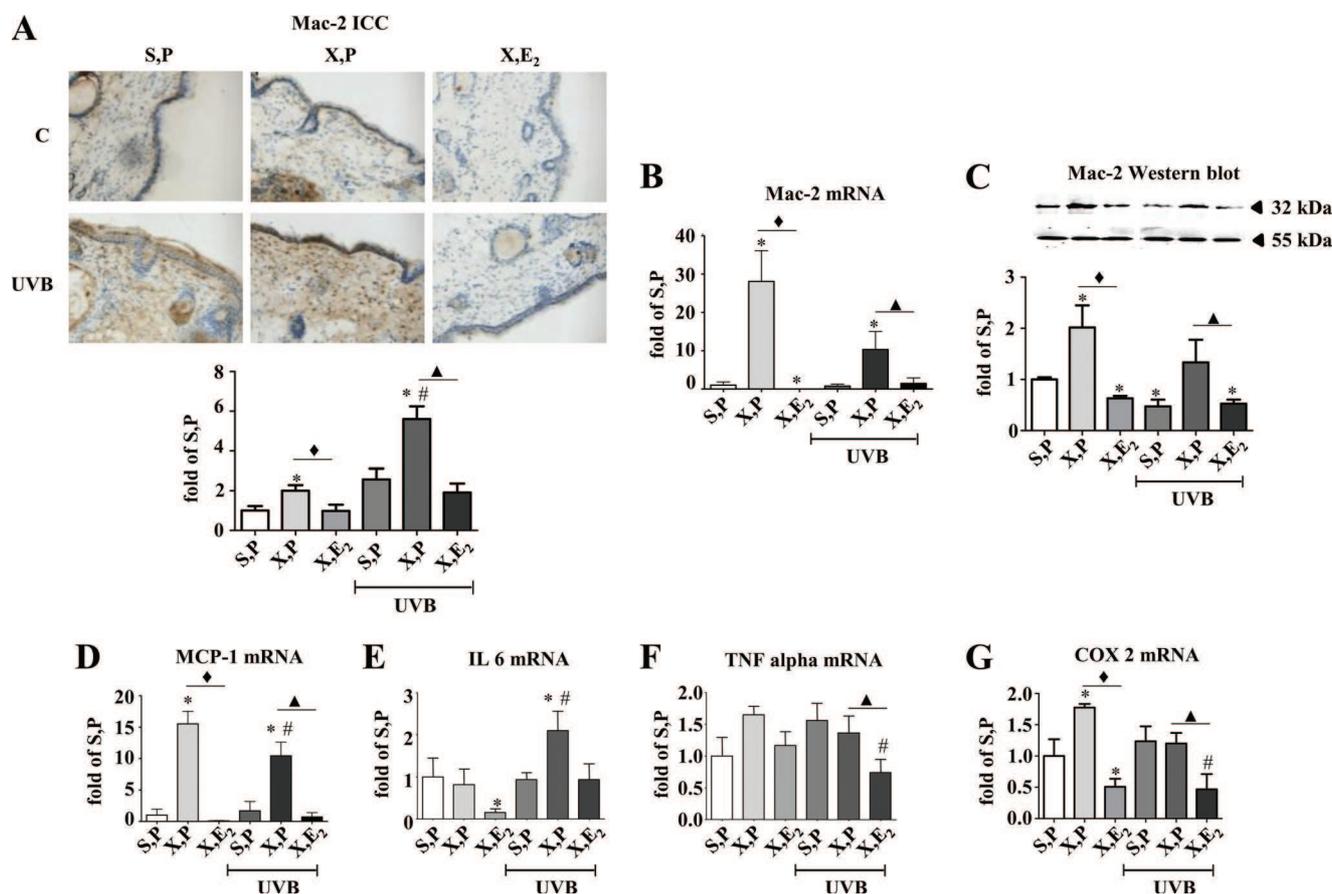


FIGURE 9. **Inflammatory responses to E₂ and UVB *in vivo*.** The inflammatory response was analyzed in the dermis of skin biopsies derived from 18-week-old hairless *skh-1* mice treated as described in the legend of Fig. 1. *A*, Immunostaining of Mac-2 as marker of inflammatory macrophages; *B*, *MAC-2* mRNA expression; *C*, *Mac-2* immunoblotting and quantification related to tubulin as loading control (55 kDa); *D*, *MCP-1* mRNA expression; *E*, *IL6* mRNA expression; *F*, *TNF α* mRNA expression; *G*, *COX 2* mRNA expression as an inducible gene associated with inflammation and release of inflammatory chemokines and cytokines. $\times 100x$ magnification; $n = 3-12$, mean \pm S.E.; *, $p < 0.05$ versus S,P; #, $p < 0.05$ versus S,P UVB; ♦, $p < 0.05$ versus X,P; ▲, $p < 0.05$ versus X,P UVB.

These findings might also be relevant with respect to the aged phenotype of fibroblasts. Interestingly, age-associated resistance to phenotypic activation of fibroblasts is accompanied by reduced HA synthesis and the failure to up-regulate HA in response to growth factors (45). EGF appears to be involved in this process, because EGF signaling is critically required for

TGF β 1-induced HA synthesis (46, 47). Furthermore, fibroblast proliferation is stimulated by EGF, and in aging fibroblasts this proliferative response declines partly due to down-regulation of the EGF receptor (48, 49). Thus, EGF is a growth factor that opposes the aging phenotype of dermal fibroblasts, and this response involves in part HA synthesis and signaling. It is there-

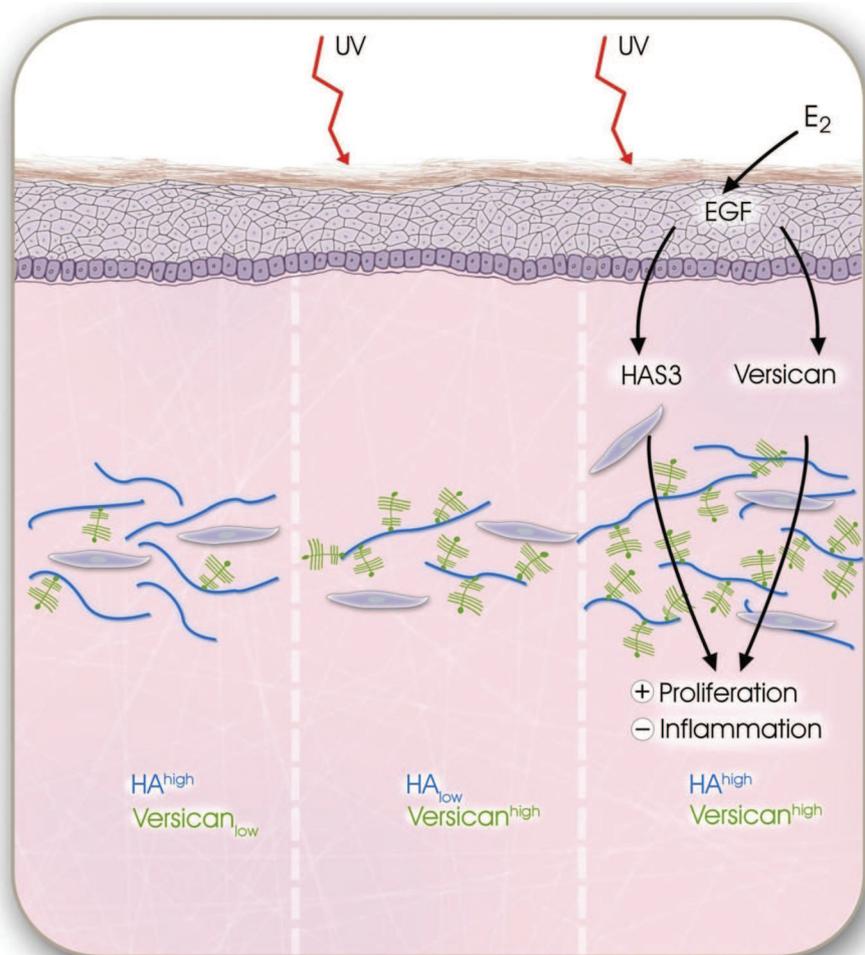


FIGURE 10. **UVB and E₂-mediated remodeling of dermal matrix during extrinsic aging.** Schematic summary of the working hypothesis that was deduced from the presented data is shown. After chronic UVB exposure, the dermal matrix undergoes remodeling from HA-rich and versican-poor matrix with low proliferative and low inflammatory activity (*left panel*) to a HA-low and versican-rich ECM characterized by low proliferative but high inflammatory activity (*middle panel*). E₂ via paracrine release of EGF from the epidermis up-regulates HAS3 and versican that cause transition into HA-rich and versican-rich dermal matrix with higher proliferative activity and reduced skin inflammation. This E₂-mediated matrix remodeling partially overwrites the UVB-induced degeneration of the dermal matrix possibly setting the stage for skin regeneration due to increased pro-proliferative activity and by inhibition of inflammatory responses.

fore likely that induction of EGF in keratinocytes by E₂ and paracrine stimulation of HAS3 and versican V2 in dermal fibroblasts is involved in the attenuation of the aged fibroblast and skin phenotype by E₂.

In vitro studies have to date provided ample information about the function of individual single matrix components, including collagens, HA, HAS isoenzymes, and versican. However, it is obvious that during physiologic and pathophysiologic responses, changes in matrix composition occur that simultaneously involve multiple matrix molecules. This dramatically affects the cellular microenvironment. Yet cellular responses likely represent the consequences of the combined effects of these complex changes. These include alterations in micromechanic forces and matrix receptor signaling through integrins, the HA receptors CD44 and RHAMM, and activation of alternative receptors by degraded matrix molecules such as toll-like receptors that mediate “danger signals” (50). Therefore, a possibly important finding of this study was that photoaging resulted in a dermal matrix characterized by low HA content and high versican content. At present, it is unknown what the consequence of this shift in the relative abundance of HA and

versican may be for the phenotype of cells and the aged phenotype of the skin. It is remarkable, however, that treatment with E₂ increases both HA and versican resulting in a matrix with high HA and high versican content. Versican has four splicing variants that are characterized by loss of glycosaminoglycan-bearing domains and therefore major differences in molecular weight and chondroitin sulfate content (51). The functions of the different splice variants appear to differ, in part opposing each other, in various biologic systems (52). The presented data point toward versican V2 as the target of E₂/EGF-mediated regulation in the skin. Although the dermal function of versican V2 has not been addressed, in the central nervous system it has been suggested to regulate matrix assembly (53). Therefore, versican V2 might be an interesting candidate for regulating matrix assembly and function in skin homeostasis and skin aging.

In this study, the proliferative capacity of fibroblasts in the dermis was positively correlated with increased HA and versican content after E₂ treatment. This is in line with the hypothesis that pericellular matrix consisting of both pericellular HA and versican promotes proliferation (20). *In vitro* knockdown of

Estradiol Protects Hyaluronan/Versican Matrix from UVB

HAS3 prevented fibroblast proliferation in response to EGF secreted into conditioned medium from E₂-stimulated keratinocytes. The role of versican splice variant V2 in the E₂ response in the dermis should be addressed in future studies. An additional effect of estrogen was to reduce the content of inflammatory macrophages and the expression of MCP-1 and COX2 in nonirradiated and UVB irradiated skin. It is believed that the supramolecular structure of the pericellular matrix and the recruited molecules determine whether the matrix acts homeostatic (5), pro-inflammatory (54, 55), or pro-migratory (20). Therefore, consideration for future studies might be that the ratio of HA and different versican splice variants plays a role in the inflammatory response to UVB in the dermis.

In conclusion, E₂ represents a critical regulator of dermal HA and versican content during photoaging, through release of EGF from keratinocytes, which in turn induces the expression of HAS3 and versican V2 in dermal fibroblasts in a paracrine manner. As a consequence, fibroblast proliferation is increased by E₂, and inflammation is inhibited. Therefore, this study identifies novel molecular targets of E₂ that may contribute to the protective function of this hormone on dermal matrix during intrinsic and extrinsic aging responses.

REFERENCES

1. Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1996) Molecular basis of sun-induced premature skin aging and retinoid antagonism. *Nature* **379**, 335–339
2. Brennan, M., Bhatti, H., Nerusu, K. C., Bhagavathula, N., Kang, S., Fisher, G. J., Varani, J., and Voorhees, J. J. (2003) Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem. Photobiol.* **78**, 43–48
3. Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligel, S. E., Datta, S. C., Wang, Z. Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G. J., and Voorhees, J. J. (2001) Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen *in vitro*. *Am. J. Pathol.* **158**, 931–942
4. Koshiishi, I., Horikoshi, E., Mitani, H., and Imanari, T. (1999) Quantitative alterations of hyaluronan and dermatan sulfate in the hairless mouse dorsal skin exposed to chronic UV irradiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1428**, 327–333
5. Stern, R., and Maibach, H. I. (2008) Hyaluronan in skin. Aspects of aging and its pharmacologic modulation. *Clin. Dermatol.* **26**, 106–122
6. Tammi, R., Agren, U. M., Tuhkanen, A. L., and Tammi, M. (1994) Hyaluronan metabolism in skin. *Prog. Histochem. Cytochem.* **29**, 1–81
7. Knott, A., Reuschlein, K., Lucius, R., Stäb, F., Wenck, H., and Gallinat, S. (2009) Deregulation of versican- and elastin-binding protein in solar elastosis. *Biogerontology* **10**, 181–190
8. Dai, G., Freudenberg, T., Zipper, P., Melchior, A., Grether-Beck, S., Rabausch, B., de Groot, J., Twarock, S., Hanenberg, H., Homey, B., Krutmann, J., Reifemberger, J., and Fischer, J. W. (2007) Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases. *Am. J. Pathol.* **171**, 1451–1461
9. Yoneda, M., Yamagata, M., Suzuki, S., and Kimata, K. (1988) Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture. *J. Cell Sci.* **90**, 265–273
10. Itano, N., and Kimata, K. (2002) Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* **54**, 195–199
11. Toole, B. P. (2004) Hyaluronan. From extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 528–539
12. Bourguignon, L. Y., Gilad, E., and Peyrolier, K. (2007) Heregulin-mediated ErbB2-ERK signaling activates hyaluronan synthases leading to CD44-dependent ovarian tumor cell growth and migration. *J. Biol. Chem.* **282**, 19426–19441
13. Karousou, E., Kamiryo, M., Skandalis, S. S., Ruusala, A., Asteriou, T., Passi, A., Yamashita, H., Hellman, U., Heldin, C. H., and Heldin, P. (2010) The activity of hyaluronan synthase 2 is regulated by dimerization and ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **285**, 23647–23654
14. Vignetti, D., Genasetti, A., Karousou, E., Viola, M., Clerici, M., Bartolini, B., Moretto, P., De Luca, G., Hascall, V. C., and Passi, A. (2009) Modulation of hyaluronan synthase activity in cellular membrane fractions. *J. Biol. Chem.* **284**, 30684–30694
15. Averbeck, M., Gebhardt, C. A., Voigt, S., Beilharz, S., Anderegg, U., Termeer, C. C., Sleeman, J. P., and Simon, J. C. (2007) Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 687–697
16. Ghersetich, I., Lotti, T., Campanile, G., Grappone, C., and Dini, G. (1994) Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int. J. Dermatol.* **33**, 119–122
17. Takahashi, Y., Ishikawa, O., Okada, K., Kojima, Y., Igarashi, Y., and Miyachi, Y. (1996) Disaccharide analysis of human skin glycosaminoglycans in sun-exposed and sun-protected skin of aged people. *J. Dermatol. Sci.* **11**, 129–133
18. Schwartz, E. (1988) Connective tissue alterations in the skin of ultraviolet-irradiated hairless mice. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 158–161
19. Day, A. J., and Prestwich, G. D. (2002) Hyaluronan-binding proteins. Tying up the giant. *J. Biol. Chem.* **277**, 4585–4588
20. Evanko, S. P., Angello, J. C., and Wight, T. N. (1999) Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 1004–1013
21. Verdier-Sévrain, S., Bonté, F., and Gilchrist, B. (2006) Biology of estrogens in skin. Implications for skin aging. *Exp. Dermatol.* **15**, 83–94
22. Vickers, M. R., MacLennan, A. H., Lawton, B., Ford, D., Martin, J., Meredith, S. K., DeStavola, B. L., Rose, S., Dowell, A., Wilkes, H. C., Darbyshire, J. H., and Meade, T. W. (2007) Main morbidities recorded in the women's international study of long duration estrogen after menopause (WISDOM). A randomized controlled trial of hormone replacement therapy in postmenopausal women. *BMJ* **335**, 239
23. Oppermann, M., Suvorova, T., Freudenberg, T., Dao, V. T., Fischer, J. W., Weber, M., and Kojda, G. (2011) Regulation of vascular guanylyl cyclase by endothelial nitric oxide-dependent post-translational modification. *Basic Res. Cardiol.* **106**, 539–549
24. Twarock, S., Freudenberg, T., Poscher, E., Dai, G., Jannasch, K., Dullin, C., Alves, F., Prenzel, K., Knoefel, W. T., Stoecklein, N. H., Savani, R. C., Homey, B., and Fischer, J. W. (2011) Inhibition of esophageal squamous cell carcinoma progression by *in vivo* targeting of hyaluronan synthesis. *Mol. Cancer* **10**, 30
25. Zhang, B., Xia, H. Q., Cleghorn, G., Gobe, G., West, M., and Wei, M. Q. (2001) A highly efficient and consistent method for harvesting large volumes of high titer lentiviral vectors. *Gene Ther.* **8**, 1745–1751
26. Chang, M. Y., Potter-Perigo, S., Tsoi, C., Chait, A., and Wight, T. N. (2000) Oxidized low density lipoproteins regulate synthesis of monkey aortic smooth muscle cell proteoglycans that have enhanced native low density lipoprotein binding properties. *J. Biol. Chem.* **275**, 4766–4773
27. Papakonstantinou, E., Roth, M., Block, L. H., Mirtsou-Fidani, V., Argiriadis, P., and Karakiulakis, G. (1998) The differential distribution of hyaluronic acid in the layers of human atherosclerotic aortas is associated with vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Atherosclerosis* **138**, 79–89
28. Sator, P. G., Sator, M. O., Schmidt, J. B., Nahavandi, H., Radakovic, S., Huber, J. C., and Hönigsmann, H. (2007) A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the influence of a hormone replacement therapy on skin aging in postmenopausal women. *Climacteric* **10**, 320–334
29. Sator, P. G., Schmidt, J. B., Sator, M. O., Huber, J. C., and Hönigsmann, H. (2001) The influence of hormone replacement therapy on skin aging. A pilot study. *Maturitas* **39**, 43–55
30. Kanda, N., and Watanabe, S. (2005) Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology. *J. Dermatol. Sci.* **38**, 1–7
31. Castelo-Branco, C., Duran, M., and González-Merlo, J. (1992) Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas* **15**, 113–119
32. Grosman, N., Hvidberg, E., and Schou, J. (1971) The effect of oestrogenic

- treatment on the acid mucopolysaccharide pattern in skin of mice. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **30**, 458–464
33. Uzuka, M., Nakajima, K., Ohta, S., and Mori, Y. (1981) Induction of hyaluronan synthetase by estrogen in the mouse skin. *Biochim. Biophys. Acta* **673**, 387–393
 34. Bentley, J. P., Brenner, R. M., Linstedt, A. D., West, N. B., Carlisle, K. S., Rokosova, B. C., and MacDonald, N. (1986) Increased hyaluronate and collagen biosynthesis and fibroblast estrogen receptors in macaque sex skin. *J. Invest. Dermatol.* **87**, 668–673
 35. Sobel, H., and Cohen, R. A. (1970) Effect of estradiol on hyaluronic acid in the skin of aging mice. *Steroids* **16**, 1–3
 36. Hall, J. M., Couse, J. F., and Korach, K. S. (2001) The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* **276**, 36869–36872
 37. Verdier-Sevrain, S., Yaar, M., Cantatore, J., Traish, A., and Gilchrist, B. A. (2004) Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor-mediated mechanism. *FASEB J.* **18**, 1252–1254
 38. Haczynski, J., Tarkowski, R., Jarzabek, K., Slomczynska, M., Wolczynski, S., Magoffin, D. A., Jakowicki, J. A., and Jakimiuk, A. J. (2002) Human cultured skin fibroblasts express estrogen receptor α and β . *Int. J. Mol. Med.* **10**, 149–153
 39. Ashcroft, G. S., Dodsworth, J., van Boxtel, E., Tarnuzzer, R. W., Horan, M. A., Schultz, G. S., and Ferguson, M. W. (1997) Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. *Nat. Med.* **3**, 1209–1215
 40. Pienimäki, J. P., Rilla, K., Fulop, C., Sironen, R. K., Karvinen, S., Pasonen, S., Lammi, M. J., Tammi, R., Hascall, V. C., and Tammi, M. I. (2001) Epidermal growth factor activates hyaluronan synthase 2 in epidermal keratinocytes and increases pericellular and intracellular hyaluronan. *J. Biol. Chem.* **276**, 20428–20435
 41. Pasonen-Seppänen, S., Karvinen, S., Törrönen, K., Hyttinen, J. M., Jokela, T., Lammi, M. J., Tammi, M. I., and Tammi, R. (2003) EGF up-regulates, whereas TGF- β down-regulates, the hyaluronan synthases Has2 and Has3 in organotypic keratinocyte cultures. Correlations with epidermal proliferation and differentiation. *J. Invest. Dermatol.* **120**, 1038–1044
 42. Ignar-Trowbridge, D. M., Nelson, K. G., Bidwell, M. C., Curtis, S. W., Washburn, T. F., McLachlan, J. A., and Korach, K. S. (1992) Coupling of dual signaling pathways. Epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4658–4662
 43. Nelson, K. G., Takahashi, T., Bossert, N. L., Walmer, D. K., and McLachlan, J. A. (1991) Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital tract growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 21–25
 44. Gehm, B. D., McAndrews, J. M., Jordan, V. C., and Jameson, J. L. (2000) EGF activates highly selective estrogen-responsive reporter plasmids by an ER-independent pathway. *Mol. Cell. Endocrinol.* **159**, 53–62
 45. Webber, J., Meran, S., Steadman, R., and Phillips, A. (2009) Hyaluronan orchestrates transforming growth factor- β 1-dependent maintenance of myofibroblast phenotype. *J. Biol. Chem.* **284**, 9083–9092
 46. Simpson, R. M., Wells, A., Thomas, D., Stephens, P., Steadman, R., and Phillips, A. (2010) Aging fibroblasts resist phenotypic maturation because of impaired hyaluronan-dependent CD44/epidermal growth factor receptor signaling. *Am. J. Pathol.* **176**, 1215–1228
 47. Simpson, R. M., Meran, S., Thomas, D., Stephens, P., Bowen, T., Steadman, R., and Phillips, A. (2009) Age-related changes in pericellular hyaluronan organization leads to impaired dermal fibroblast to myofibroblast differentiation. *Am. J. Pathol.* **175**, 1915–1928
 48. Shiraha, H., Gupta, K., Drabik, K., and Wells, A. (2000) Aging fibroblasts present reduced epidermal growth factor (EGF) responsiveness due to preferential loss of EGF receptors. *J. Biol. Chem.* **275**, 19343–19351
 49. Reenstra, W. R., Yaar, M., and Gilchrist, B. A. (1993) Effect of donor age on epidermal growth factor processing in man. *Exp. Cell Res.* **209**, 118–122
 50. Stern, R. (2004) Hyaluronan catabolism. A new metabolic pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 317–325
 51. Wight, T. N. (2002) Versican. A versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 617–623
 52. Sheng, W., Wang, G., Wang, Y., Liang, J., Wen, J., Zheng, P. S., Wu, Y., Lee, V., Slingerland, J., Dumont, D., and Yang, B. B. (2005) The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1330–1340
 53. Dours-Zimmermann, M. T., Maurer, K., Rauch, U., Stoffel, W., Fässler, R., and Zimmermann, D. R. (2009) Versican V2 assembles the extracellular matrix surrounding the nodes of Ranvier in the CNS. *J. Neurosci.* **29**, 7731–7742
 54. Evanko, S. P., Potter-Perigo, S., Bollyky, P. L., Nepom, G. T., and Wight, T. N. (2012) Hyaluronan and versican in the control of human T-lymphocyte adhesion and migration. *Matrix Biol.* **31**, 90–100
 55. de La Motte, C. A., Hascall, V. C., Calabro, A., Yen-Lieberman, B., and Strong, S. A. (1999) Mononuclear leukocytes preferentially bind via CD44 to hyaluronan on human intestinal mucosal smooth muscle cells after virus infection or treatment with poly(IC). *J. Biol. Chem.* **274**, 30747–30755

15 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema Modulatoren der Hyaluronsäurematrix im Rahmen der extrinsischen Hautalterung zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Katharina Röck befürworte.

Düsseldorf, den _____

Name des wissenschaftl.
Betreuers/Mitglieds der
Universität

Unterschrift d. wissenschaftl. Betreuers/
Mitglieds der Universität Duisburg-Essen
Duisburg-Essen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Düsseldorf, den _____

Unterschrift der Doktorandin

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren _____ einreiche.

Düsseldorf, den _____

Unterschrift der Doktorandin