

Epidermale und dermale Aspekte der Hautalterung

**Die Rolle von Toll-like Rezeptor 3 in der Epidermis und
die Elastinfaserbildung in der Dermis**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Diplom Biochemikerin Meike Halm, geb. Leuger

aus Bielefeld

Tübingen

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation: 27.09.2016

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Katja Schenke-Layland

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gerd Klein

Für David

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	i
2	Summary.....	1
3	Zusammenfassung	3
4	Publikation	5
5	Einleitung	6
5.1	Haut und Hautalterung	6
5.2	Toll-like Rezeptoren in der Haut.....	8
5.3	Spezielle Funktionen von Toll-like Rezeptor 3 in der Epidermis	11
5.4	Elastische Fasern in der Dermis.....	15
5.5	Intrazelluläre Transportprozesse	16
5.6	Trafficking von Tropoelastin/Elastin.....	17
5.7	Inhibitoren zur Analyse intrazellulärer Transportwege	20
5.8	Modelle zur Visualisierung der Elastogenese	21
5.9	<i>Ground State Depletion</i> Mikroskopie.....	22
6	Zielsetzung.....	25
7	Material	26
7.1	Geräte.....	26
7.2	Software.....	26
7.3	Chemikalien	26
7.4	Verbrauchsmaterialien.....	28
7.5	Zellen	29
7.6	Humane Haut für Biopsiematerial oder Zellisolation	29
7.7	Zellkulturmedien und Medienzusätze	30
7.8	Kommerzielle Kits	30
7.9	Puffer und Lösungen	31
7.10	Antikörper	32
7.11	Small interfering RNA (siRNA)	33
7.12	Plasmide	33
7.13	Lentivirale Partikel	33

7.14	TaqMan®-Genexpressions-Assays.....	34
8	Methoden	36
8.1	Zellbiologische Methoden.....	36
8.1.1	Standardkultivierung von Zellen	36
8.1.2	Zellzahlbestimmung.....	36
8.1.3	Kryokonservierung von Zellen	36
8.1.4	Behandlung von HDFneo mit Transportinhibitoren	37
8.1.5	In vitro Differenzierung von Keratinozyten	37
8.1.6	Transfektion von Zellen mit dem Neon™-System	38
8.1.7	Transfektion von Zellen mittels Lipofektion	38
8.1.8	siRNA-vermittelter Knockdown in Keratinozyten.....	39
8.1.9	Lentivirale Transduktion zur Überexpression von Elastin	39
8.1.10	Messung der Zellproliferation mit dem xCelligence RTCA SP Instrument.....	40
8.1.11	BrdU Zell-Proliferations-Assay	41
8.1.12	Zellzahlbestimmung mit Sapphire700™ und DRAQ5®.....	42
8.2	Mikroskopische Methoden.....	43
8.2.1	Fixierung und Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen.....	43
8.2.2	Immunmarkierung unfixierter Zellen	44
8.2.3	Zellpräparation für GSD-Mikroskopie	44
8.2.4	Anfertigung von Kryohautschnitten.....	45
8.2.5	Fixierung und Immunfluoreszenzmarkierung von Kryohautschnitten	46
8.2.6	AdipoRed™ Assay.....	46
8.2.7	Oil Red O Färbung.....	47
8.2.8	Konfokale Laserraster Mikroskopie (CLSM).....	47
8.2.9	Bildauswertung: TLR 3-Level in Kryohautschnitten.....	48
8.2.10	Bildauswertung: Proteinquantifizierung aus IFAs von Citrin-ELN-MEF-Modellen.....	48
8.2.11	GSD Mikroskopie.....	49
8.3	Biochemische Methoden	50
8.3.1	RNA-Isolation.....	50
8.3.2	cDNA-Synthese	50
8.3.3	qRT-PCR mittels TaqMan®-Assay und Ermittlung der relativen Genexpression	51
8.3.4	Whole Human Genome Microarray.....	52

8.3.5	Herstellung von Zelllysaten	53
8.3.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
8.3.7	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	54
8.3.8	Western-Blot und Immundetektion von Proteinen	54
8.3.9	Bestimmung sezernierter Zytokine in Zellkulturüberständen	55
9	Ergebnisse	57
9.1	Toll-like Rezeptor 3 in der Epidermis	57
9.1.1	Expressionsmuster von TLR 3 in Haut und im Modell	57
9.1.2	Proliferation vs. TLR 3-Expression	59
9.1.3	Toll-like Rezeptor 3-Level in gealterter Haut	63
9.1.4	UV-Sensibilität in Abhängigkeit des Alters	65
9.1.5	Korrelation von TLR 3-Level in der Epidermis und individuelle MED	66
9.1.6	TLR 3 im in vitro Zellkulturmodell	67
9.1.7	TLR 3 im Zusammenhang mit der Lipidbiosynthese	71
9.1.8	TLR 3 und Differenzierung	74
9.1.9	TLR 3 in der Calcium-induzierten Differenzierung	75
9.1.10	Poly(I:C) Behandlung bei verschiedenen Konfluenz-Stadien	77
9.1.11	Whole Genome Microarray Poly(I:C) behandelter Keratinozyten	79
9.1.12	Validierung des Whole Human Genome Microarray	82
9.2	Tropoelastin/Elastin im Zellkulturmodell	84
9.2.1	Validierung von Transportorganell-spezifischen Antikörpern	84
9.2.2	Intrazelluläre Lokalisation von TE/Elastin	85
9.2.3	Effekte von Inhibitoren auf den intrazellulären TE-Transport	90
9.2.4	Transiente Transfektion von HDFneo mit EGFP-ELN und HA/His/c-Myc-ELN	94
9.2.5	Stabile Expression von Citrin-markiertem Elastin mittels lentiviraler Transduktion	100
9.2.6	Genexpressionsanalyse Citrin-ELN-exprimierender HDFneos und Quantifizierung aus Immunfluoreszenzanalysen	104
9.2.7	Citrin-ELN-Überexpression in HDFneo und Fibroblasten alter Spender	110
9.2.8	Etablierung der GSD-Mikroskopie	116
9.2.9	GSD Mikroskopie der Citrin-ELN-Faser	117
10	Diskussion	120
10.1	Rolle von TLR 3 in der Epidermis	120

10.1.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	120
10.1.2	TLR 3-Expressionsmuster in Haut und Keratinozyten	121
10.1.3	Proliferation beeinflusst nicht die TLR 3-Expression und vice versa	122
10.1.4	Niedrigere TLR 3-Level in Haut alter Spender	123
10.1.5	TLR 3 und UV-Sensibilität	124
10.1.6	Charakterisierung eines in vitro Zellkulturmodells zu epidermalem TLR 3	126
10.1.7	Konkrete Rolle von TLR 3 im Lipidstoffwechsel	127
10.1.8	Konkrete Rolle von TLR 3 in der epidermalen Differenzierung.....	129
10.1.9	TLR 3, Konfluenz und Differenzierung in Keratinozyten	132
10.1.10	Whole Human Genome Microarray und Validierung ausgewählter Gene	133
10.2	Elastogenese im dermalen Fibroblasten	136
10.2.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	136
10.2.2	Immunmarkierungen von intrazellulärem Tropoelastin	137
10.2.3	Transduktion von HDFneo mit Citrin-Elastin zeigt funktionales Fasermmodell	140
10.2.4	Überexpression von Citrin-ELN in adulten Fibroblasten	145
10.2.5	Ultrastruktur der in vitro gebildeten elastischen Faser	148
11	Fazit und Ausblick.....	150
12	Literaturverzeichnis.....	152
13	Lebenslauf	163
14	Danksagung.....	164
15	Anhang.....	165
15.1	Sequenz des Citrin-markierten Elastins für Gensynthese-Auftrag.....	165
16	Eidesstattliche Erklärung	167

1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	mikromolar
BrdU	Bromodeoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
CMV	Cytomegalovirus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	<i>dendritic cell</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELN	Elastin
EpiSC	<i>epidermal stem cell</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GOI	<i>gene of interest</i>
GSD	<i>ground state depletion</i>
GVI	<i>grey value intensity</i>
h	<i>hour/s (Stunde/n)</i>
HA	Hämagglutinin
HRP	<i>horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)</i>
IEC	<i>intestinal epithelial cell</i>
IFA	Immunfluoreszenzanalyse

Abkürzung	Bedeutung
IFN	Interferon
IKK	<i>inhibitor of NFκB kinase</i>
IL	Interleukin
IRAK-1	<i>IL-1 receptor associated kinase-1</i>
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
LOX	Lysyloxidase
LRR	<i>leucine rich repeat</i>
MED	<i>minimal erythematol dose</i> (minimale Erythemdosis)
MEF	Multilayer elastische Faser
mg	Milligramm
min	Minuten
miRNA	microRNA
mL	Milliliter
mM	millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NFQ	<i>non-fluorescent quencher</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
ORO	<i>Oil Red O</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly(I:C)	<i>polyinosinic–polycytidylic acid</i>
PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
qRT-PCR	<i>Real-Time-quantitative-PCR</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>

Abkürzung	Bedeutung
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TA	<i>transit amplifying</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	TBS-Tween (TBS mit Tween)
TE	Tropoelastin
TEWL	<i>transepidermal water loss</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGN	<i>trans-Golgi-Netzwerk</i>
TIR	<i>Toll-interleukin-1 receptor</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF6	<i>tumor necrosis factor receptor associated factor 6</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
VSMC	<i>vascular smooth muscle cell</i>
WB	Westernblot
Wnt5a	<i>wingless-type MMTV integration site family member 5A</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

2 Summary

The human skin as the outermost protective layer against environmental influences, as well as a mirror of beauty is a central theme of cosmetic research. Predominant objective of this research is either to repair unwanted changes that occur as part of intrinsic and extrinsic aging or to prevent them from the start. The underlying mechanisms of skin aging, or possible approaches to counteract visible skin aging, are often poorly understood.

In the context of epidermal skin aging the function of Toll-like receptor 3 (TLR 3) was examined beyond its importance as an immune receptor. It was shown that TLR 3 in the skin and in an *in vitro* model is expressed almost exclusively in basal undifferentiated keratinocytes. In skin samples of aged donors TLR 3 levels are reduced compared to those of young donors. A relevance of TLR 3 for the skin's lipid metabolism as reported in the literature could not be confirmed via siRNA knockdown experiments. However, it was shown that the activation of TLR 3 leads to a repression of important epidermal differentiation markers and therefore could potentially preserve the basal status of epidermal keratinocytes. A human whole genome array demonstrated that the activation of TLR 3 affects a number of other non-inflammatory processes in human keratinocytes like cell proliferation and survival. The data presented here show that TLR 3 possibly supports the formation of the skin barrier by inducing tight junction proteins, whereas the repression of the desmosomal protein Dsg1 tends to cause a barrier defect.

TLR 3 is reported to be the most important sensor for UV-induced cell damage. Analysis of *ex vivo* skin samples and the corresponding minimal erythemal dose (MED) of the same volunteer revealed a strong correlation of the volunteer's TLR 3-levels and his sensitivity for UV radiation. This illustrates that altered TLR 3 levels lead to an *in vivo* phenotype, which gives the modulation of TLR 3 and its function a relevance in cosmetics.

Future studies need to demonstrate how the different influences of TLR 3 activation contribute to the overall epidermal homeostasis and how young and especially aged skin could benefit from a modulation of TLR 3 activity.

Dermal skin aging is especially accompanied by a marked decrease of skin elasticity mainly via a strong loss of functional elastic fibers. A detailed knowledge of elastogenesis is needed to regenerate lost elastic fibers. In this work, an advanced cell culture model of human dermal fibroblasts expressing fluorescence-tagged elastin, Citrine-elastin, was established. Overexpression of Citrine-elastin in neonatal and adult fibroblasts showed, that the expression of elastin alone is sufficient to generate an imposing network of elastic fibers. In particular the microfibrillar scaffold seems to be of main importance when elastin is deposited during network formation. Hence, a modulation of elastin expression and deposition only appears to be advantageous if the extracellular matrix is intact. Ground State Depletion microscopy was used to analyze the ultrastructure of the elastic fibers formed in this model. GSD-analyses showed that the elastic fiber is a microfibrillar scaffold bordered with globular elastin structures rather than an amorphous core of elastin surrounded by microfibrils.

The data presented here on the role of TLR 3 in the epidermis and the established cell culture model of fluorescent elastic dermal fibers thus provide relevant findings and new aspects for scientific research and cosmetic applications and should be examined in detail in further projects.

3 Zusammenfassung

Die menschliche Haut als äußerste Schutzschicht vor Umwelteinflüssen, aber auch als Spiegel der äußerlichen Schönheit ist ein zentrales Thema kosmetischer Forschung. Vorwiegendes Ziel dieser Forschung ist es, unerwünschte Veränderungen, die im Rahmen der intrinsischen und extrinsischen Alterung auftreten, entweder zu reparieren oder diese von vornherein zu verhindern. Die Mechanismen, die der sichtbaren Hautalterung zugrunde liegen bzw. mögliche Ansatzpunkte, um dieser entgegen zu wirken, sind häufig nur unzureichend verstanden.

Im Kontext der epidermalen Hautalterung wurde in dieser Arbeit die Funktion von Toll-like Rezeptor 3 (TLR 3) hinsichtlich einer über die Rolle eines Immunrezeptors hinausgehenden Bedeutung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass TLR 3 in der Haut und im Modell nahezu exklusiv in basalen undifferenzierten Keratinozyten exprimiert wird. Dabei liegt TLR 3 in der Haut alter Spender im Vergleich zu jungen Spendern reduziert vor. Eine literaturseitig beschriebene Relevanz im Lipidstoffwechsel der Haut konnte dabei im siRNA Knockdown nicht bestätigt werden. Hingegen wurde gezeigt, dass die Aktivierung von TLR 3 zur Repression wichtiger Marker der epidermalen Differenzierung führt und damit potenziell zum Erhalt des basalen Status der Keratinozyten beiträgt. Ein *Human Whole Genome Array* konnte zeigen, dass sich die Aktivierung von TLR 3 in humanen Keratinozyten noch auf eine Reihe weiterer nicht-entzündlicher Prozesse wie Zellproliferation und –überleben auswirkt. Die Daten zeigen außerdem, dass TLR 3 über eine Induktion von *tight junction* Proteinen möglicherweise einen Beitrag zur Ausbildung der Hautbarriere leisten kann, wohingegen die Repression des Desmosom Proteins DSG1 eher einen Barrieredefekt verursacht.

In Verbindung mit UV-Strahlung ist TLR 3 in der Literatur als ausschlaggebender Sensor für UV-Schäden beschrieben. Hier konnte mit Hilfe von ex vivo Hautmaterial und korrespondierenden MED-Werten (minimale Erythemdosis) des gleichen Probanden gezeigt werden, dass ein starker Zusammenhang zwischen dem TLR 3-Expressionsniveau eines Probanden und seiner Sensibilität gegenüber UV-Strahlung besteht. Dieses Ergebnis zeigt eindrucksvoll, dass unterschiedliche TLR 3-Level in

vivo einen Phänotyp verursachen und somit eine Modulation von TLR 3 und seiner Funktion kosmetische Relevanz besitzt.

Wie die unterschiedlichen Einflüsse von TLR 3 zur die Gesamthomöostase der Epidermis beitragen und wie junge und insbesondere gealterte Haut von einer Modulation der TLR 3-Aktivität profitieren, müssen zukünftige Studie zeigen.

Die dermale Hautalterung geht insbesondere mit einem Elastizitätsverlust einher. Ursächlich dafür ist der Verlust funktionaler elastischer Fasern. Um diese zu regenerieren, ist ein detailliertes Verständnis der Elastogenese nötig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür ein weiterführendes Zellkulturmodell humaner dermaler Fibroblasten mit Fluoreszenz-markiertem Elastin etabliert. Die Überexpression von funktionalem Citrin-Elastin in neonatalen und adulten Fibroblasten zeigt, dass die Expression von Elastin allein ausreicht, um ein eindrucksvolles Netzwerk elastischer Fasern zu generieren. Entscheidend für die Ablagerung von Elastin in der extrazellulären Matrix ist dabei das Gerüst an Mikrofibrillen, so dass eine kosmetische Modulation der Elastinmenge nur bei einer intakten Matrix sinnvoll erscheint. Zur Untersuchung der Ultrastruktur der gebildeten Elastinfasern wurde die *Ground state depletion* (GSD) Mikroskopie angewendet. Die GSD-Analysen zeigten, dass die elastische Faser kein Kern amorphen Elastins gesäumt von Mikrofibrillen ist, sondern vielmehr ein Gerüst aus Mikrofibrillen, das mit globulären Elastinstrukturen besetzt ist.

Die hier erhobenen Daten zur Rolle von TLR 3 in der Epidermis und das vorgestellte Modell des fluoreszenten Netzwerks elastischer dermaler Fasern liefern damit relevante Befunde und neue Aspekte für wissenschaftliche Fragestellungen und kosmetische Anwendungen und sollten in weiterführenden Projekten detailliert untersucht werden.

4 Publikation

Halm M., Schenke-Layland K., Jaspers S., Wenck H., Fischer F., *Visualizing tropoelastin in a long-term human elastic fiber cell culture model*. Scientific Reports 6, Article number: 20378 (2016).

5 Einleitung

5.1 Haut und Hautalterung

Die humane Haut ist (unter Berücksichtigung der funktionalen Oberfläche) eines der größten Organe des Menschen [1] und bedeckt (je nach Körpergröße und -umfang) die etwa 2 m² große Oberfläche des menschlichen Körpers [2]. Sie ist damit eine wichtige Grenzschicht, die den Organismus nach außen hin vor mechanischen und chemischen Einwirkungen, Pathogenen und anderen Umwelteinflüssen (wie z.B. UV-Strahlung) schützt. Des Weiteren nimmt sie eine wichtige Rolle in der Regulation des Wasser- und Temperaturhaushaltes wahr [2].

Im Querschnitt der menschlichen Haut (siehe Abbildung 1) sind die einzelnen Schichten, aus denen sie besteht erkennbar: die Epidermis, die Dermis und die Subkutis.

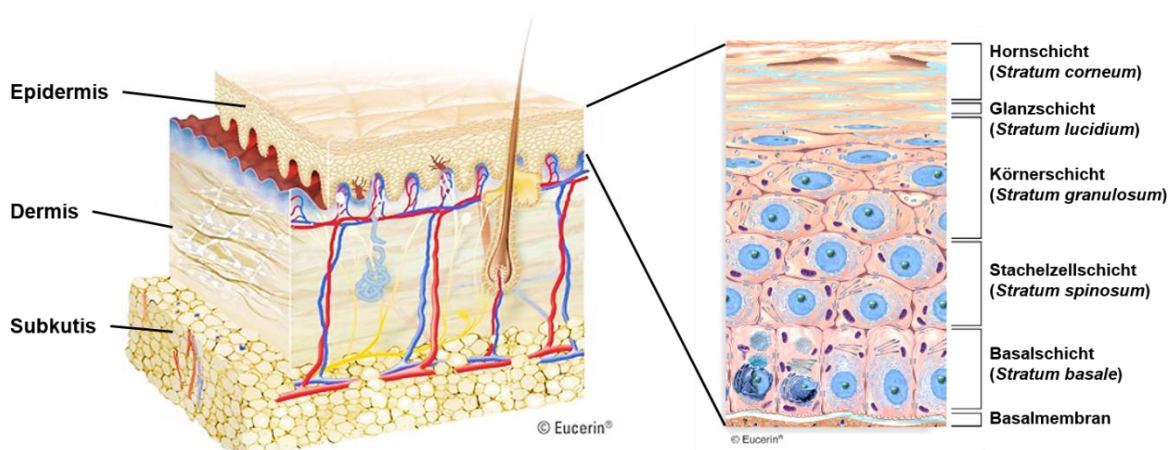


Abbildung 1 – Schematische Darstellung der humanen Haut im Querschnitt mit Subkutis, Dermis und Epidermis, sowie Hautanhangsgebilden und Blutgefäßen (links). Die Vergrößerung (rechts) zeigt die einzelnen Schichten der Epidermis, die, ausgehend von der Basalschicht, von differenzierenden Keratinozyten gebildet werden, die schließlich als tote Hornzellen abgeschilfert werden. Verändert nach Eucerin®.

Den Hauptbeitrag zur Barrierefunktion der Haut trägt die Epidermis bei. Sie ist ein stratifiziertes, mehrschichtiges Plattenepithel, das zu mehr als 90 % aus Keratinozyten besteht [3]. Die Epidermis erneuert sich etwa alle 6 Wochen [4, 5], wobei die Keratinozyten einen kontinuierlichen Differenzierungsprozess von der Basalschicht (*Stratum Basale*) hin zur Hornschicht (*Stratum Corneum*) durchlaufen und schließlich als Hautschuppen abgeschilfert werden [2]. Im Zuge der Differenzierung durchläuft der Keratinozyt drastische Veränderungen hinsichtlich

seiner Morphologie und Aktivität, die mit der Expression spezifischer Proteine einhergehen [6]. Die Zellen der Basalschicht sind durch eine proliferative Aktivität und die Expression der Strukturproteine Keratin 5 und 14 gekennzeichnet, die intermediäre Filamente bilden. Treten die Keratinozyten in die Differenzierung ein, werden diese Filamente durch die verstärkte Expression der Keratine 1 und 10 ersetzt [3]. Im *Stratum granulosum* werden weitere Strukturproteine exprimiert (u.a. Filaggrin und Loricrin), die außerdem durch spezifische Transglutaminasen miteinander verknüpft werden. So entsteht ein versteifter Proteinsack (*cornified envelope*) [6] unterhalb der Plasmamembran des Keratinozyten. Im *Stratum Corneum* liegen die Keratinozyten schließlich als kernlose Korneozyten vor, die oberhalb des *cornified envelope* einen spezifischen Lipidfilm (sekretiert aus sogenannten Lamellarkörperchen oder *Odland bodies*) ausbilden, der die Barrierefunktion der Epidermis vervollständigt [2].

Zwischen den Keratinozyten der Epidermis sind außerdem pigmentierende Melanozyten, Langerhans-Zellen (dendritische Zellen, DCs), Lymphozyten und sensorische Merkel-Zellen zu finden [3].

Mit der darunterliegenden Dermis ist die Epidermis über die Basalmembran verbunden, die von basalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten gebildet wird. Sie stellt nicht nur eine mechanische Stütze für die Adhäsion der Epidermis an die Dermis dar, sondern reguliert auch den Stoffaustausch zwischen diesen beiden Schichten. Durch die nach oben gerichteten Ausläufer der Dermis (papilläre Dermis) entsteht eine Verzahnung mit der Epidermis, die die Kontaktfläche beider Schichten noch vergrößert [3].

Hauptbestandteil der Dermis ist das Bindegewebe, das insbesondere aus Kollagen- und Elastinfasern besteht, die der Haut ihre Spannkraft und Elastizität verleihen. Hauptzelltyp ist in der Dermis der Fibroblast, wobei dort auch weitere Zelltypen, insbesondere des Immunsystems, zu finden sind (siehe auch Abschnitt 5.2). Die Dermis ist außerdem von Blut- und Lymphgefäßen sowie Nervenbahnen durchzogen und enthält auch Hautanhangsgebilde, wie Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen.

Die unter der Dermis liegende Subkutis besteht im Wesentlichen aus Fettgewebe und dient damit insbesondere als Schutz vor Wärmeverlust und Druck, aber auch als Energiespeicher [3].

Auch die Haut unterliegt wie jedes andere menschliche Organ dem Alterungsprozess. Neben der chronologischen oder intrinsischen Alterung ist die Haut aber durch ihre Exposition gegenüber der Umwelt einer Reihe exogener Faktoren ausgesetzt, die wesentlich zur sogenannten extrinsischen Alterung beitragen. Der Sonnenstrahlung wird dabei mit einem Anteil von etwa 80 % der größte Beitrag zur Hautalterung in exponierter Haut zugeschrieben [7].

Sichtbare Kennzeichen gealterter Haut sind vor allem die Faltenbildung und ein Verlust der Elastizität. Auf molekularer Ebene ist dafür primär eine Verminderung und Fragmentierung kollagener und elastischer Fasern ursächlich [8]. Darüber hinaus ist aber auch die Funktionalität gealterter Haut im Vergleich zu junger Haut beeinträchtigt, wobei insbesondere die Epidermis betroffen ist [9]. Die in gealterter Haut auftretende verlangsamte Zellerneuerung [10] zieht unter anderem eine verlangsamte Wundheilung nach sich. So konnte gezeigt werden, dass die Haut älterer Patienten im Vergleich zu der jüngerer nach Abschürfungen etwa doppelt so lange braucht, eine neue Epidermis zu bilden [11]. Außerdem ist gealterte Haut tendenziell trocken und schuppig, wofür teilweise der Verlust der Barrierefunktion der Haut verantwortlich ist [9]. In diesem multifaktoriellen Prozess spielt unter anderem ein verringerter Lipidgehalt in den Lamellarkörperchen der epidermalen Keratinozyten eine Rolle [12]. Wesentlich für die extrinsische Alterung sind UV-induzierte Schäden, u.a. bewirkt durch eine Schädigung der DNA. Da im Alter die DNA-Reparaturleistung abnimmt, können Schäden nicht mehr effektiv repariert werden, so dass im Laufe des Lebens schließlich Mutationen akkumulieren und zu einem häufigeren Auftreten von Krebs führen können [13].

5.2 Toll-like Rezeptoren in der Haut

Da die Haut als äußerste Schutzschicht des menschlichen Körpers einer Vielzahl von Pathogenen und Krankheitserregern ausgesetzt ist, kommt ihr auch in der Immunabwehr eine besondere Rolle zu. Das angeborene Immunsystem (wozu zum Beispiel die Phagozytose durch Makrophagen oder das Komplementsystem gehören) galt lange als unspezifisch, wohingegen die adaptive Immunantwort durch B- und T-Lymphozyten eine spezifische Antikörper- und Zell-vermittelte Abwehr von Pathogenen ermöglicht [14]. Inzwischen ist weithin anerkannt, dass auch das angeborene Immunsystem ein gewisses Maß an Spezifität innehat. Dazu tragen

insbesondere *pattern recognition receptors* (PRRs) bei, die mit Pathogenen assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen [15]. Eine wichtige Gruppe dieser Rezeptoren stellen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) dar, die eine große Bandbreite verschiedenster Pathogene erkennen können (siehe Abbildung 2). TLRs sind Typ 1 Transmembranproteine mit Ektodomänen aus Leucin-reichen Wiederholungen (*leucine-rich repeats*, LRRs), die die Erkennung der PAMPs vermitteln, und intrazellulären Toll-Interleukin-1 Rezeptor (TIR) Domänen, die für die Signalweiterleitung erforderlich sind [15]. Bislang sind zehn funktionale humane TLRs beschrieben, von denen jeder eine spezifische mikrobelle Komponente erkennt. Unter den PAMPs, die von den TLRs erkannt werden, sind Lipide, Lipoproteine, Proteine und Nukleinsäuren, die von einer großen Bandbreite verschiedener Mikroben wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilze stammen können [15]. Die Bindung der Liganden an die TLRs findet in unterschiedlichen Zellkompartimenten statt, wobei die subzelluläre Lokalisation des Rezeptors vermutlich entscheidend ist für die Zugänglichkeit des Liganden, die Toleranz gegenüber zelleigenen Molekülen und die nachgeschaltete Signalweiterleitung [15]. TLR 1, 2, 4, 5 und 6 sind auf der Zelloberfläche zu finden, wo sie insbesondere bakterielle Komponenten wie zum Beispiel Flagellin oder Lipopolysaccharide (LPS) erkennen (siehe Abbildung 2). TLR 3, 7, 8 und 9 hingegen sind in den Membranen intrazellulärer Kompartimente lokalisiert und erkennen dort mikrobielle Nukleinsäuren, darunter CpG-DNA-Motive, die vermehrt in bakterieller DNA vorliegen, oder auch doppelsträngige RNA (dsRNA), wie sie bei einer Virusinfektion vorkommt [15]. Die Bindung eines Liganden an den entsprechenden Toll-like Rezeptor führt zur Induktion unterschiedlicher Signalwege [16]. Eine zentrale Rolle nimmt dabei die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ein, wodurch eine Reihe von Zielgenen aktiviert wird, die an der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt sind. Dazu gehört die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α , Interleukine 1 und 6), die Produktion von Chemokinen (Interleukin 8, *macrophage inflammatory protein 2*, MIP2), aber auch die Expression von co-stimulatorischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen [14].

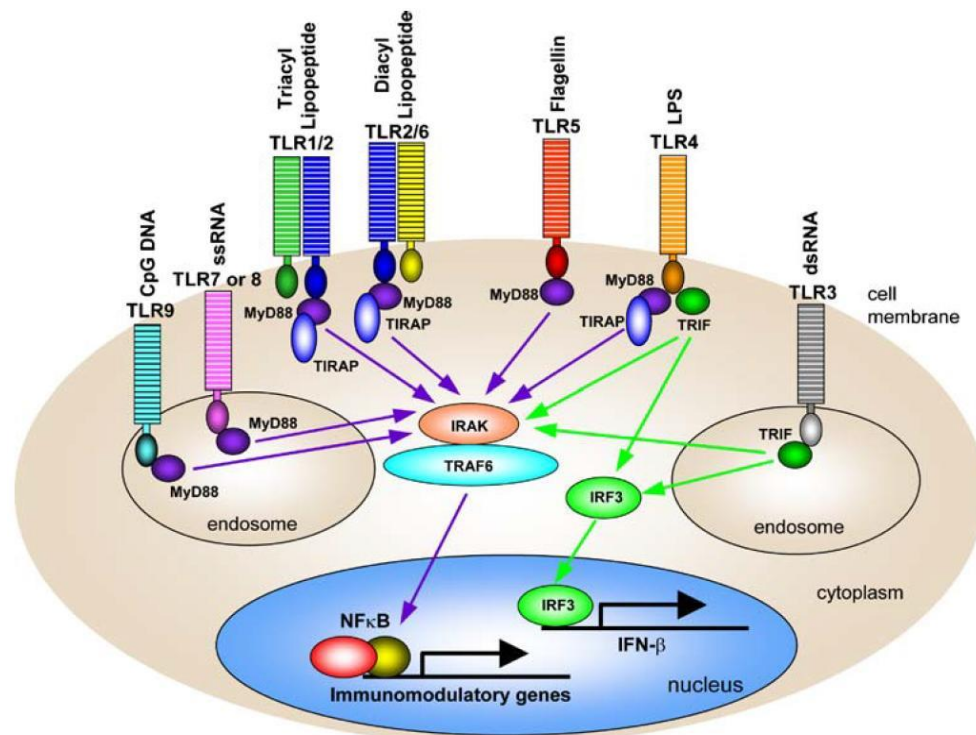


Abbildung 2 – Übersicht der Toll-like Rezeptoren und Schema des TLR-Signaling. Die TLRs 1, 2, 4, 5 und 6 befinden sich auf der Zelloberfläche und werden nach Bindung ihrer entsprechenden Liganden in Phagosomen internalisiert. Die TLRs 3, 7, 8 und 9 sind dagegen in Membranen intrazellulärer Organellen wie Endo- oder Lysosomen zu finden, wo ihre Liganden Abbauprodukte aufgenommener Pathogene sind. Nach Aktivierung des TLR durch seinen Liganden werden Adapter- und Signaling-Moleküle rekrutiert, was zur Aktivierung von NFκB und schließlich zur Transkription von immunomodulatorischen Genen führt. Wichtigster Adapter für die TLRs 1, 2 und 4-9 ist MyD88. TLR 3 hingegen rekrutiert TRIF, was zur Aktivierung von IRF3 führt und essenziell ist für die Produktion von Typ 1 Interferonen und die antivirale Immunantwort. Entnommen aus [14].

Erkennt und bindet ein TLR seinen korrespondierenden Liganden, interagiert die TIR-Domäne des Rezeptors mit dem Adaptermolekül MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*), welches wiederum die Signalmoleküle IRAK-1 (*IL-1 receptor associated kinase-1*) und TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor 6*) rekrutiert. Die Assemblierung weiterer Proteine in diesen Komplex führt schließlich zur Phosphorylierung des IKK-Komplexes (*inhibitor of NF-κB [IκB]-kinase*), wodurch IκB degradiert und der Transkriptionsfaktor NF-κB freigesetzt wird [14]. Die Aktivierung von TLR 3 und TLR 4 hingegen führt zur Rekrutierung des Adapters TRIF (*TIR domain containing adaptor-inducing interferon-β*). Dieser TRIF-abhängige Signalweg führt anders als der MyD88-Signalweg zur Aktivierung von IRF3 (*interferon regulatory factor 3*). Nach Translokation in den Nukleus induziert dieser Transkriptionsfaktor Typ 1 Interferone (IFN-α/β), die für die antivirale Immunantwort von Bedeutung sind [14].

Auch die verschiedenen Zelltypen in der Haut exprimieren Toll-like Rezeptoren. Dazu gehören Keratinozyten und Langerhans-Zellen in der Epidermis, spezialisierte Immunzellen wie Makrophagen, T- und B-Zellen und Mastzellen in der Dermis, aber auch Fibroblasten und Adipozyten [14].

Keratinozyten bilden nicht nur die äußerste Schicht der Haut, sondern reagieren auch auf eine Reihe externer Stimuli mit der Ausschüttung diverser Zyto- und Chemokine [17] und können daher als erste Abwehrlinie gegen Pathogene in der Haut angesehen werden [18]. Die Studie von Lebre et al. konnte zeigen, dass humane Keratinozyten konstitutiv die TLRs 1 bis 6, sowie 9 und 10 exprimieren [18]. Für die TLRs 3, 4, 5 und 9 konnte außerdem über die Stimulation mit ihren jeweiligen Liganden eine Funktionalität der TLRs in Keratinozyten nachgewiesen werden, wobei in allen Fällen die Aktivierung des NF κ B-Signalweges und die Sekretion von TNF- α und dem Neutrophilen Chemoattraktans Interleukin-8 nachgewiesen werden konnte [18]. Darüber hinaus induzieren der TLR 3-Ligand Poly(I:C) (*polyinosinic:polycytidylic acid*) und der TLR 9-Ligand CpG (*CpG-oligodeoxynucleotides, ODNs*) die Sekretion von CXCL-9 und CXCL-10, aber nicht der TLR 4-Ligand LPS oder der TLR 5-Ligand Flagellin. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Keratinozyten abhängig von der TLR-Stimulation ein spezifisches Set von Adhäsionsmolekülen exprimieren [18]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Keratinozyten nicht nur bloße Barrierefunktion besitzen, sondern aktiv zu der Immunabwehr beitragen: durch differenzielle Aktivierung von TLRs und differenzielle Expression von Zyto- und Chemokinen sowie Adhäsionsmolekülen können sie insbesondere durch Rekrutierung spezifischer Immunzellen sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunabwehr modellieren [18].

5.3 Spezielle Funktionen von Toll-like Rezeptor 3 in der Epidermis

Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist ein PAMP, das während viraler Infektionen auftritt, da diese Struktur Teil des Replikationsprozesses vieler Viren ist [19]. Es konnte gezeigt werden, dass TLR 3 in Säugern essenziell an der Detektion von dsRNA beteiligt ist. In HEK-293 Zellen konnte demonstriert werden, dass nur Zellen, die humanen TLR 3 exprimieren, fähig sind, auf Stimulation mit dem TLR 3-Liganden Poly(I:C) zu reagieren [20]. Die Bedeutung von TLR 3 in der antiviralen Immunantwort konnte durch Experimente mit einem Knockout-Mausmodell bestätigt

werden. So können beispielsweise aus TLR 3^{-/-}-Mäusen isolierte Makrophagen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen nicht mit Poly(I:C) zur Ausschüttung von Interleukin-6 oder Typ 1 Interferonen stimuliert werden. Außerdem zeigten aus Knockout-Mäusen isolierte B-Zellen sowohl auf den künstlichen Liganden Poly(I:C) als auch auf virale dsRNA eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringerte Stimulierbarkeit [20].

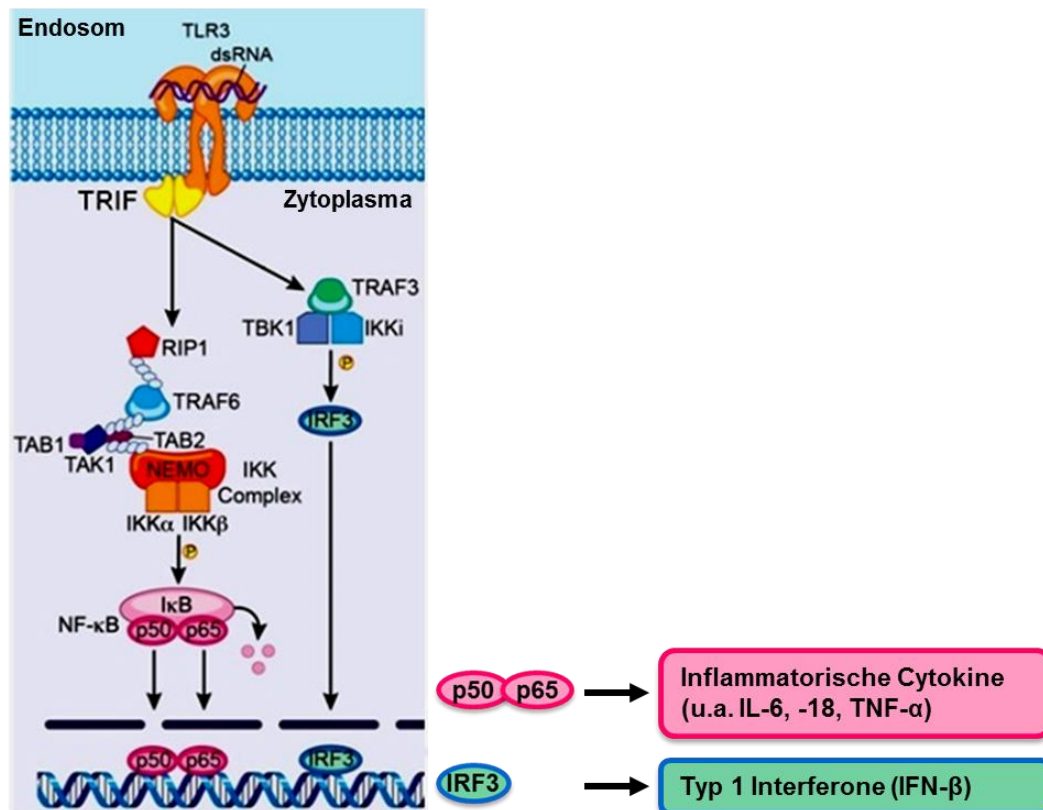


Abbildung 3 - Über TLR 3 aktivierte Signalwege. Nach Bindung der dsRNA an TLR 3 wird auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors das Adapter-Molekül TRIF rekrutiert, das nachfolgend den NFκB- und den TRAF3-Signalweg einleitet. Links: die Assemblierung des Komplexes aus RIP1, TRAF6 und anderen Proteinen führt zur Rekrutierung des IKK-Komplexes. Die enzymatisch aktiven Einheiten IKKα und IKKβ phosphorylieren IκB. Dadurch wird IκB degradiert und NFκB freigesetzt (hier ein Dimer aus p50 und p65), welches als Transkriptionsfaktor in den Kern wandert und dort die Expression inflammatorischer Zytokine induziert. Rechts: durch Assoziation von TRIF mit TRAF3 werden TBK1 und IKKi aktiviert. Diese phosphorylieren IRF3, welches schließlich die Expression von Typ 1 Interferonen induziert. Entnommen und verändert aus [21].

Durch Bindung von dsRNA oder Poly(I:C) an TLR 3 wird das Adaptermolekül TRIF rekrutiert, welches nachfolgend zwei verschiedene Signalwege einleitet (siehe Abbildung 3). Über die Assemblierung eines Komplexes aus RIP1, TRAF6 und weiteren Proteinen wird zunächst der IKK-Komplex rekrutiert. Die Phosphorylierung von IκB durch die enzymatisch aktiven Einheiten IKKα und IKKβ des IKK-Komplexes führt zur Degradation von IκB und setzt NFκB (Dimer aus p50 und p65 in Abbildung

3) frei, so dass dieses in den Kern transloziert und dort als Transkriptionsfaktor pro-inflammatorische Gene induziert [22]. TRIF kann außerdem mit TRAF3 assoziieren, um TBK1 (*TANK-binding kinase-1*) und IKK ϵ zu aktivieren. Diese wiederum phosphorylieren IRF 3, welches schließlich in den Kern wandert und dort die Expression von Interferon- β induziert [22]. Auch in Keratinozyten sind diese Signalwege von Bedeutung und es konnte gezeigt werden, dass sie mit einem vollen antiviralen Abwehrprogramm ausgestattet sind, welches ihnen ermöglicht, effizient gegen virale Infektionen der Haut vorzugehen [23].

Neuere Forschungsergebnisse weisen darauf hin, dass TLRs eine über die reine Abwehr viraler Infektionen hinausgehende Bedeutung insbesondere im Zusammenhang mit Zellproliferation und -überleben haben [24]. Auch für TLR 3 in der Haut gibt es Hinweise auf zusätzliche Funktionen.

Bernard et al. konnten zeigen, dass TLR 3 ein entscheidender Rezeptor zur Detektion von UV-Schäden in der Haut ist [25]. Lysate bestrahlter Keratinozyten lösten dabei nicht nur in vitro, sondern auch im Mausmodell TLR 3-abhängig eine Entzündungsreaktion aus. Weitergehende Analysen ergaben, dass das Molekül, das an TLR 3 bindet und auch den entsprechenden Signalweg auslöst, die UV-geschädigte nicht-codierende U1 RNA ist [25] (siehe auch Abbildung 4). Das heißt, hier konnte ein endogenes Molekül identifiziert werden, das nach Schädigung TLR 3-abhängig eine inflammatorische Reaktion auslöst.

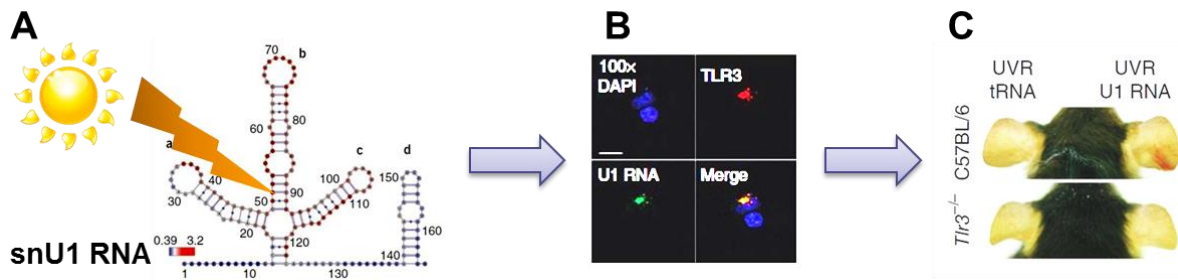


Abbildung 4 - UV-geschädigte U1 RNA bindet an TLR 3 und löst TLR 3-abhängig eine Entzündungsreaktion aus. (A) Zelleigene nicht-codierende U1 RNA (snU1 RNA) wird durch UVB-Bestrahlung geschädigt, wodurch sich vermehrt doppelsträngige Loop-Domänen bilden. (B) Die Fluoreszenzmarkierung von UVB-geschädigter U1 RNA (grün) und TLR 3 (rot) zeigt im Überlagerungsbild (Merge), dass die U1 RNA direkt an TLR 3 bindet (gelb, durch Überlagerung von rot und grün). (C) Die Auftragung UVB-bestrahlter (UVR) U1 RNA auf die Haut von Mausohren führt beim Wildtyp zu einer Rötung und damit entzündlichen Reaktion (oben), nicht aber in der TLR 3-defizienten Maus (unten). Auftragung von bestrahlter Transfer-RNA (tRNA) hat keinen Effekt. Entnommen und verändert aus [25].

In weitergehenden Arbeiten konnte die Arbeitsgruppe außerdem zeigen, dass die Aktivierung von TLR 3 in Keratinozyten Gene induziert, die involviert sind beim Aufbau der Epidermis oder des Lipidstoffwechsels [26]. Die Stimulation von Keratinozyten mit Poly(I:C) führte beispielsweise TLR 3-abhängig zur Induktion von Transglutaminase-1 (TGM1), einem wichtigen Enzym zur Vernetzung von Keratinen und damit zur Ausbildung des *cornified envelope* der Epidermis [6]. Außerdem konnte nach TLR 3-Aktivierung eine Expressionssteigerung von ABCA12 (*ATP-binding cassette, subfamily A, member 12*) und SMDP1 (Sphingomyelin Phosphodiesterase 1) beobachtet werden. ABCA12 ist ein essenzieller Lipidtransporter in der Epidermis, der am transmembralen Transport von Lipiden via *lamellar bodies* in den extrazellulären Raum beteiligt ist [27]. SMDP1 ist ein Enzym, das extrazellulär Sphingomyelin in Ceramide konvertiert [28], einer wichtigen Gruppe von Lipiden, die etwa 50% der Lipidmasse im Stratum Corneum bilden [29]. Somit sind diese drei Gene an der Ausbildung der humanen Hautbarriere beteiligt.

Weitere Forschungsergebnisse deuten auf eine Funktion von TLR 3 in der Wundheilung hin. Es konnte gezeigt werden, dass TLR 3-defiziente Mäuse eine verzögerte Wundheilung aufweisen und dass die Aktivierung von TLR 3 mit dem künstlichen Liganden Poly(I:C) bei Patienten mit Wunden aus Laserbehandlungen der Haut die Wundheilung sogar beschleunigt werden kann [30].

In gealterter Haut sind Defekte in den oben beschriebenen Prozessen zu beobachten: eine verminderte Reparaturleistung nach UV-Schaden, eine reduzierte

Barrierefunktion der Haut und eine verzögerte Wundheilung. Da TLR 3 in diesen Bereichen möglicherweise eine funktionale Rolle hat, stellt sich die Frage, welche Rolle TLR 3 in diesen phänotypischen Erscheinungen der Hautalterung hat.

5.4 Elastische Fasern in der Dermis

Elastische Fasern sind ein Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix (ECM, *extracellular matrix*) in dynamischen Bindegeweben wie beispielsweise Blutgefäßen, Lunge und auch Haut. Sie verleihen dem Gewebe dauerhaft flexible Zugfähigkeit und Elastizität [31]. Die komplexe Struktur der elastischen Faser besteht aus einer Reihe verschiedener Komponenten, von denen Fibrilline und Elastin den Hauptanteil darstellen [32]. Fibrilline bilden in der ECM im Komplex mit weiteren Proteinen ein Grundgerüst aus Mikrofibrillen [32]. Elastin wird von den Zellen als löslicher monomerer Vorläufer Tropoelastin (TE) sezerniert und auf dem Mikrofibrillengerüst abgelagert. TE-Moleküle werden dann durch Lysyloxidase (LOX) miteinander verknüpft, wodurch das vernetzte reife Elastin entsteht [32]. Solche „reifen elastischen“ Fasern werden vornehmlich während pränataler Entwicklungsphasen gebildet [33–35]. Adultes Gewebe hingegen besitzt nur bedingt die Fähigkeit zur korrekten Assemblierung neuer Fasern oder der Reparatur defekter Fasern [32]. Ebenso zeigen dermale Fibroblasten alter Spender im Vergleich zu Zellen junger Spender *in vitro* eine deutlich verringerte Fähigkeit zur Ausbildung eines Elastinfasernetzwerkes [36].

Elastin, die wesentliche Komponente der elastischen Faser, wird in erster Linie von glatten Muskelzellen und Fibroblasten sekretiert [37]. Dabei codiert die Tropoelastin-mRNA für ein 72 kDa großes Polypeptid, das nach alternativem Splicen und Abspalten der N-terminalen Signalsequenz ein reifes Protein von mindestens 60 kDa Größe ergibt [37]. Innerhalb der Aminosäuresequenz des Elastins lassen sich zwei Domänen-Typen unterscheiden: hydrophobe Bereiche, die vor allem nicht-polare Aminosäuren wie Glycin, Valin und Prolin enthalten, und hydrophile Bereiche, die reich an Lysin und Alanin und vor allem an der Quervernetzung des Elastins beteiligt sind [37]. Von Bedeutung ist außerdem der stark konservierte C-Terminus, dessen Entfernung die Fähigkeit von Tropoelastin zur Assemblierung stark beeinflusst [38]. Neben den zwei einzigen Cystein-Resten innerhalb des Elastin-Moleküls enthält die C-terminale Domäne außerdem ein positiv geladenes *RKRK*-Motiv, das für die

Bindung zwischen Tropoelastin und dem Zelloberflächen-Rezeptor Integrin $\alpha_v\beta_3$ verantwortlich zu sein scheint [39]. Eine kürzlich identifizierte zentrale Binderegion in TE kann außerdem an Integrin $\alpha_v\beta_5$ binden [40].

Ultrastrukturelle Untersuchungen sich entwickelnder Fasern zeigen, dass die Assemblierung von Tropoelastin zu elastischen Fasern in mehreren Phasen verläuft [32]. Auf der Zelloberfläche aggregieren Tropoelastin-Monomere in einem spontanen Prozess (Koazervation) zu globulären Strukturen, die zunächst an der Zelle gebunden bleiben [37, 41]. Mögliche Bindungspartner für die Koazervate sind Integrin $\alpha_v\beta_3$ [39, 42], Integrin $\alpha_v\beta_5$ [40], Glykosaminoglykane [43] und das Elastinbindeprotein (*EBP, elastin binding protein*) [32, 44–46]. Die einzelnen Tropoelastinmoleküle innerhalb der Koazervate werden durch Enzyme der LOX-Familie quervernetzt [32], wobei die Bildung von Desmosin und Isodesmosin spezifisch ist für Elastin in Wirbeltieren [47]. Die Koazervate werden schließlich auf Mikrofibrillen abgelagert und in die im Aufbau befindlichen elastischen Faser integriert [37], wobei vermutlich eine weitere Vernetzung durch LOX stattfindet, so dass eine reife funktionale Faser entsteht [32].

5.5 Intrazelluläre Transportprozesse

Sekretorische Proteine folgen einer bestimmten Transportroute innerhalb der Zelle (siehe Abbildung 5) [48]. Eine N-terminale Signalsequenz leitet das naszierende Polypeptid zusammen mit den Ribosomen an das raue Endoplasmatische Retikulum (rER), in dessen Lumen das Protein hinein synthetisiert wird. Im ER falten sich die Proteine, oligomerisieren gegebenenfalls und erhalten neben Disulfidbrücken auch O-Glykosylierungen. Vesikel transportieren die Proteine zum Golgi-Apparat, den sie von der *cis* (dem Zellkern zugewandt) zur *trans* Seite (der Zellmembran zugewandt) durchqueren, wobei sie zum einen N-glykosyliert werden bzw. die bereits angehängten O-Glykosylierungen modifiziert werden. Anschließend werden die Proteine wiederum in Vesikeln verpackt und werden konstitutiv oder auf ein äußeres Signal hin sekretiert.

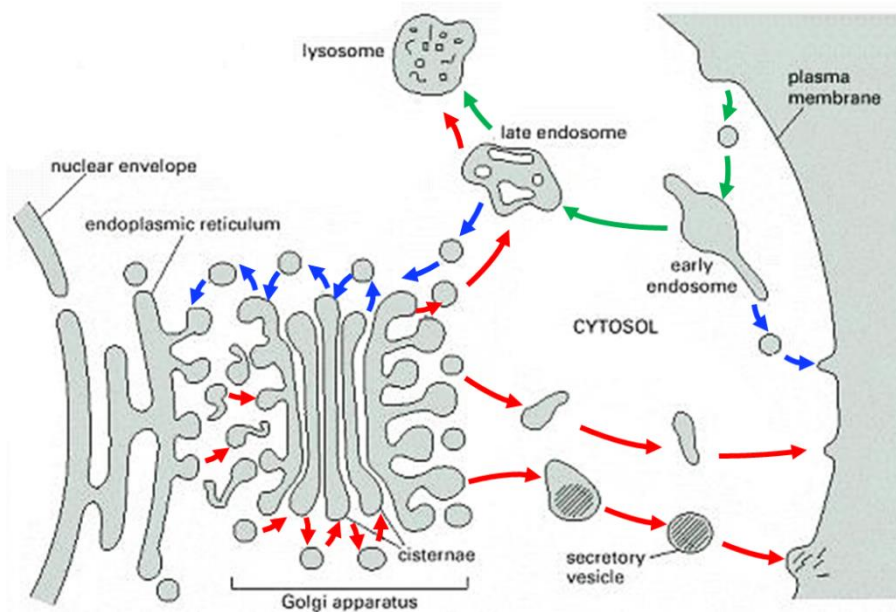


Abbildung 5 - Intrazelluläre Transportwege, entnommen aus [48]. Im biosynthetisch-sekretorischen Weg (rote Pfeile) werden Proteinmoleküle vom ER über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert oder gelangen via späte Endosomen zu Lysosomen. Im endozytotischen Weg (grüne Pfeile) werden Moleküle von der Plasmamembran in Vesikeln aufgenommen und über frühe Endosomen zu Lysosomen transportiert. Rückgewinnungswege (blaue Pfeile) transportieren Moleküle aus frühen Endosomen zurück an die Zelloberfläche oder aus dem Golgi zurück in das ER.

Von der Zelloberfläche können Moleküle mittels Endozytose wieder aufgenommen werden. Sie gelangen dann zunächst zu frühen Endosomen, die sich nahe der Plasmamembran befinden und von wo aus ein Recycling an die Oberfläche wieder möglich ist. Späte Endosomen, die eher dem Golgi und dem Nucleus zugewandt sind, verschmelzen schließlich mit Lysosomen, die eine Reihe saurer Hydrolasen enthalten und den Inhalt der Endosomen kontrolliert intrazellulär abbauen. Neben einer diskreten Funktion im Transportprozess der Zelle weisen einige Kompartimente auch einen spezifischen pH-Wert auf. Während der Reifung von frühen zu späten Endosomen fällt der pH-Wert im Lumen auf etwa 6. In den Lysosomen wird der pH-Wert durch eine ATP-getriebene Protonen-Pumpe bei 5 gehalten, was dem pH-Optimum der dort vorhandenen Hydrolasen entspricht, wodurch deren Aktivität in anderen Kompartimenten wie z.B. dem Zytosol mit einem pH-Wert von 7,2 inhibiert wird [48].

5.6 Trafficking von Tropoelastin/Elastin

Das monomere Tropoelastin besitzt eine N-terminale Signalsequenz, die das Molekül für den Eintritt in den sekretorischen Transportweg markiert, so dass TE zunächst in das Lumen des ER hinein synthetisiert wird, wo das Signalpeptid wieder abgespalten

wird [49]. Für Chondroblasten konnte mit Hilfe von Transport-Inhibitoren gezeigt werden, dass TE vom ER über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert wird. Dabei scheint allerdings ein saurer pH-Wert im *trans*-Golgi-Netzwerk und endosomalen Kompartimenten für die korrekte Ausschleusung des TE von Bedeutung zu sein [50]. Von der Plasmamembran wird TE nicht direkt in den extrazellulären Raum sezerniert, sondern akkumuliert zunächst auf der Zelloberfläche zu globulären Strukturen von 2-6 μM Durchmesser [51], bevor es auf Mikrofibrillen abgelagert wird und zur elastischen Faser reift. Als mögliche Bindungspartner auf der Zelloberfläche werden neben dem Integrin $\alpha_v\beta_3$ [39] auch Heparansulfat [43] und das Elastin-Bindeprotein [44, 52] diskutiert.

Damit neu synthetisiertes und lösliches TE nicht schon innerhalb der Zelle aggregiert oder enzymatisch abgebaut wird, wird angenommen, dass TE intrazellulär von Schutzproteinen oder Chaperonen begleitet wird [52, 53]. Für Tropoelastin wird postuliert, dass es schon im ER vom Elastin-Bindeprotein (EBP), einer Spleißvariante der β -Galaktosidase, gebunden wird und in einem Komplex mit Cathepsin A (PPCA) und Neuraminidase-1 (Neu-1) vorliegt [54] (siehe Schema in Abbildung 6). Der EBP-Komplex eskortiert Elastin dann an die Zelloberfläche, wo PPCA Neu-1 aktiviert. EBP bindet an von Neu-1 freigelegte Bindungsstellen an Mikrofibrillen und entlässt daraufhin Tropoelastin aus dem Komplex. EBP kann anschließend von der Zelle wieder aufgenommen werden und erneut Tropoelastin für den Transport an die Zelloberfläche aufnehmen [54]. Auch wenn EBP eine essenzielle Rolle in der Elastogenese zugeschrieben wird [45], sei darauf hingewiesen, dass für β -Galaktosidase gendefiziente Mäuse kein auffälliger Phänotyp bezüglich der Bildung elastischer Fasern beschrieben ist [55], so dass möglicherweise ein anderes Protein den Ausfall von β -Galaktosidase kompensieren kann.

Ein weiteres Protein, das mit Tropoelastin im Laufe der Sekretion assoziiert, ist das ER-lokalisierte Immunophilin FKBP65 [53, 56]. Die Expression von FKBP65 ist nicht konstitutiv, sondern erfolgt spezifisch während Wachstums- und Entwicklungsphasen des Gewebes [56] und folgt damit einem ähnlichen Muster wie Tropoelastin. Aufgrund seiner Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerase (PPIase) Aktivität wurde FKBP65 als potenzieller Faltungshelfer für Tropoelastin in Betracht gezogen [53], jedoch zeigen neuere Studien mit rekombinantem FKBP65, dass es die Koazervation von Tropoelastin unabhängig von seiner Enzymfunktion fördern kann [57, 58].

Elastin kann nach der Sekretion wieder intrazellulär aufgenommen werden (möglicherweise unter Beteiligung von EBP [59]) und schließlich lysosomal abgebaut werden. Dabei scheint besonders die Protease Cathepsin K eine wichtige Rolle zu spielen, wobei Hautfibroblasten alter Spender nach UVA-Bestrahlung im Gegensatz zu Zellen junger Spender nicht in der Lage sind, Cathepsin K zu aktivieren [60].

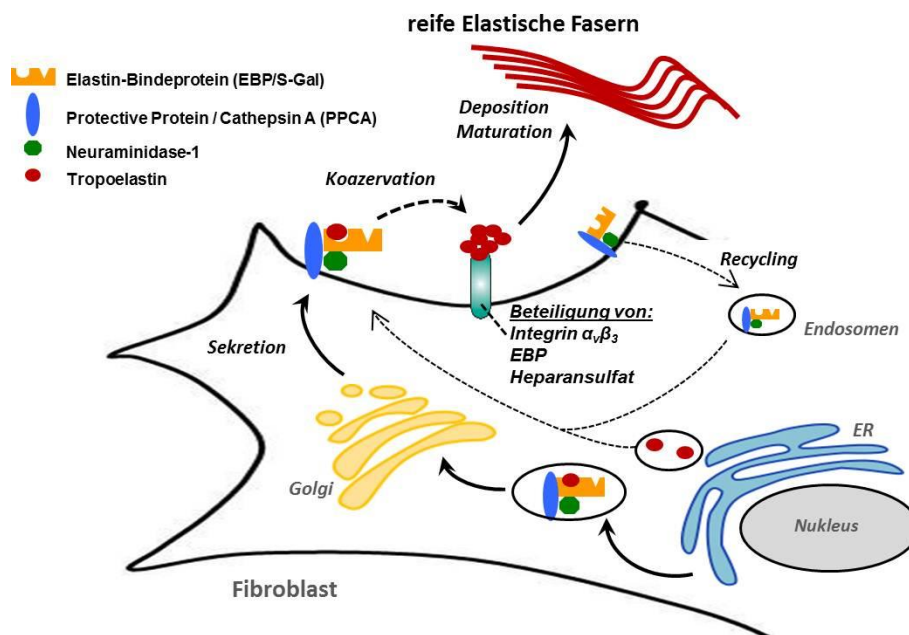


Abbildung 6 - Schematische Darstellung intrazellulärer Transportprozesse von Tropoelastin am Beispiel des Fibroblasten. Das monomere TE wird als sekretorisches Protein in das ER hinein translatiert und vermutlich schon dort in einen Proteinkomplex aus EBP, PPCA und Neu-1 gebunden und gelangt im Komplex über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Gebunden an entsprechende Oberflächenmoleküle koazervieren die TE-Monomere zunächst zu globulären Strukturen, bevor sie auf das extrazelluläre Mikrofibrillengerüst abgelagert werden und nach Quervernetzung durch Lysyloxidase das reife Elastin entsteht.

Dass intrazelluläre Transportprozesse die erfolgreiche Ablagerung von Tropoelastin zu reifen elastischen Fasern maßgeblich beeinflussen können, zeigen besondere Cutis Laxa Phänotypen, die nicht durch Mutationen an Strukturbestandteilen der Faser hervorgerufen werden, sondern vielmehr Folge metabolischer Störungen sind [61].

In einer Studie unter Patienten mit autosomal rezessivem Cutis Laxa Typ 2, ein Syndrom, das unter anderem mit inelastischer, faltiger Haut einhergeht, konnte gezeigt werden, dass eine Mutation im Gen *ATP6V0A2* ursächlich ist [62]. Dieses Gen codiert für die α_2 -Untereinheit der Protonen-pumpenden vesikulären ATPase. Diese V-Typ ATPase ist für die Ansäuerung von Lysosomen, Endosomen und dem *trans*-Golgi-Apparat verantwortlich. Verlust oder Knockdown der ATPase führen zu

abnormalen Golgi Cisternen und intrazellulärer Akkumulation von Tropoelastin, was letztlich zu einer verminderten Ablagerung von Tropoelastin in elastischen Fasern führt, obwohl Fibrillin-1 und LOX Aktivität normal erscheinen [62].

Untersuchungen an dermalen Fibroblasten mit Mutationen im β -Galaktosidase-Gen unterstreichen die mögliche Bedeutung von EBP für die Elastogenese [46]. GM1-Gangliosidose Patienten tragen eine Mutation im Gen für β -Galaktosidase, die nur die lysosomale β -Galaktosidase, aber nicht deren Spleißvariante EBP betreffen. Fibroblasten dieser Patienten zeigen eine normale Elastogenese im Gegensatz zu Fibroblasten von Morquio B Patienten, die eine Mutation aufweisen, die die Funktion von β -Galaktosidase und EBP betrifft [46].

Ein weiteres Krankheitsbild, das durch eine gestörte Elastogenese gekennzeichnet ist, ist das Hurler Syndrom, das durch eine Defizienz der lysosomalen α -L-Iduronidase verursacht wird [63]. Dabei akkumulieren Dermatan- und Heparansulfat sowohl intra- als auch perizellulär, wobei vermutlich Dermatansulfat (und nicht Heparansulfat) ein erhöhtes *Shedding* von EBP von der Zelloberfläche bewirkt, wodurch schließlich die Elastogenese gestört ist [63].

5.7 Inhibitoren zur Analyse intrazellulärer Transportwege

In der Literatur sind verschiedene Inhibitoren beschrieben, die den Transportweg sekretorischer Proteine an spezifischen zellulären Punkten beeinflussen (siehe Abbildung 7) und auch eine Wirkung auf den Transport von Tropoelastin haben sollen [50].

Brefeldin A findet intensiven Einsatz, um den Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat zu unterbinden [64]. In Gegenwart dieses Inhibitors wird der Membrantransport vom ER zum Golgi blockiert. Gleichzeitig findet ein extensiver retrograder Transport vom Golgi zum ER statt, so dass der Golgi-Apparat disassembliert und ein großes Golgi/ER-Kompartiment entsteht, in dem sekretorische Proteine zurückgehalten werden [65].

Das Ionophor Monensin hingegen beeinflusst nicht das ER, sondern unterbindet den Transport innerhalb des Golgi-Apparates von der *cis*- zur *trans*-Seite. Dadurch werden Proteine im Golgi zurückgehalten, wodurch dieser schließlich anschwillt [66].

Bafilomycin A1 wirkt auf den intrazellulären pH-Wert entlang des Proteintransportweges [50]. Durch spezifische Hemmung der H-ATPase des V-Typs ist die Zelle nicht in der Lage, das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), sowie endosomale und lysosomale Kompartimente anzusäuern. Die Morphologie der Zellorganellen bleibt dabei jedoch intakt [67].

Verlust oder *Knockdown* der ATPase führen (wie in 5.6 beschrieben) zu abnormalen Golgi-Zisternen und intrazellulärer Akkumulation von Tropoelastin, was letztlich zu einer verminderten Ablagerung von Tropoelastin in elastischen Fasern führt, obwohl die Faserbildung von Fibrillin-1 und die Lysyloxidase-Aktivität normal erscheinen [62].

Da für Bafilomycin A1 die Hemmung dieser ATPase beschrieben ist [68], kann möglicherweise deren Bedeutung für den Tropoelastin-Transport über Immunfluoreszenzfärbungen im *in vitro* Modell nachvollzogen werden.

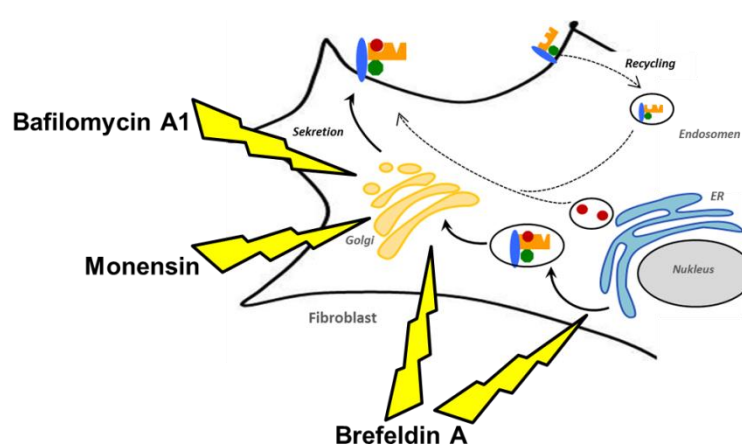


Abbildung 7 – Angriffspunkte verschiedener Inhibitoren auf die Proteinsekretion. Bafilomycin A1 hemmt die H⁺-ATPase des V-Typs, wodurch das TGN, sowie lyso- und endosomale Kompartimente nicht korrekt angesäuert werden können. Monensin unterbindet innerhalb des Golgi-Apparates den Transport von der zellkernnahen *cis*- zur *trans*-Seite. Brefeldin A inhibiert den Transport vom ER zum Golgi, wobei der retrograde Transport vom Golgi zum ER erhalten bleibt, so dass ein fusioniertes ER/Golgi-Kompartiment entsteht.

5.8 Modelle zur Visualisierung der Elastogenese

Ein Ansatz, um die dermale Elastogenese besser zu verstehen, ist dessen Visualisierung im Zellkultur-Modell. Bei der Beiersdorf AG ist in vorangegangenen Arbeiten das MEF-Modell (Multilayer-Elastische-Faser-Modell) entwickelt und charakterisiert worden [69]. Dafür wurden neonatale humane dermale Fibroblasten mit TGF- β 1 im Zellkulturmodell stimuliert. Die Visualisierung von TE/Elastin im

Rahmen mikroskopischer Analysen wurde in diesem Modell mittels Antikörper-Markierung in fixierten Zellkulturen erreicht. Diese Methode erlaubt allerdings keine dynamische oder Langzeit-Visualisierung der Elastogenese im lebenden dermalen Fibroblasten. Alternativ zur Antikörpermarkierung können dafür fluoreszierende Proteine herangezogen werden. Durch Anheftung dieser Marker an das interessierende Targetprotein/-gen wird ein visuell verfolgbares Fusionsprotein erzeugt, das durch Transfektion in der Zielzelle exprimiert werden kann. In der Literatur sind verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen, Zelltypen und auch Elastinvarianten beschrieben. Kozel et al. beschreiben ein Modell, in dem ein Konstrukt aus bovinem TE und dem Fluoreszenzprotein Timer in Lungen-Fibroblasten aus Ratten (RFL-6 Zellen) zur Expression gebracht wird [41]. Sie beschreiben mit diesem Modell frühe Stadien der Koazervation. Ob dieses Modell aber auch in der Lage ist, Elastinfasern auszubilden, wird insbesondere aufgrund der transienten Expression nicht beantwortet. Xiong et al. erzeugen in ihrem Modell eine stabile Expression mit Hilfe eines adenoviralen Systems. In diesem Fall wurde TE aus Ratten in Zellen der vaskulären glatten Muskulatur (VSMCs, *vascular smooth muscle cells*) ebenfalls aus Ratten exprimiert [70]. Ein Modell zu Expression von fluoreszenzmarkiertem, humanem Elastin im Kontext humaner Zellen, das funktional im Sinne einer in vitro Faserbildung ist, ist aktuell noch nicht beschrieben.

5.9 *Ground State Depletion* Mikroskopie

Ultrastrukturelle Analysen von in vivo und in vitro gebildeten Elastinfasern und ihren Komponenten wurden bisher insbesondere mit Hilfe elektronenmikroskopischer Verfahren durchgeführt [41, 69, 71–77]. Diese Methoden sind vergleichsweise zeitaufwendig in der Präparation der Proben und ermöglichen kaum eine spezifische Markierung des gewünschten Proteins. Jüngste Entwicklungen in der Lichtmikroskopie [78, 79] sind in der Lage, die spezifische Antikörper-Markierung der klassischen Fluoreszenzmikroskopie mit einer Auflösung unterhalb der von Ernst Abbe beschriebenen Beugungsgrenze [80] zu kombinieren. Eines dieser als Superresolution-Mikroskopie bezeichneten Verfahren ist die *Ground State Depletion* (GSD) Mikroskopie.

GSD Mikroskopie ist eine Superresolution-Fluoreszenzmikroskopie-Methode, die auf dem statistischen Schalten von Fluorophoren zwischen einem dunklen “off”- und einem fluoreszierenden “on”-Zustand basiert [81, 82] (Abbildung 8).

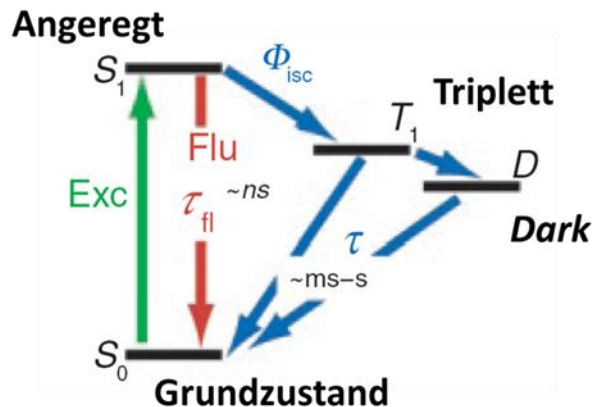


Abbildung 8 – Energiediagramm eines Fluorophors [81]. Fluorophore können mit Licht einer spezifischen Wellenlänge aus ihrem Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 gehoben werden (Exc), fallen aber daraus schnell unter Emission von Licht einer anderen Wellenlänge auf S_0 zurück (Flu). Mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit Φ finden aus S_1 heraus Übergänge (*intersystem crossing*, isc) in einen dunklen nicht-anregbaren Zustand statt (Triplet-Zustand T_1 oder Dunkelzustand D). Diese Dunkelzustände haben eine vergleichbar längere Lebensdauer, so dass die Fluorophore daraus nur langsam in den anregbaren Grundzustand S_0 zurückkehren.

Nutzt man hohe Laserintensitäten für die Anregung, kann der elektronische Grundzustand S_0 der Fluoreszenzmoleküle geleert werden (*depletion*) und die Moleküle werden mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit Φ in einen dunklen “off” Zustand mit einer vergleichbar längeren Lebensdauer τ verschoben (in den metastabilen Triplet-Zustand T_1 oder weiteren Dunkelzustand D) [81]. Kehrt ein Molekül nach Ablauf der Lebensdauer zum Grundzustand S_0 zurück, kann es von dort wiederholt durch repetitive Zyklen von Anregung in den S_1 -Zustand und Fluoreszenz laufen (*photonburst*) [81], bevor es wieder in den dunklen „off“ Zustand verschoben wird. Dieser Prozess hat zur Folge, dass sich zu einem bestimmten Zeitpunkt nur ein Bruchteil der Moleküle im anregbaren „on“ Zustand befindet. Die Fluoreszenzanregung dieser vereinzelt Moleküle resultiert in punktuellen Signalen. Unter der Annahme, dass jedes dieser Signale auf ein einzelnes Fluorophor-Molekül zurückgeht, kann dessen Lokalisation aus dem erhaltenen Fluoreszenzsignal berechnet werden. Nimmt man eine hohe Zahl einzelner Bilder auf (typischerweise etwa bis zu 100.000 Frames), lokalisiert die Fluorophore in jedem detektierten Event und projiziert diese lokalisierten Fluoreszenzereignisse auf eine Fokusebene, erhält man ein hochauflösendes lichtmikroskopisches Bild [81]. Die Auflösung eines

solchen Bildes beruht damit auf der Lokalisationspräzision der Fluorophore [78] und ist nicht, wie für konventionelle Mikroskopie beschrieben [80], beugungslimitiert auf etwa die halbe Wellenlänge des Lichts. Mit GSD-Mikroskopie können Auflösungen deutlich unter 100 nm erreicht werden, die je nach Auswahl des Fluorophors und den Probenbedingungen im Bereich von 15-50 nm liegt [83, 84]. Da für feine Elastinfasern eine Größe von 100-200 nm beschrieben wird [85], eröffnet GSD-Mikroskopie die Möglichkeit, auch die Substruktur gebildeter Elastinfasern zu analysieren.

6 Zielsetzung

Sowohl die humane Epidermis als auch die Dermis spielen im Kontext der Hautalterung eine wichtige Rolle.

Die Epidermis stellt insbesondere eine schützende Barriere zur Außenwelt dar, die in der Altershaut an Funktionalität verliert. Jüngste Forschungsergebnisse zeigen, dass TLR 3 in der Epidermis zusätzlich zu seiner immunologischen Aufgabe möglicherweise auch im Zusammenhang mit der Ausbildung der Hautbarriere, der Schutzfunktion der Epidermis und der Detektion von UV-Schäden entscheidend beteiligt ist. Um diese potenzielle Rolle von TLR 3 zu erforschen, sollen ex vivo Proben humaner Haut herangezogen werden und insbesondere im Hinblick auf mögliche Altersunterschiede untersucht werden. Zur Analyse TLR 3-abhängiger Prozesse in humanen Keratinozyten soll ein in vitro Modell unter Verwendung eines spezifischen TLR 3-Knockdowns etabliert werden. Dieses Modell soll dann eingesetzt werden für Genexpressionsanalysen, um insbesondere TLR 3-abhängig regulierte Gene und Funktionen zu identifizieren, die nicht inflammatorischer Natur sind. Daraus soll ein weitergehendes Verständnis der Funktion und Bedeutung von TLR 3 in der humanen Epidermis entwickelt werden.

Der Elastizitätsverlust in der Altershaut geht insbesondere einher mit dem Verlust funktionaler dermaler elastischer Fasern. Diese zu regenerieren, um die Elastizität der Haut wiederherzustellen, ist ein Ziel kosmetischer Forschung. Die Elastogenese der humanen dermalen Fibroblasten ist allerdings noch nicht vollständig verstanden, insbesondere im Hinblick auf intrazelluläre Transportprozesse. Im Rahmen dieser Arbeit sollen daher mit Hilfe eines elastinfaserbildenden Zellkulturmodells, des MEF-Modells, frühe Stadien der Elastinsekretion mit Hilfe von Immunmarkierungen untersucht werden. Mit dem Ziel der *Live Cell* Visualisierung ist außerdem angestrebt, das bestehende MEF-Modell weiterzuentwickeln. Dazu ist beabsichtigt, humanes Elastin mit einem Fluoreszenzprotein zu markieren und das Fusionsprotein in humanen Fibroblasten zu überexprimieren. An diesem Modell sollen außerdem die Möglichkeiten der GSD-Mikroskopie bezüglich der Analyse der Substruktur von Elastinfasern aufgezeigt werden.

7 Material

7.1 Geräte

Name	Hersteller
7900 HT Fast Real Time PCR System	Life Technologies, Carlsbad, USA
CASY Cell Counter	Roche, Basel, CH
Eindeckautomat Leica CV 5030	Leica, Wetzlar, D
Fluoreszenzmikroskop IX 71	Olympus, Hamburg, D
Infinite M200, Mikrotiterplatten-Reader	Tecan, Männedorf, CH
Konfokales Laser Raster Mikroskop (CLSM), Leica TCS SP5	Leica Microsystems, Mannheim, D
Ground State Depletion Mikroskop (GSD) Prototyp im Rahmen eines BMBF-Projektes	Leica Microsystems, Mannheim, D und PCO, Kelheim, D
Kryostat Leica CM3050S	Leica, Wetzlar, D
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	PEQLAB, Erlangen, D
Neon® Transfektionssystem	Life Technologies, Carlsbad, USA
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
PCR Thermal Cycler Arktik™	Thermo Fisher, Waltham, USA
XCell SureLock™ Mini-Cell + Blot Module	Life Technologies, Carlsbad, USA

7.2 Software

Name	Hersteller
Origin Pro 8G	OriginLab, Northampton, USA
Leica Application Suite Advanced Fluorescence, LAS AF (Version 2.7.3.9723)	Leica Microsystems, Mannheim, D
LAS AF Lite	Leica Microsystems, Mannheim, D
ImageJ	NIH, Bethesda, USA
RQ Manager 1.2	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ingenuity® Pathway Analysis (IPA®), www.qiagen.com/ingenuity	QIAGEN, Redwood City, USA

7.3 Chemikalien

Name	Hersteller
20x Reducing Agent	Thermo Fisher, Waltham, USA
4x Protein Loading Buffer	Thermo Fisher, Waltham, USA

Name	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt, D
Adipo Red™ Assay Reagent	Lonza, Basel, CH
Albumin Fraktion V (aus Rinderserum)	Merck, Darmstadt, D
ALLN (Calpain Inhibitor I)	Sigma-Aldrich, München, D
Bafilomycin A1	Sigma-Aldrich, München, D
Blasticidin S	Life Technologies, Carlsbad, USA
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, München, D
Catalase from bovine liver, aqueous suspension	Sigma-Aldrich, München, D
Chloroquin	Sigma-Aldrich, München, D
Collagen from rat tail, Bornstein and Traub Type I	Sigma-Aldrich, München, D
Complete Ultra Mini Protease Inhibitor	Roche, Basel, CH
DAPI	AppliChem, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, München, D
DRAQ5® Stain	Biostatus, Shepshed, UK
DTT	Sigma-Aldrich, München, D
EGTA	Sigma-Aldrich, München, D
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Glucose Oxidase from Aspergillus Niger, Type VII	Sigma-Aldrich, München, D
HBSS 10x, Calcium, Magnesium, Phenol Red	Life Technologies, Carlsbad, USA
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, München, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Mitomycin C from Streptomyces caespitosus	Sigma-Aldrich, München, D
Monensin	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, München, D
Nutrient Mixture F-12 Ham	Sigma-Aldrich, München, D
Odyssey Protein Molecular Weight Marker	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Oil Red O Solution, 0,5% in Isopropanol	Sigma-Aldrich, München, D
Paraformaldehyd-Lösung	Polysciences, Warrington, USA
PMSF-Lösung in Ethanol	Sigma-Aldrich, München, D
Polybrene®, 10 mg/mL	Millipore, Darmstadt, D

Name	Hersteller
Polyinosinic–polycytidylic acid, Poly(I:C)	Sigma-Aldrich, München, D
Puromycin Dihydrochloride	Life Technologies, Carlsbad, USA
Recombinant Human TGF- β 1 (HEK293 derived)	PeproTech, Hamburg, D
Sapphire700™ Stain	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
SDS-Lösung, 20 % in Wasser	Sigma-Aldrich, München, D
SYTOX® Green Nucleic Acid Stain	Life Technologies, Carlsbad, USA
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NL
Transforming growth factor β 1	PeproTech, Rocky Hill, USA
Tris	Sigma-Aldrich, München, D
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, München, D
Tween® 20	Merck, Darmstadt, D
Urea, 8 M	Sigma-Aldrich, München, D
Vitamin C	Sigma-Aldrich, München, D
β -Mercaptoethylamin (MEA, Cysteamin)	Sigma-Aldrich, München, D

7.4 Verbrauchsmaterialien

Einweg-Plastikwaren und andere Standard-Verbrauchsmaterialien, wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Probenröhrchen, Zellkulturplatten usw., wurden von den Firmen Thermo-Scientific (Waltham, USA), Life Technologies (Carlsbad, USA), Greiner bio-one (Frickenhausen, D), Eppendorf (Hamburg, D) und VWR (Darmstadt, D) bezogen.

Spezielle Verbrauchsmaterialien:

Name	Hersteller
LabTek™ Chambered Coverglasses	Thermo Scientific, Waltham, USA
Super Frost Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig, D
Deckgläser	Menzel, Braunschweig, D
Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwich	Life Technologies, Carlsbad, USA
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, D
Steriflip® Filtereinheiten	Millipore, Darmstadt, D
Minisart® plus Spritzenvorsatzfilter 0,2 μ m	Sartorius, Göttingen, D
Deckgläser, Nr. 1,5, Durchmesser 18 mm	VWR, Darmstadt, D

7.5 Zellen

Zelltyp	Quelle	Lot	Hersteller
Neonatale humane dermale Fibroblasten (HDFneo)	Vorhaut	2638, 2710, 2718	Tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, FR
neonatale normale humane epidermale Keratinozyten (NHEKneo)	Vorhaut	242022, 245638, 253666	Lonza, Basel, CH
Adulte dermale Fibroblasten verschiedener Spender (isoliert aus humaner Haut, siehe 7.6))	diverse Areale	---	Isoliert bei der Beiersdorf AG

7.6 Humane Haut für Biopsiematerial oder Zellisolation

Aus einer bei der Beiersdorf AG durchgeführten Studie (Freiburger Ethik Kommission International, Votum Nr. 010/2183) stand Biopsie-Material für Kryohautschnitte zur Verfügung.

Humane Haut wurde außerdem über verschiedene Kooperationspartner bezogen, die überschüssige Haut aus plastisch-chirurgischen Eingriffen zur Verfügung stellten. Alle Spender wurden vorher ausführlich informiert und eine schriftliche Einwilligung zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke wurde eingeholt. Die Proben wurden nach Entnahme direkt bei 4°C in Medium gelagert und kurze Zeit nach der Entnahme der Haut wurde das Fettgewebe entfernt.

Aus dem Material wurden Biopsien entnommen und diese bis zur weiteren Verwendung für Kryohautschnitte bei -80°C gelagert.

Die Isolierung von Fibroblasten aus Hautmaterial wurde von Mitarbeitern der Beiersdorf AG durchgeführt. Dafür wurde die bei 4°C gelagerte Haut zunächst mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke zerteilt, anschließend in 70-%igem Ethanol desinfiziert und mit PBS gewaschen. Für die Trennung von Epidermis und Dermis wurden die Hautstücke 2 h bei 37°C mit Dispase II (2,4 U/mL PBS) inkubiert. Die Dermisstücke wurden anschließend mit einer sterilen Schere weiter zerkleinert und über Nacht bei 37°C mit Collagenase I (312 U/mL DMEM) behandelt. Die entstandene Suspension wurde mittels Zellsieb (70 µm Maschenweite) filtriert und 10 min bei 1500 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Standardmedium HDF in Zellkulturflaschen überführt und von dort weiterkultiviert.

7.7 Zellkulturmedien und Medienzusätze

Medium	Konz.	Hersteller
Mediumbestandteile		
Standardmedium HDF, HDFneo		
DMEM High Glucose	90 Vol %	Life Technologies, Carlsbad, USA
FCS	10 Vol %	GE Healthcare, Chalfont, UK
Penicillin/Streptomycin	10 U/mL / µg/mL	Life Technologies, Carlsbad, USA
GlutaMAX	2 mM	Life Technologies, Carlsbad, USA
Kryomedium HDF, HDFneo		
Standardmedium	50 Vol %	s.o.
FCS	40 Vol %	GE Healthcare, Chalfont, UK
DMSO	10 Vol %	Sigma-Aldrich, München, D
Standardmedium NHEK		
KGM Gold Bullet Kit (mit Calcium)		Lonza, Basel, CH
Kryomedium NHEK		
Standardmedium	73 Vol %	s.o.
FCS	20 Vol %	GE Healthcare, Chalfont, UK
DMSO	7 Vol %	Sigma-Aldrich, München, D
Keratinocyten-Stopp		
PBS	90 Vol %	GE Healthcare, Chalfont, UK
FCS	10 %	GE Healthcare, Chalfont, UK
Penicillin/Streptomycin	10 U/mL / µg/mL	Life Technologies, Carlsbad, USA
Trypsin/EDTA (1:250), 1x		GE Healthcare, Chalfont, UK
OptiMEM		Life Technologies, Carlsbad, USA
Lipofectamine® 2000		Life Technologies, Carlsbad, USA
Lipofectamine® RNAiMAX		Life Technologies, Carlsbad, USA
rFAD		
DMEM High Glucose	375 mL	Life Technologies, Carlsbad, USA
Hams F12	125 mL	Sigma-Aldrich, München, D
FCS	50 mL	GE Healthcare, Chalfont, UK
Penicillin/Streptomycin	5 mL	Life Technologies, Carlsbad, USA
Vitamin C (50 mg/mL)	500 µL	Sigma-Aldrich, München, D
Hydrocortison (0,4 mg/mL)	500 µL	Sigma-Aldrich, München, D
DMEM ^{9p} -2 (Anti-Bleich-Medium)		Evrogen, Moskau, RUS

7.8 Kommerzielle Kits

Name	Hersteller
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
Neon® Transfection System 10/100 µL Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
BioPlex Human Cytokine Group I 2-Plex Assay (IL-6, TNF-alpha)	Bio-Rad, Hercules, USA
BC-Assay Protein Quantitation Kit	Interchim Uptima, Montluçon, F

Name	Hersteller
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad, Hercules, USA
Protein-Standardreihe (Bovine Serum Albumin Standard Pre-Diluted Set, 125-2000 µg/mL)	Thermo Fisher, Waltham, USA
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Carlsbad, USA
BrdU Cell Proliferation Assay	Millipore, Darmstadt, D

7.9 Puffer und Lösungen

Kommerzielle Puffer

Name	Hersteller
Dulbecco's PBS (w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺), pH 7,2	GE Healthcare, Chalfont UK
CASY® ton	Roche, Basel, CH
RIPA-Puffer (10x)	Cell Signaling, Cambridge, UK
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Life Technologies, Carlsbad, USA
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Life Technologies, Carlsbad, USA
Odyssey Blocking Buffer	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Sonstige Puffer

Name	Zusammensetzung
TBS (10x), pH 7,6	1 M Tris 1,5 M NaCl
TBS-T	10 Vol. % TBS (10x), pH 7,6 0,1 Vol. % Tween 20 ad 1 L dH ₂ O
IFA-Blockpuffer	0,5 Gew.% BSA in PBS
Urea-Lysepuffer	8 M Urea 50 mM TRIS, pH 7,4 1 mM EGTA 2 mM DTT 2 mM PMSF 1 Tablette Complete Ultra Mini Protease Inhibitor ad 10 mL dH ₂ O
GSD Probenpuffer (optimiert), vgl. [83]	50 mM Tris HCl pH 8 10 mM NaCl 10 % (w/v) Glucose 0,4 mg/mL Glucose Oxidase 55 µg/mL Katalase 10 mM β-Mercaptoethylamin

7.10 Antikörper

Primäre Antikörper und Antiseren:

Antigen [Klon] Anwendung, Verdünnung	Wirt	Hersteller
TE/Elastin, human, polyklonal IFA 1:1000, WB 1:1000	Kaninchen	EPC, Owensville, USA
TE/Elastin, human, Antiserum IFA 1:500	Kaninchen	EPC, Owensville, USA #GA3317
TE/Elastin, human, polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge, UK
PDI, human [RL90] IFA 1:1000	Maus	Abcam, Cambridge, UK
Golgin-97, human [CDF4] IFA 1:500	Maus	Life Technologies, Carlsbad, USA
HA-Tag [16B12] IFA 1:500	Maus	Covance, Princeton, USA
Fibrillin, human [11C1.3] IFA 1:100	Maus	Dianova, Hamburg, D
GAPDH, polyklonal WB 1:200	Ziege	Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA
GFP [B-2] WB, 1:50	Maus	Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA
TLR-3, human, polyklonal IFA 1:50	Ziege	R&D Systems, Minneapolis, USA
TLR-3, human, polyklonal IFA 1:100	Ziege	Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, USA
TLR-3, human, polyklonal IFA 1:100 (Alexa 647 konjugiert)	Kaninchen	Novus Biologicals, Littleton, USA
α -Tubulin [DM1A] IFA 1:1000	Maus	Abcam, Cambridge, UK

Sekundäre Antikörper:

Spezifität	Fluorophor	Wirt	Bezogen von
Maus IgG	Alexa 488	Esel	Life Technologies, Carlsbad, USA
Maus IgG	Alexa 647	Esel	Life Technologies, Carlsbad, USA
Kaninchen IgG	Alexa 488	Esel	Life Technologies, Carlsbad, USA
Kaninchen IgG	Alexa 647	Esel	Life Technologies, Carlsbad, USA
Kaninchen IgG	800 CW (IRDye®)	Esel	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Maus IgG	800 CW (IRDye®)	Esel	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Ziege IgG	680 CW (IRDye®)	Esel	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA

Spezifität	Fluorophor	Wirt	Bezogen von
Ziege IgG	Alexa 647	Esel	Life Technologies, Carlsbad, USA
Maus IgG	KK943	Esel	MPI Göttingen, Dr. Stefan Jakobs

7.11 Small interfering RNA (siRNA)

Die hier aufgeführte siRNA wurde ausschließlich von der Firma Qiagen (Venlo, Niederlande) bezogen.

Name	ID
AllStars Negative Control	SI0365031
AllStars Hs Cell Death	SI04381048
ATP6V0A2 (Set mit Nr. 1, 6, 7 und 8)	GS23545
TLR3	SI02630768

7.12 Plasmide

Zur Überexpression von markiertem Elastin wurde für humanes TE eine cDNA-Sequenz ausgewählt, wie sie von Zhang et al. [86] für humane Fibroblasten publiziert wurde. Diese Sequenz wurde durch sechs zusätzliche Aminosäuren des Exons 24A ergänzt, die von Fazio et. al [87] beschrieben sind und ebenfalls auf der cDNA von Tropoelastin aus humanen Fibroblasten basieren. Verschiedene Plasmide mit dieser ELN-Sequenz und unterschiedlichen Tags standen zur Verfügung (nachfolgende Tabelle).

Name	Beschreibung	Plasmid erhalten von...
EGFP-ELN	<i>enhanced GFP</i> gekoppelt an humanes Elastin	Prof. Dr. Stefan Jakobs, MPI Göttingen, D
HA/His/Myc-ELN	Hämagglutinin/6-fach His/c-Myc gekoppelt an humanes Elastin	Beiersdorf AG (intern), Hamburg, D
EGFP	Enhanced GFP, Plasmid pEGFP-C1	Beiersdorf AG (intern), Hamburg, D

7.13 Lentivirale Partikel

Die Synthese eines Gens für fluoreszenzmarkiertes Elastin, die nachfolgende Subklonierung in einen pLenti6/V5-Vektor und die abschließende Produktion der

lentiviralen Partikel wurde bei der Firma Life Technologies in Auftrag gegeben. Das bedeutet im Einzelnen:

Life Technologies wurde eine Elastin-Gensequenz (siehe 7.12) zur Verfügung gestellt, an die in Absprache mit dem MPI in Göttingen eine Linker Sequenz und eine Sequenz für das Fluoreszenz-Protein Citrin angehängt wurde (gesamte Sequenz, siehe 15.1). Diese Sequenz wurde mit zusätzlichen Rekombinationstellen synthetisiert und zunächst in einen pDONR221 Vektor kloniert. Aus diesem Vektor wurde das gewünschte Gen umklont in einen DEST-pLenti6/V5-Vektor, der neben den Elementen, die für die Proteinexpression in Säugerzellen nötig sind, auch jene enthält, die für die Verpackung in einen lentiviralen Partikel relevant sind. Für die Produktion der Viruspartikel wurden bei Life Technologies 293FT-Zellen co-transfiziert mit dem generierten pLenti6/V5-Vektor und einem sogenannten Packaging Mix, der Plasmide zur Expression der entsprechenden Viruskomponenten enthält. Der virale Überstand wurde geerntet, aufkonzentriert und der Titer bestimmt. Von Life Technologies wurden schließlich 20 Aliquots à 50 µL des aufkonzentrierten Virus-Stocks erhalten.

7.14 TaqMan®-Genexpressions-Assays

Die hier aufgeführten TaqMan® Assays wurden ausschließlich von der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen.

Gensymbol	Beschreibung	Assay ID
18S	18S rRNA	Hs99999901_s1
ABCA12	ATP-binding cassette, sub-family A, member 12	Hs00292421_m1
AQP10	Aquaporin 10	Hs00369738_m1
CLDN1	Claudin 1	Hs00221623_m1
DSG1	Desmoglein 1	Hs01043114_g1
HES1	HES1	Hs00172878_m1
IL36G	Interleukin 36, gamma	Hs00219742_m1
IL6	Interleukin-6	Hs00985639_m1
KRT1	Keratin 1	Hs01549614_g1
KRT10	Keratin 10	Hs01043114_g1
KRT4	Keratin 4	Hs00970607_g1
MMP9	Matrix-Metalloproteinase-9	Hs00234579_m1

Gensymbol	Beschreibung	Assay ID
NOTCH1	Notch	Hs01062014_m1
SMPD1	Sphingomyelin Phosphodiesterase 1	Hs03679347_g1
TGM1	Transglutaminase 1	Hs01070310_m1
TJP2	Tight junction protein 2	Hs00910543_m1
TLR3	Toll-like Rezeptor 3	Hs01551078_m1
TNF	TNF-alpha	Hs01113624_g1

8 Methoden

8.1 Zellbiologische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Zellkulturarbeiten unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank mit den zelltypentsprechenden Standardmedien durchgeführt.

8.1.1 Standardkultivierung von Zellen

Um die Zellen aus der Kryokonservierung in Kultur zu nehmen wurden diese schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zu wenigen Millilitern des entsprechenden vorgewärmten Standardmediums gegeben. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 rpm wurde das Zellpellet in frischem Standardmedium aufgenommen und die Zellen in den gewünschten Kulturgefäßen ausgesät und bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage, spätestens jedoch wenn sich das Medium aufgrund von pH-Wert Änderungen verfärbte.

Zur Subkultivierung oder Aussaat der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden wenige Milliliter Trypsin/EDTA-Lösung auf den Zellen verteilt und die Zellen bis zu 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zum Beenden der Trypsinreaktion wurden die abgelösten Zellen in FCS-haltiger Lösung (HDFneo-Standardmedium bzw. Keratinozyten-Stopp) aufgenommen. Fibroblasten wurden aus dieser Suspension direkt subkultiviert oder für Experimente ausgesät. Keratinozyten wurden zunächst 5 min bei 1000 rpm und RT zentrifugiert, das Pellet in frischem NHEK-Standardmedium resuspendiert und anschließend ausgesät.

8.1.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde nach dem Ablösen und Resuspendieren der Zellen mit Hilfe des CASY Cell Counters bestimmt. Dazu wurden 100 µL der Zellsuspension mit 10 mL CASY ton vermischt und eine Dreifachmessung am Gerät durchgeführt.

8.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Um Zellen für die Kryokonservierung vorzubereiten, wurden diese zunächst mit Trypsin/EDTA wie in 8.1.1 beschrieben vom Kulturgefäß abgelöst, die Zellzahl

bestimmt und die Suspension für 5 min bei 900 rpm zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in so viel Volumen Kryomedium aufgenommen, dass eine Konzentration von 10^6 Zellen/mL entstand. Die Suspension wurde in Portionen von je 0,5-1 mL in Kryoröhrchen überführt und in einem speziellen Gefrierbehälter (CoolCell®, BioCision, San Rafael, USA) bei -80°C langsam eingefroren. Die Zellen wurden bei -80°C bzw. für längerfristige Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert.

8.1.4 Behandlung von HDFneo mit Transportinhibitoren

HDFneo wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in LabTek Chambered Coverglasses ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Die Behandlung mit den in Zellkulturmedium verdünnten Inhibitoren erfolgte wie im Ergebnisteil angegeben (eingesetzte Endkonzentrationen, siehe Tabelle 1). Da die Behandlung mit Brefeldin A einen proteolytischen Abbau akkumulierter Proteine erwarten lässt [88], wurde in das Medium zusätzlich der Proteaseinhibitor ALLN gegeben. Nach der gewünschten Behandlungszeit wurden die Fibroblasten fixiert und mit Antikörpern gegen Tropoelastin/Elastin und ausgewählte Zellorganellen für Fluoreszenzaufnahmen markiert.

Tabelle 1 - Verwendete Transportinhibitoren / Zusätze

Inhibitor / Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Brefeldin A	10 mg/mL in DMSO	10 µg/mL
Bafilomycin A1	100 µM in DMSO	200 nM
Monensin	10 mM frisch in Ethanol	10 µM
Chloroquin	10 mM frisch in H ₂ O	200 µM
ALLN	10 mg/mL in Ethanol	10 µg/mL

8.1.5 In vitro Differenzierung von Keratinozyten

Aus der Literatur ist bekannt, dass Keratinozyten nach Erreichen der Konfluenz und unter dem Entzug von Wachstumsfaktoren von einem proliferativen Status in die terminale Differenzierung übergehen [89]. Um Keratinozyten in die Differenzierung zu bringen, wurden neonatale Keratinozyten in einer Dichte von 150.000 Zellen/well in einer 6-well-Zellkulturschale ausgesät und mehrere Tage bis zum Erreichen der Konfluenz (mikroskopische Überprüfung) unter Standardbedingungen mit

Standardmedium kultiviert. Ab dem Zeitpunkt der Konfluenz wurden die Zellen mit basalem Medium (d.h. ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren) weiter kultiviert, täglich eine Probe entnommen und zur Bestimmung der relativen Genexpression ausgewählter Gene verwendet.

8.1.6 Transfektion von Zellen mit dem Neon™-System

Bei einer Transfektion wird Fremd-DNA oder-RNA in eine Zelle eingebracht. Das Neon™-System von Life Technologies basiert auf der Methode der Elektroporation, d.h. durch Anlegen eines kurzen starken Spannungspulses entstehen wahrscheinlich Poren innerhalb der Plasmamembran [90], durch die die Nukleinsäure-Moleküle in die Zelle eindringen können.

Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers [91]. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Standardmedium resuspendiert und die gewünschte Anzahl Zellen einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugationsschritte erfolgten für 5 min bei 1000 rpm und RT). Das Zellpellet wurde anschließend im Puffer R des Kits aufgenommen und mit der entsprechenden Menge Plasmid-DNA gemischt. Die Transfektion durch Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines einzelnen Pulses von 1700 V und 20 ms Dauer. Die Zellen wurden schließlich direkt in Antibiotika-freiem Standardmedium ausgesät und für mindestens 24 h im Brutschrank (37°C, 5%-ige CO₂-Atmosphäre) inkubiert, bevor ggf. weitere Behandlungen oder der Wechsel auf Antibiotika-haltiges Medium erfolgte.

8.1.7 Transfektion von Zellen mittels Lipofektion

Lipofektion ist eine weitere Möglichkeit, fremde Nukleinsäure in Zellen einzubringen. Bei der Lipofektion wird DNA oder RNA durch Zugabe eines entsprechenden Transfektionsreagenzes in Lipidkomplexen eingeschlossen. Diese lipophilen Partikel sind in der Lage die Plasmamembran zu überwinden und so die DNA oder RNA in das Zellinnere zu transportieren.

Hier wurde das Reagenz Lipofectamine® 2000 nach Angaben des Herstellers [92] in verschiedenen Verhältnissen von Volumen des Reagenzes zu DNA-Menge eingesetzt. Das jeweilige Verhältnis ist im Ergebnisteil angegeben.

8.1.8 siRNA-vermittelter Knockdown in Keratinozyten

Mit Hilfe von siRNA (small interfering RNA) ist es möglich, die Aktivität eines spezifischen Gens auf Ebene der mRNA über RNA-Interferenz transient herunter zu regulieren. Eine Möglichkeit, die spezifische siRNA in eine Zelle einzubringen, ist die Lipofektion. Dabei wird die RNA zunächst mit einem kationischen Lipid zur Bildung von siRNA-Lipid-Komplexen inkubiert. Diese Komplexe werden von der Zelle aufgenommen, so dass die siRNA freigesetzt wird und transient ein Knockdown des entsprechend Gens erfolgt.

Um einen siRNA vermittelten Knockdown in Keratinozyten zu erzeugen, wurden an Tag 1 des Experiments in einer 6-*well*-Platte 150.000 Keratinozyten/*well* (sofern nicht anders angegeben) in 2 mL KGM-Gold Medium ausgesät und bei 37°C unter einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank über Nacht inkubiert. An Tag 2 erfolgte ein Mediumwechsel auf 1,192 mL Antibiotika-freies KGM-Gold pro *well* und die Zugabe von 308,25 µL Transfektionsansatz pro *well* (siehe Tabelle 2, siRNA-Endkonzentration 50 nM, wobei die Volumina für andere Kulturoberflächen entsprechend angepasst wurden). Nach Inkubation für sechs Stunden im Brutschrank wurde das Medium wieder abgenommen und durch Standardmedium ersetzt. Der erfolgreiche Knockdown wurde über RNA-Isolation, cDNA-Synthese und relative Quantifizierung der Genexpression mittels TaqMan® Assay überprüft (siehe 8.3.1, 8.3.2, 8.3.3).

Tabelle 2 - siRNA-Transfektionsansatz pro *well* in einer 6-*well*-Platte

	Lösung A	Lösung B
siRNA-Stock (20 µM, siehe 7.11)	3,75 µL	---
Lipofectamine® RNAiMAX	---	1,5 µL
OptiMEM	154 µL	149 µL
Gesamtvolumen	157,75 µL	150,5 µL
Lösung A mit B mischen und 20 min bei RT inkubieren	→ Transfektionsansatz	

8.1.9 Lentivirale Transduktion zur Überexpression von Elastin

Von Life Technologies (Carlsbad, USA) wurden lentivirale Viruspartikel erhalten, die das synthetische Gen Citrin-Elastin tragen (siehe 7.13)

Zur Transduktion der Fibroblasten wurden zwei verschiedene Protokolle angewendet. Entweder wurden die Zellen adhärent in einem Zellkulturgefäß transduziert („adhärente Transduktion“) oder während sie sich in Suspension befanden („Suspensions-Transduktion“).

Adhärente Transduktion

Zur Transduktion der Fibroblasten wurden diese in definierter Zellzahl in die gewünschten Zellkulturgefäße in Standardmedium ausgesät und über Nacht kultiviert. Am Folgetag wurde die entsprechende Menge Virus (je nach gewünschter MOI = *multiplicity of infection*) unter Zusatz von 5 µg/mL Polybrene® in Antibiotika-freiem Standardmedium verdünnt und auf die Zellen gegeben.

Suspensions-Transduktion

Die Fibroblasten wurden in Standardmedium kultiviert, trypsiniert, gezählt und nach Zentrifugation für 5 min bei RT mit 1000 rpm in Antibiotika-freiem Standardmedium unter Zusatz von 5 µg/mL Polybrene® in einer Konzentration von $5 \cdot 10^5$ Zellen pro mL resuspendiert. Nach Zugabe der Viruslösung entsprechend der gewünschten MOI wurde die Virus-Zell-Suspension für 5 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in 5 µg/mL Polybrene®-haltigem Standardmedium in Zellkulturflaschen ausgesät.

Jeweils 24 h nach der Transduktion wurde das Virus-haltige Medium abgenommen und durch frisches Standardmedium ersetzt. Die Selektion erfolgreich transduzierter Zellen erfolgte ab 48 h nach Transduktion mit 5 µg/mL Blasticidin S in Standardmedium. Fluoreszenzaufnahmen zur Kontrolle erfolgten am Fluoreszenzmikroskop (Olympus) oder am CLSM (Leica).

8.1.10 Messung der Zellproliferation mit dem xCelligence RTCA SP Instrument

Die xCelligence-Technik (ACEA) ermöglicht es, die Proliferation und Viabilität adhärenter Zellen in Echtzeit und dynamisch zu verfolgen. Dabei werden Zellen in 96-*well* Platten gesät, die mit entsprechenden Sensoren am Boden ausgestattet sind (*E-Plates*). Die Interaktion der Zellen mit den Sensoren erzeugt eine Zell-Elektroden-Impedanz-Antwort (d.h. einen elektrischen Widerstand), der mit der aktuellen Zellzahl im *well* korreliert. Diese Impedanz kann in definierten Intervallen gemessen und aufgezeichnet werden, wobei die dazugehörige Software aus der Zell-Sensor-

Impedanz den einheitenlosen sogenannten *Cell Index* als Maß für die Zelldichte ausgibt.

Es wurde das xCelligence RTCA SP Instrument verwendet. Dabei liegt die *E-Plate* auf einer Station im Inkubator, die über einen *Analyzer* gesteuert wird, der wiederum die gemessenen Daten an einen Computer mit der entsprechenden Software überträgt.

Für die Messung hier wurden neonatale Keratinozyten in verschiedenen Zelldichten (siehe Tabelle 3) in einer 96-well *E-Plate* mit verschiedenen Medien (Standardmedium: unverdünnt, 1:5 und 1:50 mit Basalmedium verdünnt) ausgesät und über einen Zeitraum von 96 h für 3 h alle 15 min und für die restliche Zeit alle 60 min die Impedanz aufgezeichnet.

Tabelle 3 – Zelldichten für xCelligence-Messung

Nr.	Zellzahl pro well in...		Zellen pro cm ²
	96-well Platte	6-well Platte	
1	5.000	150.000	15.630
2	7.500	225.000	23.440

8.1.11 BrdU Zell-Proliferations-Assay

Der verwendete Proliferationsassay der Firma Millipore beruht auf der Verwendung von Bromodeoxyuridin (BrdU). BrdU ist ein Thymidinanalogon, das in neu-synthetisierte DNA aktiv proliferierender Zellen eingebaut wird. Partielle Denaturierung von doppelsträngiger DNA macht das eingebaute BrdU zugänglich für die Detektion mit einem spezifischen Primärantikörper, der wiederum von einem spezifischen Sekundärantikörper gebunden werden kann. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*) ist dann in der Lage das zugegebene chromogene farblose Substrat TMB (Tetra-Methylbenzidin) in eine blaue bzw. gelbe (wenn eine entsprechende Stopp-Lösung zugegeben wird) Lösung umzuwandeln, dessen Intensität proportional zur Menge der in die Zellen eingebauten BrdU-Menge ist und damit ein Maß für die Proliferation der Zellen darstellt. Das farbige Reaktionsprodukt kann schließlich mit Hilfe des Nanodrop- Spektrophotometers quantifiziert werden.

Hier wurden neonatale Keratinozyten in einer 96-*well* Zellkulturplatte mit drei unterschiedlichen Zelldichten in Vollmedium ausgesät (siehe Tabelle 4). Am Folgetag (Tag 1) erfolgte der Mediumwechsel mit Standardmedium bzw. den entsprechenden Hungermedien, d.h. mit Basalmedium verdünntes Vollmedium (1:5 und 1:10 verdünnt). Die Durchführung des Assays erfolgte an Tag 4 in 8-facher Bestimmung nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der *Stop Solution*, wobei die BrdU-Label-Lösung 24 h vorher zugegeben wurde. Die Absorption wurde in einem Microplaterereader bei 450 nm (Referenz 595 nm) gemessen. Als Kontrollen dienten *wells* ohne Zellen mit Zugabe von BrdU und *wells* mit Zellen ohne Zugabe von BrdU.

Tabelle 4 – Zelldichten für BrdU-Assay

Nr.	Zellzahl pro <i>well</i> in...		Zellen pro cm ²
	96- <i>well</i> Platte	6- <i>well</i> Platte	
1	2.500	75.000	7.810
2	5.000	150.000	15.630
3	7.500	225.000	23.440

8.1.12 Zellzahlbestimmung mit Sapphire700™ und DRAQ5®

Nachfolgend an den BrdU-Assay, wie er in 8.1.11 beschrieben ist, kann mit der gleichen 96-*well* Platte auch eine Zellzahlbestimmung mit den Infrarot-Farbstoffen Sapphire700™ und DRAQ5® erfolgen. Sapphire700™ ist ein nicht-spezifischer Zellfarbstoff, der sowohl im Kern als auch im Zytoplasma toter oder fixierter Zellen akkumuliert. DRAQ5® ist ein zellpermeabler Farbstoff, der mit der DNA in lebenden oder fixierten Zellen interagiert und eine stöchiometrische Anfärbung von DNA erlaubt. Die simultane Verwendung beider Farbstoffe erlaubt eine akkuratere Messung über niedrige und hohe Zelldichten [5]. Die komplette 96-*well* Platte kann über das Odyssey Imaging System (LI-COR) eingelesen werden. Aus den aufgenommenen Intensitäten berechnet die zugehörige Software (LI-COR) schließlich für jedes *well* den sogenannten *Cell Count*, also ein Maß für die absolute Zellzahl.

Nach dem BrdU-Assay wurde die Platte zunächst drei Mal mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit den Farbstoffen als Verdünnung in Odyssey Blocking Buffer (LI-COR) erfolgte für 1 h im Dunkeln bei RT (Sapphire700™ 1:2000 und DRAQ5® 1:10.000 verdünnt). Anschließend wurde die Platte erneut drei Mal mit PBS gewaschen und

mit PBS auf der Platte mit dem Odyssey Imaging System eingelesen und über die Software ausgewertet. Pro Bedingung erfolgte eine 6-fach Bestimmung, wobei als Kontrollen *wells* ohne Zellen mit Zugabe der Farbstoffe (Background) sowie *wells* mit Zellen aber ohne Farbstoffe dienten.

8.2 Mikroskopische Methoden

8.2.1 Fixierung und Immunfluoreszenzmarkierung von Zellen

Kultivierte Zellen wurden entweder mit 4 % PFA in PBS oder einem 1:1 Gemisch aus Methanol und Aceton nach unten aufgeführtem Schema fixiert und ggf. permeabilisiert. Danach erfolgte zunächst eine Markierung der gewünschten Zielstruktur mittels eines Primärantikörpers. Anschließend wurden die Proben mit einem Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert und schließlich eine Kernfärbung mit DAPI durchgeführt (siehe unteres Schema). Zur mikroskopischen Betrachtung wurden die in LabTek™-Zellkulturgefäßen kultivierten und markierten Zellen mit PBS überschichtet.

	Schritt	Zeit	Temp.
oder	2x Spülen mit PBS	1 min	RT
	PFA 4 % in PBS	10 min	RT
	Methanol:Aceton (1:1)	10 min	-20°C
	2x Spülen mit PBS	1 min	RT
optional	Permeabilisieren mit 0,1 % Triton-X-100 in PBS	5 min	RT
	3x Spülen mit PBS	1 min	RT
	Blockieren mit IFA-Blockpuffer	1 h	RT
	Inkubation mit Primärantikörper in IFA-Blockpuffer	1 h	RT
	3x Spülen mit IFA-Blockpuffer	5 min	RT
	Inkubation mit Sekundärantikörper in IFA-Blockpuffer	1 h	RT
	2-3x Spülen mit PBS	5 min	RT
	Kernfärbung mit DAPI (1 µg/mL in PBS)	2-3 min	RT
	3x Spülen mit PBS	5 min	RT
	Mit PBS überschichtet bei 4°C lagern		

8.2.2 Immunmarkierung unfixierter Zellen

Die Immunmarkierung unfixierter Zellen erfolgte gekühlt bei 4°C und mit vorgekühlten Puffern und Lösungen nach folgendem Protokoll:

Schritt	Zeit	Temp.
3x Spülen mit PBS	1 min	4°C
Blockieren mit IFA-Blockpuffer	10 min	4°C
Inkubation mit Primärantikörper in IFA-Blockpuffer	30 min	4°C
3x Spülen mit IFA-Blockpuffer	5 min	4°C
Inkubation mit Sekundärantikörper in IFA-Blockpuffer	30 min	4°C
2-3x Spülen mit PBS	1 min	4°C
1x Spülen mit PBS	1 min	RT

Zur mikroskopischen Betrachtung wurden die in LabTek™-Zellkulturgefäßen kultivierten und markierten Zellen mit phenolrotfreiem Medium überschichtet und direkt die mikroskopischen Aufnahmen durchgeführt.

8.2.3 Zellpräparation für GSD-Mikroskopie

Bei der Präparation der Zellen für die GSD-Mikroskopie und bei den Bedingungen der anschließenden Aufnahme wurden im Verlauf der Arbeit verschiedene Parameter ausgetestet.

Grundsätzlich wurden die Zellen fixiert oder unfixiert einer Immunmarkierung nach den obigen Protokollen unterzogen. Dabei wurde allerdings nach Primär- und Sekundärantikörper fünf Mal statt drei Mal gespült und es erfolgte keine Kernmarkierung mit DAPI.

In ersten Versuchen wurden Zellen auf runden Deckgläsern kultiviert, fixiert und immunmarkiert. Spätere Experimente erfolgten in LabTek-Zellkulturgefäßen mit Deckglasboden.

Für die Aufnahme eines GSD-Bildes ist eine reduzierende bzw. möglichst sauerstoffarme Umgebung nötig, um die dunklen Zustände des Fluorophors zu stabilisieren und das Blinken zu ermöglichen.

Dafür wurden die Deckglas-Proben mit der Zellseite nach unten auf einen mit 50 mM β -Mercaptoethylamin (MEA) in PBS gefüllten Muldenobjektträger gelegt.

Überschüssige Flüssigkeit wurde vorsichtig entfernt und der Rand des Deckglases mit einem Zweikomponenten-Silikon (picodent twinsil®) versiegelt (siehe Abbildung 9). Die Bildaufnahme erfolgte möglichst innerhalb von 3 Stunden nach dem Eindeckeln der Probe.

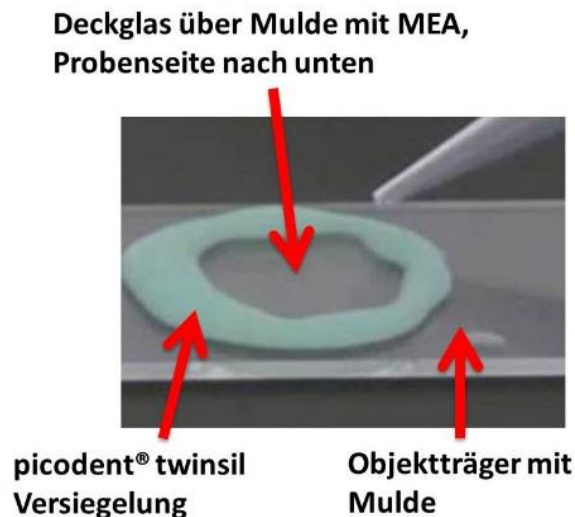


Abbildung 9 - Für GSD-Mikroskopie präparierte Probe von auf Deckgläsern gewachsenen Zellen. In die Mulde eines Muldenobjektträgers wird der gewünschte Puffer gegeben und das Deckglas mit der Zellseite nach unten blasenfrei aufgelegt. Überschüssige Flüssigkeit wird abgenommen und die Ränder mit picodent® twinsil versiegelt.

Bei in LabTeks™ kultivierten Proben wurde für die GSD-Aufnahme das PBS entfernt und durch einen optimierten GSD-Probenpuffer (siehe 7.9) ersetzt, der neben 10 mM MEA auch Glucose Oxidase enthält (GluOx-MEA-Puffer). Dieses Enzym oxidiert unter Verbrauch des im Puffer gelösten Sauerstoffs die anwesende Glucose, so dass der Probenpuffer nahezu Sauerstoff frei ist. Die Aufnahme unfixierter lebender Zellen erfolgte in dem Anti-Bleich-Medium DMEM^{gfp}-2.

8.2.4 Anfertigung von Kryohautschnitten

Zunächst wurden Stanzbiopsien aus humaner Haut von OP-Material gewonnen (siehe 7.6) und eingebettet in TissueTek® bei -80°C eingefroren. Mit Hilfe eines Kryostaten wurden aus diesen Biopsien Hautschnitte angefertigt und auf SuperFrost Plus® Objektträger aufgezogen. Nach Lufttrocknung für etwa ein bis zwei Stunden bei RT wurden die Kryoschnitte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

8.2.5 Fixierung und Immunfluoreszenzmarkierung von Kryohautschnitten

Die wie in 8.2.4 beschrieben hergestellten Kryohautschnitte wurden zunächst 10 min bei RT bis zur vollständigen Verdunstung von Kondenswasser luftgetrocknet und anschließend bei -20°C für 10 min mit Aceton fixiert. Nach einem Trocknungsschritt für 10 min bei RT wurden die Präparate mit einem Fettstift umrandet und die interessierende Zielstruktur nach folgendem Schema markiert.

Schritt	Zeit	Temp.
Blockieren mit IFA-Blockpuffer	1 h	RT
Inkubation mit Primärantikörper in IFA-Blockpuffer	1 h	RT
3x Spülen mit IFA-Blockpuffer	5 min	RT
Inkubation mit Sekundärantikörper in IFA-Blockpuffer	1 h	RT
2-3x Spülen mit PBS	5 min	RT
Kernfärbung mit DAPI (1µg/mL in PBS) oder Sytox Green	2-3 min	RT
3x Spülen mit PBS	1 min	RT

Anschließend wurden die Präparate gut mit destilliertem Wasser gespült und an der Luft getrocknet, bevor sie am Eindeckautomaten mit Deckgläschen versehen wurden. Die mindestens über Nacht ausgehärteten Proben wurden schließlich mikroskopisch analysiert.

8.2.6 AdipoRed™ Assay

AdipoRed™ ist ein Reagenz, das die Quantifizierung intrazellulärer Lipide erlaubt. AdipoRed™ ist eine Lösung des hydrophilen Farbstoffs Nilrot, dessen Fluoreszenzeigenschaften von dem ihn umgebenden Milieu abhängig sind. In einer hydrophoben Umgebung fluoresziert der Farbstoff, wobei das Maximum des Fluoreszenzsignals abhängig ist von der Art der hydrophoben Umgebung. Gebunden an Proteine oder Phospholipide zeigt sich eine rote Fluoreszenz, die sich Richtung gelb verschiebt, wenn der Farbstoff in weniger polare Fette (wie z.B. Triglyceride) eingelagert wird.

Hier wurde das AdipoRed™ Reagenz zur Detektion von in Keratinozyten akkumulierenden Lipiden nach Angaben des Herstellers in einem 12-well Format

verwendet. Zur Auswertung wurden am Fluoreszenzmikroskop (TCS SP5, Leica) Aufnahmen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm angefertigt.

8.2.7 Oil Red O Färbung

Eine weitere Möglichkeit zum Anfärben intrazellulärer Lipide ist die Färbung mit Oil Red O (ORO).

Zur Herstellung der ORO-Färbelösung wurden 3 Teile der kommerziell erhältlichen Stammlösung mit 2 Teilen destilliertem Wasser vermischt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,2 µm gefiltert.

Die zu untersuchenden Zellen (kultiviert in LabTek®-Gefäßen mit Deckglasboden) wurden mit PBS gewaschen und für mindestens 10 min bei RT mit 4 %-igem PFA in PBS fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit 60 %-igem Isopropanol wurden die Zellen mit der angesetzten ORO-Färbelösung für 15 min bei RT inkubiert und anschließend zwei Mal mit PBS gewaschen. Zur Anfärbung der Zellkerne wurden die Proben für 2-3 min bei RT mit DAPI-Lösung (1 µg/mL in PBS) inkubiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS schließlich für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop (TCS SP5, Leica) in den LabTek-Gefäßen mit PBS bedeckt. Die Fluoreszenz des Oil Red O wurde bei einer Anregungswellenlänge von 561 nm aufgenommen.

8.2.8 Konfokale Laserraster Mikroskopie (CLSM)

Für Fluoreszenzaufnahmen wurde das konfokale Laserrastermikroskop (CLSM) Leica TCS SP5 in Kombination mit der Mikroskop-Software LAS AF (Version 2.7.3.9723) verwendet. Zur Anregung der Fluorophore ist das System mit folgenden Lasern bzw. Laserdioden ausgestattet: UV-Diode (405 nm), Argon (458 nm, 476 nm, 488 nm, 496 nm, 514 nm), DPSS (561 nm), und Helium-Neon (594 nm, 633 nm). Wellenlängen für die Laseranregung und Wellenlängenbereiche für die Emission wurden für die spezifische Fluorophor-Kombination passend gewählt, wobei mittels sequentiellen Scan pro *line* oder *frame* ein *cross-talk* zwischen den Kanälen vermieden wurde. Die verwendeten Objektive waren ein 10x Objektiv (HC PL FLUOTAR 10,0x0,3 Trocken), ein 20x Objektiv (HCX PL APO CS 20.0x0.7 Trocken) und ein 63x Wasser-Immersionsobjektiv (HCX PL APO lambda blue 63,0x1,2

Wasser, alle Leica), wobei das jeweilige Objektiv ebenfalls passend zur untersuchten Probe gewählt wurde.

8.2.9 Bildauswertung: TLR 3-Level in Kryohautschnitten

Zur Bestimmung des TLR 3-Expressionsniveaus in immunmarkierten Kryohautschnitten wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen mit dem konfokalen Laserraster-Mikroskop (TCS SP5, Leica) unter gleich gehaltenen Einstellungen (bezüglich Laserintensität, Gain, Offset) angefertigt, wobei eine Schwankung der Laserleistung durch regelmäßiges Vermessen einer Referenzprobe („Chromaplatte“) ausgeschlossen werden konnte. Für den Vergleich des Fluoreszenzsignals wurden die Bilder mit Hilfe der Software ImageJ ausgewertet. Dazu wurde um den interessierenden Bildausschnitt der basalen Keratinozyten eine *region of interest* (ROI) gelegt und die darin enthaltenen Zellkerne gezählt. Aus dem Einzelkanal-Bild des Fluoreszenzsignals des Targetproteins wurde in der jeweiligen ROI die mittlere Intensität des Grauwertes (GVI, *grey value intensity*) bestimmt und auf 100 Zellkerne normiert, so dass als Maß für das TLR 3-Proteinlevel der Wert „GVI pro 100 Zellen“ erhalten wurde.

8.2.10 Bildauswertung: Proteinquantifizierung aus IFAs von Citrin-ELN-MEF-Modellen

Für die Quantifizierung von Tropoelastin/Elastin, Fibrillin-1 und Citrin aus immunmarkierten MEF-Modellen Citrin-Elastin transduzierter und untransduzierter neonataler Fibroblasten wurden Fluoreszenzaufnahmen als 2x3-Mosaik unter gleich gehaltenen Bedingungen am CLSM angefertigt. Aufgenommen wurden die Bilder mit einem 20x Objektiv, zwei Hybrid-Detektoren (HyD) und zwei *photomultiplier tubes* (PMT). Wellenlängen für die Laseranregung waren 488 nm (Citrin), 561 nm (Alexa 546) und 633 nm (Alexa 647). Wellenlängenbereiche für die Emission wurden eingestellt auf 499-571 nm (Citrin), 572-649 nm (Alexa 546) und 650-735 nm (Alexa 647). Einzelbilder von 1024*1024 Pixeln (775*775 μm) wurden generiert über eine bidirektionale Scanrate von 200 Hz als sequentieller Scan, um *cross-talk* zwischen den Kanälen zu vermeiden. Pro Bild wurde ein *frame average* von zwei Frames pro optischem Schnitt mit 10 Schnitten pro vertikalem Bildstapel aufgenommen, wobei die Schrittweite 0,67 μm betrug. Die Aufnahmeparameter wurden pro experimentellem Versuchsansatz optimiert auf die TGF- β 1 behandelte Probe der

transduzierten Zellen und für alle weiteren Aufnahmen innerhalb eines Sets konstant gehalten. Mit Hilfe der Software LAS AF wurden Maximalprojektionen der einzelnen Stacks generiert und als 2x3 Mosaik aneinander gefügt. Die Maximalprojektionen wurden mit modifizierten Algorithmen (Beiersdorf AG, Hamburg) der ImageJ Software ausgewertet. Aus dem Basisbild der Einzelkanäle für TE/Elastin, Fibrillin-1 und Citrin wurde die Helligkeit (Leuchtdichte) durch Transformation des Bildes in den Lab-Farbraum extrahiert. Intensitäten der Helligkeit wurden binarisiert in Hinter- und Vordergrund dargestellt, wobei der Hintergrund nur Pixel mit einer Intensität unter 10 umfasste. Mit Hilfe des *Particle Analyzers* von ImageJ wurde der Anteil des Bildes bestimmt, der der relativen Signal-Abdeckung entspricht. Der angepasste Algorithmus wurde auf die Maximalprojektionen der Einzelbilder des Mosaiks angewendet. Dabei wurden Bilder, deren z-Ebene deutlich verschoben war (z.B. wenn die Zellkerne nicht richtig dargestellt waren) nicht in die Analyse miteinbezogen. Pro Mosaik konnten mindestens drei der sechs Bilder verwendet werden, um einen Mittelwert für die Signalabdeckung zu bilden, der pro Kanal und Setup gegen den Referenz-Wert der TGF- β 1 - behandelten Probe in Bezug gesetzt wurde.

8.2.11 GSD Mikroskopie

Für hochauflösende Bildaufnahmen fixierter und unfixierter Proben wurde ein GSD-Mikroskop der Firma Leica verwendet (Leica SR GSD, Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland), zusammen mit der *Leica Application Suite Advanced Fluorescence* Software (Version 3.2.0.9652, Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland). Das Mikroskop ist ausgestattet mit einem 405 nm Laser (Teil des Leica SR GSD Systems) und zwei *continuous-wave* Lasern (MPB Communications, Montreal, Kanada) von 488 nm und 642 nm; mit einem 100x-Öl-Immersion Objektiv (HCX PL APO 100x/1.47 Öl, Leica) und einer zusätzlichen 1.6x Linse, so dass ein Anregungspunkt von $\sim 35 \mu\text{m}$ entsteht. Aufnahmen in Epi-Richtung wurden mit einer sCMOS PCO.edge Kamera (PCO AG, Kelheim, Germany) gemacht.

Die Aufnahme zweier Farben von immunmarkiertem Fibrillin-1 und Citrin wurden hinter einander in GluOx/MEA-Puffer angefertigt (siehe 7.9). Das Fluorophor KK943, das als Sekundäntikörper für Fibrillin-1 verwendet wurde, wurde als erstes aufgenommen, wobei für *depletion* und Aufnahme der 642 nm Laser eingesetzt wurde. Anschließend wurde der 488 nm Laser für *depletion* und Aufnahme von Citrin

genutzt. Weitere Details zur Bildaufnahme sind in den Bildunterschriften wiedergegeben. Die erhaltenen GSD-Bilder der Einzelkanäle wurden nach der Aufnahme mit Hilfe der Mikroskop-Software zu einem zweifarbigen Bild überlagert.

8.3 Biochemische Methoden

8.3.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen wurde das mirVana™ miRNA Isolations Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Lyse der Zellen wurde der Lyse-Puffers auf das Zellkulturgefäß gegeben, die Zellen mit einem Schaber gelöst und in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe des Homogenate Additives und 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Probe mit Phenol/Chloroform versetzt und anschließend 5 min bei 10.000 x g und RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein frisches Gefäß überführt, mit 100 %-igem Ethanol gemischt, auf die Säule pipettiert und 15 s bei 10.000 x g und RT zentrifugiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Säule trocken zentrifugiert und die RNA mit 50-100 µL Elutions Puffer oder RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte im NanoDrop.

8.3.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet. 1 µg der wie in 8.3.1 isolierten RNA wurden mit RNase freiem Wasser auf 50 µL aufgefüllt und mit je 50 µL des Mastermixes versetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermo Cycler nach folgendem Schema:

Schritt	Zeit	Temp.
Äquilibrierung	10 min	25°C
Transkription	120 min	37°C
Inaktivierung	5 min	85°C
	unendlich	4°C

8.3.3 qRT-PCR mittels TaqMan®-Assay und Ermittlung der relativen Genexpression

Die quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der konventionellen PCR, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit, die Menge der amplifizierten DNA am Ende jedes Amplifizierungszyklus (und damit in Echtzeit) über Fluoreszenzmessungen zu bestimmen.

Eine Möglichkeit, die Menge der PCR-Produkte zu quantifizieren, besteht in der Ausnutzung des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET). Dabei gibt ein Donor (Reporter) bei Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge die Energie an einen in räumlicher Nähe befindlichen nicht-fluoreszenten Akzeptor (Quencher) ab, so dass keine Fluoreszenz detektiert werden kann. Mit steigendem Abstand zwischen Reporter und Quencher nimmt die Fluoreszenz des Reporters zu.

TaqMan® Sonden tragen an ihrem 5'-Ende den Reporter-Farbstoff FAM™ und am 3'-Ende den nicht-fluoreszenten Quencher (NFQ). Während der PCR bindet die Sonde spezifisch an die komplementäre Sequenz zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer-Stellen. Solange die Sonde intakt ist, befinden sich der Reporter und der NFQ in räumlicher Nähe und es kann keine Fluoreszenz gemessen werden. Im Laufe des PCR-Zyklus vervollständigt die DNA-Polymerase den Strang und spaltet dabei den Reporter-Farbstoff ab, so dass kein FRET mehr stattfinden kann und der Reporter fluoresziert. Der Zyklus, ab dem die Fluoreszenz einen Schwellenwert erreicht und die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, wird dabei als *Threshold Cycle* (CT-Wert bezeichnet) und hängt von der Menge des eingesetzten Templates (in diesem Fall der cDNA und damit auch von der ursprünglichen mRNA-Menge) ab.

Mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode [93] lassen sich aus den über die Gerätesoftware ermittelten CT-Werten unter Normalisierung auf eine endogene unregulierte Kontrolle (hier 18S rRNA) Unterschiede zwischen Kontrolle und Probe (z.B. eine Behandlung) in der Expression des *Genes of Interest* (GOI) berechnen. Die entsprechenden Formeln sind in Abbildung 10 wiedergegeben. Innerhalb einer Probe wird zunächst die Differenz (ΔC_T) zwischen dem CT-Wert des GOI und des unregulierten Kontrollgens berechnet. Aus den ΔC_T -Werten einer behandelten Proben und einer nicht-behandelten Kontrollprobe wird wiederum die Differenz, der $\Delta\Delta C_T$ -Wert, bestimmt. Unter der Voraussetzung, dass sich während eines PCR-Zyklus die DNA-

Menge des GOI verdoppelt, ergibt sich der Wert für die relative Quantifizierung (RQ) des GOI im Vergleich einer behandelten mit einer nicht-behandelten Probe als $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Führt die Behandlung zu keiner Regulation des GOI, ergibt sich ein Wert von 1. Für eine Repression werden Werte <1 und für eine Induktion Werte >1 erhalten.

$$\Delta C_T = C_T(GOI) - C_T(r18S)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{Behandlung}) - \Delta C_T(\text{Kontrolle})$$

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Abbildung 10 - Formeln zur Berechnung der relativen Expression RQ eines Targetgens GOI. Innerhalb einer Probe wird zunächst die Differenz (ΔC_T) zwischen dem C_T -Wert des GOI und des unregulierten Kontrollgens (hier 18S rRNA) berechnet. Aus den ΔC_T -Werten einer behandelten Proben und einer nicht-behandelten Kontrolle wird wiederum die Differenz, der $\Delta\Delta C_T$ -Wert, bestimmt. Der Wert für die relative Quantifizierung (RQ) des GOI im Vergleich einer behandelten mit einer nicht-behandelten Probe ergibt sich dann als $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

8.3.4 Whole Human Genome Microarray

Für eine globale Expressionsanalyse wurden cDNA-Microarray-Analysen bei der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) durchgeführt. Dafür wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe 8.3.1) und bei Miltenyi Biotec mit Hilfe der Agilent 2100 Bioanalyzer Plattform (Agilent Technologies) die Probenqualität ermittelt. Dabei erfolgt eine visuelle Kontrolle aus entsprechenden Gel-Bildern als auch aus Elektropherogrammen. Zusätzlich generiert die Software einen RIN Wert (RNA Integrity Number), die die Integrität und Gesamtqualität der RNA widerspiegelt. Im Berechnungsalgorithmus werden verschiedene Parameter wie z.B. das Verhältnis von 28S zu 18S rRNA berücksichtigt. Ein RIN-Wert von 1 zeigt eine geringe, ein Wert von 10 eine sehr hohe Probenqualität an. Alle hier verwendeten Proben hatten einen RIN-Wert zwischen 9,7 und 10 und waren damit alle für die weitere Verarbeitung im Array geeignet [94]. Ausgehend von 100 ng Gesamt-RNA pro Probe, wurden die RNA Proben einer linearen T7-basierten RNA-Amplifikation unterzogen und parallel mit Hilfe des Agilent *Low Input Quick Amp Labeling Kits* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) mit Cy3 markiert. 600 ng der Cy3-markierten cRNA wurden 17 h bei 65°C mit *Agilent Whole Human Genome Oligo Microarrays 8x60k V2* unter Verwendung des *Agilent Gene Expression Hybridization Kits* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) hybridisiert. Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Microarrays

wurden mit dem Agilent Microarray Scanner System (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) detektiert. Die *Agilent Feature Extraction Software* (FES) wurde zum Auslesen und Prozessieren der Microarray-Bilder genutzt.

Die Microarray-Daten wurden intern von Boris Kristof (Beiersdorf AG, Hamburg) mit Hilfe der Statistik Software R analysiert. Differentiell regulierte Gene wurden mittels des *limma packages* [95] nach Hintergrundkorrektur, quantiler Normalisierung und Qualitätskontrolle identifiziert. Hierbei wurde ein t-Test durchgeführt und p-Werte mit der Benjamini-Hochberg-Korrektur [96] adjustiert. Als unterschiedlich exprimiert wurden nur Gene betrachtet, deren adjustierter p-Wert $< 0,01$ war.

Die Daten wurden schließlich mit Hilfe der Software *Ingenuity® Pathway Analysis* (IPA®, QIAGEN, Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) analysiert.

8.3.5 Herstellung von Zelllysaten

Fibroblasten oder Keratinozyten wurden in Zellkulturschalen in Standardmedium kultiviert und ggf. zu entsprechenden Zeitpunkten behandelt. Zur Ernte der Zellen wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in bis zu 1 mL PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale entfernt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet bis zur Proteinisolierung bei -20°C gelagert. Zur Lyse der Zellen wurde das Pellet (je nach Menge) in 100 bis 200 µL RIPA-Puffer (+ 1 mM PMSF) oder Urea-Puffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde zur Entfernung von Zellrückständen für 20 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand für die weiteren experimentellen Schritte verwendet.

8.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

BC-Assay Kit (Interchim Uptima)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe eines BC-Assay Kits, das auf der Reduktion von Kupfer(II) zu Kupfer(I) durch Peptidbindungen der Proteine beruht. Dafür wurden zunächst 5 µL der Probe mit 20 µL einer 2%-igen SDS-Lösung (in PBS) versetzt und zur Denaturierung der Proteine für 10 min bei 95°C inkubiert. Jeweils 10 µL der denaturierten Proteinlösung bzw. 10 µL einer Protein-Standardreihe wurden in einer Doppelbestimmung

eingesetzt. Nach Zugabe des Farbreagens und Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm an einem Tecan-Mikroplatten-Reader gemessen.

DC-Assay (BioRad)

In Urea lysierten Proben wurde die Proteinkonzentration mit dem DC-Assay Kit bestimmt. Dafür wurden 5 µL Probe mit 20 µL einer 2%-igen SDS-Lösung (in PBS) versetzt und die Proteine für 5 min bei 95°C denaturiert. In eine 96-well Platte wurden 5 µL Probe bzw. 5 µL einer Proteinstandardreihe in Doppelbestimmung vorgelegt und pro well 25 µL Reagenz A' und 200 µL Reagenz B hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde die Absorption bei 750 nm in einem Tecan-Mikroplatten-Reader gemessen.

Aus den jeweiligen Regressiongeraden der Standardreihe wurde schließlich die Proteinkonzentration in den Proben unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors berechnet.

8.3.7 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Zelllysaten wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließendem Westernblot und Immundetektion durchgeführt.

Für die Gelelektrophorese wurde das NuPAGE® Gel-System in der XCell SureLock™ Mini-Cell (Life Technologies, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die gewünschte Proteinmenge wurde mit dem entsprechenden Volumen 4x-Ladepuffer (inklusive *Reducing Agent*) versetzt, für 5 min bei 95°C aufgekocht und die Proben anschließend auf ein 4-12% BisTris-Gel aufgetragen. Ebenso wurde ein Proteinstandard auf das Gel geladen. Der Lauf erfolgte schließlich unter Verwendung des 1x-MOPS SDS Laufpuffers zunächst zur Passage des Sammelgels bei einer konstanten Spannung von 100 V, die zur Passage des Trenngels auf 120 V erhöht wurde.

8.3.8 Western-Blot und Immundetektion von Proteinen

Der Transfer der Proteine erfolgte im Tankblot-Verfahren mit dem XCell SureLock™ System (Life Technologies, Carlsbad, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 30 V für 60 min in der mit 1x

NuPAGE® Transferpuffer (supplementiert mit 10 % Methanol) gefüllten Apparatur aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF/Filter *Paper-Sandwiches*) transferiert. Um freie Bindungsstellen zu blockieren wurde die Membran nach dem Transfer mit 5 % BSA in TBS auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (in 5 % BSA in TBST) erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran drei Mal für jeweils 10 min bei RT in TBST gewaschen, dann mit dem Sekundärantikörper (in 5 % BSA in TBST) für eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert und schließlich erneut drei Mal für jeweils 10 min mit TBST gewaschen.

Der Nachweis bzw. die Detektion der Proteine erfolgte durch die Verwendung von IRDye®-Sekundärantikörpern und dem *Odyssey Imaging System* (beides LI-COR).

8.3.9 Bestimmung sezernierter Zytokine in Zellkulturüberständen

Zur Bestimmung der sezernierten Zytokine Interleukin-6 und TNF- α nach Behandlung mit Poly(I:C) wurde der *BioPlex Human Cytokine Group I Assay* nach Angaben des Herstellers verwendet.

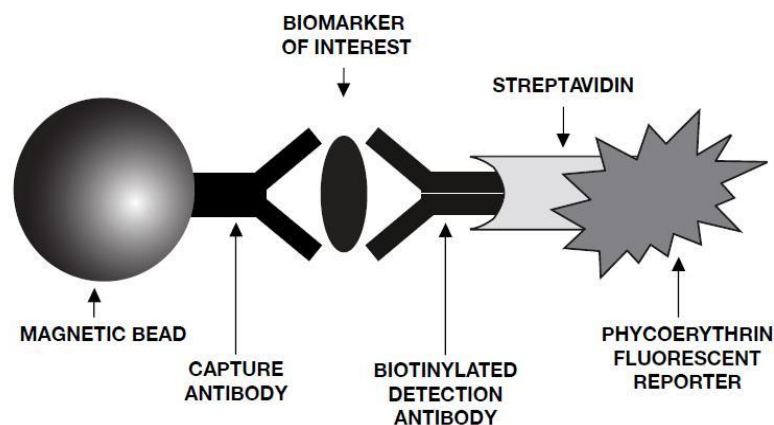


Abbildung 11 - Prinzip des BioPlex Assays. Magnetkugeln mit gekoppeltem spezifischem capture Antikörper binden den interessierenden Biomarker. Ein Magnet hält die Kügelchen mit dem gebundenen Protein in der Mikrotiterplatte, so dass schließlich über einen Detektionsantikörper, konjugiert mit dem fluoreszierenden Phycoerythrin, die Menge des Biomarkers bestimmt werden kann.

In diesem 96-well-formatigen Immunoassay wird das interessierende Targetprotein (*biomarker of interest*) über einen spezifischen Antikörper (*capture antibody*), der an magnetische Kügelchen (*beads*) gekoppelt ist, aus dem Zellkulturüberstand gebunden (Abbildung 11). In mehreren Waschschrinen wird ungebundenes Protein entfernt, wobei die Kügelchen (und damit auch das Targetprotein) durch einen Magneten in der Platte gehalten werden. Anschließend wird ein biotinylierter

Detektions-Antikörper (*detection antibody*) hinzugegeben, der ebenfalls an das Targetprotein bindet. Schließlich wird ein Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat an den Detektions-Antikörper gekoppelt, so dass Phycoerythrin final als fluoreszenter Reporter dient, über den die Menge von gebundenem Targetprotein bestimmt werden kann. Die magnetischen Kügelchen sind außerdem mit einem für das Targetprotein spezifischen Farbcode versehen, der (zusammen mit der Fluoreszenz des Phycoerythrins) in einem Durchflusszytometer erkannt wird, so dass die gleichzeitige Quantifizierung mehrerer Proteine möglich ist.

Für die Versuche wurden Keratinozyten (NHEKneo) verschiedener LOTs in einer Dichte von 6000 Zellen/*well* in einer 96-*well* Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Poly(I:C) aufsteigender Konzentration (0 µg/mL bis 50 µg/mL) in je 100 µL Standardmedium pro *well* stimuliert. Das Medium wurde nach 48 h abgenommen, für 5 min bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert und der so geklärte Überstand bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

9 Ergebnisse

9.1 Toll-like Rezeptor 3 in der Epidermis

9.1.1 Expressionsmuster von TLR 3 in Haut und im Modell

Zur Lokalisation von TLR 3 in der Haut wurden zunächst Antikörper verschiedener Anbieter an Kryohautschnitten untersucht. Beispiele daraus am konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM) erhaltener Fluoreszenzaufnahmen sind in Abbildung 12 dargestellt.

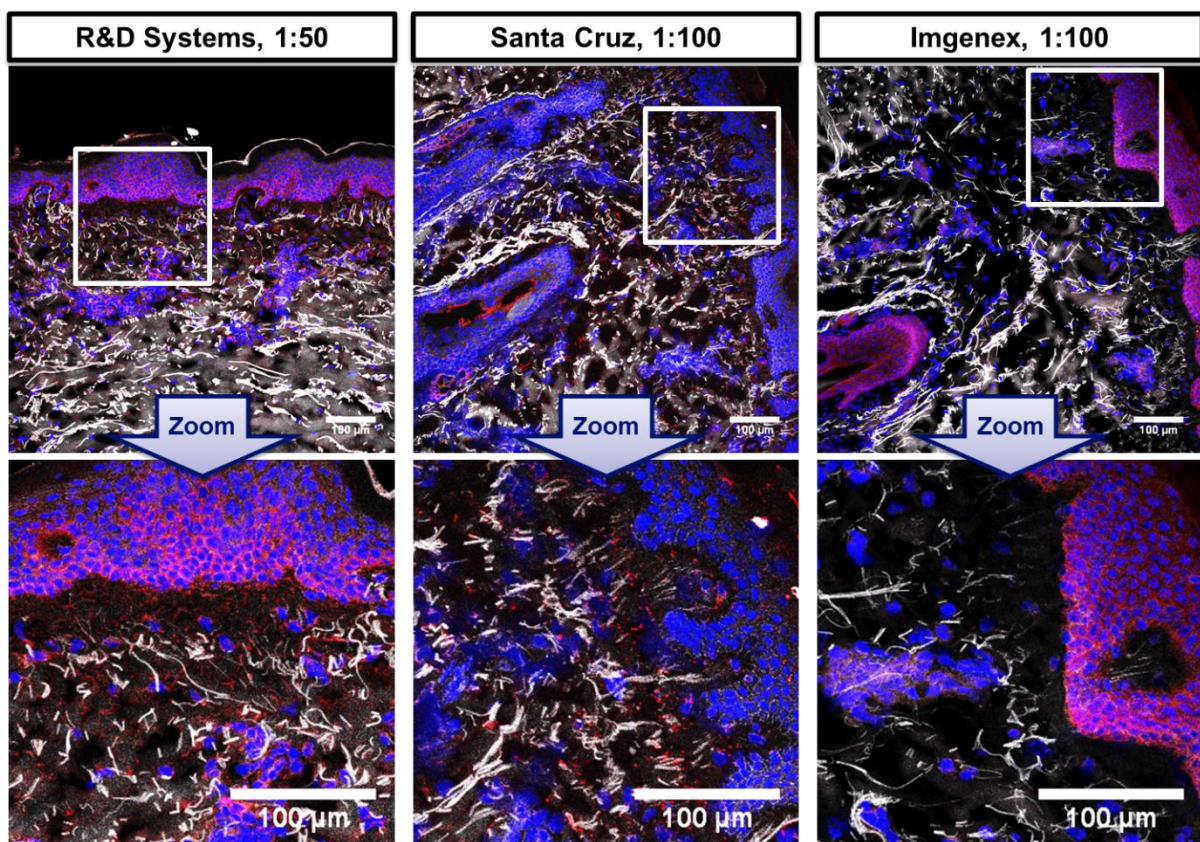


Abbildung 12 – CLSM-Aufnahmen der Immunmarkierung von TLR 3 an Kryohautschnitten mit Antikörpern verschiedener Anbieter. Angegeben ist die Verdünnung des Primärantikörpers. Dargestellt sind Zellkerne (blau), TLR 3 (rot) und die Autofluoreszenz (weiß). Maßbalken: 100 µm.

In den Aufnahmen ist zu erkennen, dass alle drei Antikörper der verschiedenen Anbieter an ein Target in der Haut gebunden haben. Da TLR 3 ein intrazellulärer Rezeptor ist, ist grundsätzlich ein zellassoziertes Signal zu erwarten. Dies war für die Antikörper von R&D Systems und Imgenex auch der Fall, bei denen das Signal für TLR 3 (rot) sich insbesondere in den Keratinozyten der Epidermis wiederfand. Der Antikörper der Firma Santa Cruz hingegen ergab nur ein sehr punktuell und eher

zufällig wirkendes Signal, das auch nicht zellassoziiert erschien, so dass dieser Antikörper als ungeeignet zur Markierung von TLR 3 in Kryohautschnitten angesehen wurde. Der Antikörper der Firma Imgenex zeigte eine sehr gleichmäßige Verteilung von TLR 3 in den verschiedenen Schichten der Epidermis, wohingegen der Antikörper der Firma R&D Systems ein verstärktes Signal in der basalen Zellschicht der Epidermis lieferte.

Zwar zeigte sich auch in der Dermis verstreut ein TLR 3-Signal, allerdings konnte dies aus den hier angefertigten Fluoreszenzaufnahmen nicht einem spezifischen Zelltyp zugeordnet werden.

Da sich aus den histologischen Arbeiten der Hinweis ergeben hatte, dass TLR 3 vorwiegend in der basalen Schicht der Epidermis exprimiert werden könnte, wurde im in vitro Modell (siehe 8.1.5) überprüft, ob undifferenzierte (basale) und differenzierte Keratinozyten unterschiedliche TLR 3-Expressionslevel zeigen. Die erhaltenen relativen Genexpressionswerte sind in Abbildung 13 dargestellt.

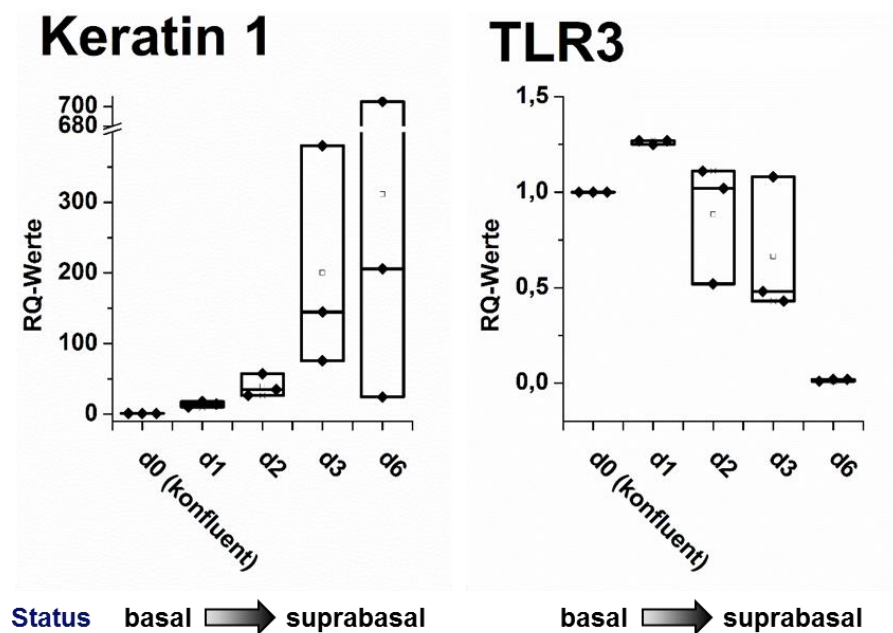


Abbildung 13 – Relative Genexpression von Keratin 1 und TLR 3 in Keratinozyten in der in vitro Differenzierung. Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die jeweilige Expression am Tag der Konfluenz (d0 = 1). n=3.

Die Expression von Keratin 1 nach Erreichen der Konfluenz (Tag 0) stieg sehr stark an. Dies war ein eindeutiger Hinweis darauf, dass der Prozess der Differenzierung eingesetzt hatte. Parallel dazu nahm die Expression von TLR 3 deutlich ab. An Tag 3 lag sie im Median bei etwa 50 % im Vergleich zu Tag 0 und fiel im weiteren Verlauf

der Kultivierung auf nahezu null. Dies unterstützte die Beobachtung aus der Immunmarkierung in Kryohautschnitten bezüglich einer erhöhten TLR 3-Expression in der basalen Epidermis und damit die Spezifität des Antikörpers von R&D Systems, der im Vergleich zu dem der Firma Imgenex nur in den basalen und damit undifferenzierten Keratinozyten ein Signal lieferte. Für weitere Experimente wurde daher der Antikörper von R&D Systems eingesetzt.

9.1.2 Proliferation vs. TLR 3-Expression

Die nahezu exklusive Expression von TLR 3 in den basalen Keratinozyten der Epidermis warf die Frage auf, ob TLR 3 selber auf den Prozess der Differenzierung Einfluss nehmen kann, oder ob die Zellen z.B. aufgrund der verlangsamten Proliferation im Laufe der Differenzierung lediglich die Fähigkeit verlieren, TLR 3 zu exprimieren.

Zunächst wurden Keratinozyten, wie in Abschnitt 8.1.10 beschrieben, in unterschiedlicher Zelldichte in eine *96-well E-Plate* gesät, mit Voll- oder Hungermedium kultiviert und mit dem xCelligence-System über 96 h die Proliferation mittels Impedanzmessungen verfolgt. Die daraus erhaltenen Wachstumskurven sind in Teil A von Abbildung 14 dargestellt.

Die Impedanz (dargestellt als *Cell Index*) stieg bei beiden Zelldichten bis zu einem Zeitpunkt von etwa 40 h deutlich an. Dabei stieg der *Cell Index* bei der Kultivierung der Keratinozyten mit Vollmedium jeweils am stärksten. Er lag für Zelldichte 1 nach 40 h bei 1,14 und für Zelldichte 2 nach 40 h bei 1,92. Die Kurve der Kultivierung mit 1:50 verdünntem Medium war am flachsten. Der *Cell Index* erreichte für Zelldichte 1 nach 42 h einen maximalen Wert von 0,27, für Zelldichte 2 lag dieser nach 46 h bei 0,59. Unabhängig von der ursprünglichen Zelldichte und dem Kulturmedium sank der *Cell Index* für alle Bedingungen wieder ab und fiel nach 96 h auf ein Minimum. Mit steigender Bewachung des Bodens ist grundsätzlich eine Sättigungskurve zu erwarten, die bei 100%-iger Konfluenz ihren Maximalwert erreichen müsste. Eine visuelle Überprüfung am Mikroskop nach 96 h (keine Daten verfügbar) zeigte, dass keine Zellen mehr am Boden der 96—well Platte hafteten, wodurch das Absinken des *Cell Index* auf Werte um null zu erklären ist. Da sämtliche Systeme (xCelligence-Gerät, Software, Inkubator, Kulturmedien) sorgfältig geprüft wurden und keine

erkennbaren Probleme aufwiesen, konnte ein Grund für das Ablösen der Zellen nicht ermittelt werden.

Parallel zur xCelligence-Messung wurden Keratinozyten in einer 6-well Zellkulturplatte mit gleicher Dichte ausgesät (angepasst an die größere Kulturfläche, siehe Tabelle 3) und analog kultiviert. Nach 96 h erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA, die nach cDNA-Synthese im TaqMan®-Assay zu Bestimmung der relativen Expression von TLR 3 eingesetzt wurde. Die daraus erhaltenen RQ-Werte sind in Teil B von Abbildung 14 aufgeführt. Demnach wurde die Expression von TLR 3 durch die Kultivierung mit Hungermedium im Vergleich zur Kultivierung mit Vollmedium tendenziell induziert, wobei die Induktion bei beiden Zelldichten durch Kultivierung mit 1:5-verdünntem Medium am stärksten war (RQ-Werte von 1,52 bzw. 1,87).

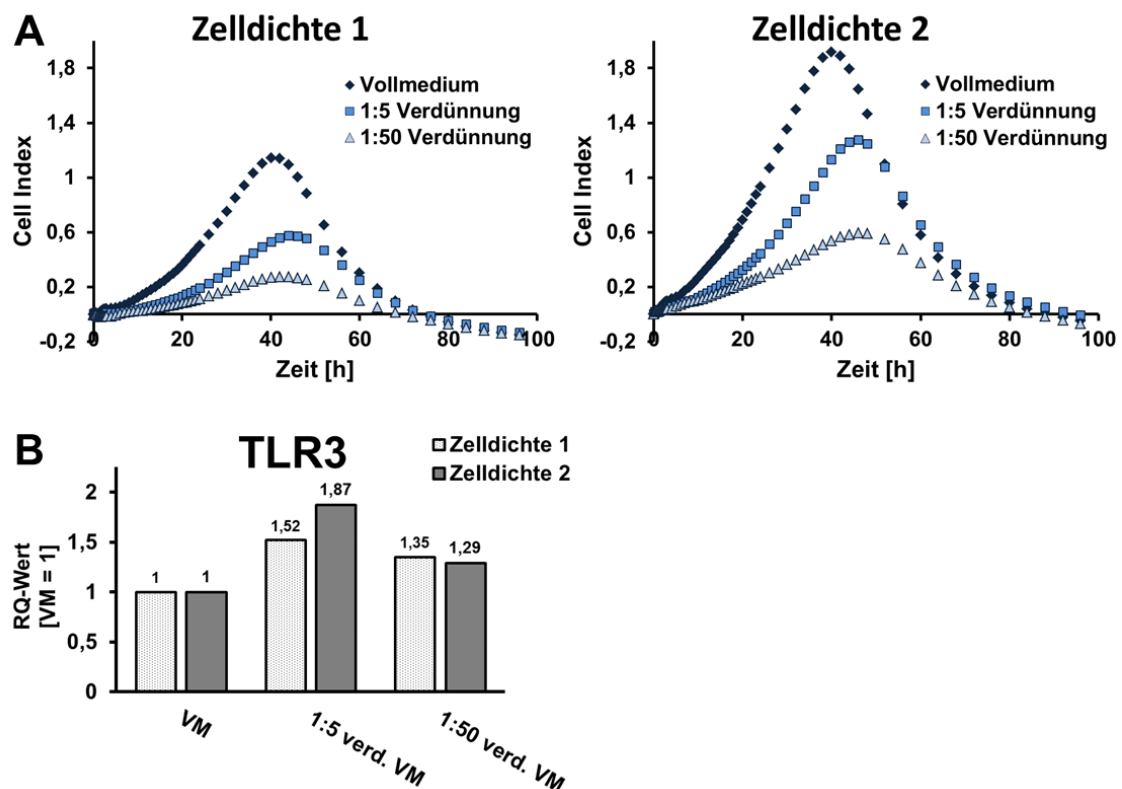


Abbildung 14 – Messung der Proliferation von Keratinozyten mit dem xCelligence-System und relative Expression von TLR 3 in einem parallelen Ansatz. (A) Neonatale Keratinozyten wurden in eine 96-well *E Plate* gesät, anschließend mit Vollmedium (VM) oder Hungermedium (1:5 und 1:50 verdünntes VM) kultiviert und die Impedanz mit dem xCelligence-System über 96 h gemessen. Aufgetragen ist der *Cell Index* gegen die Zeit. (B) Relative TLR 3-Expression in neonatalen Keratinozyten eines zu (A) parallelen Versuchsansatzes in einer 6-well Zellkulturplatte.

Da sämtliche Komponenten des xCelligence-Systems sorgfältig geprüft wurden und keine Probleme aufwiesen, mit denen das Ablösen der Zellen hätte begründet

werden können, wurde in einem analogen Experiment die Proliferation über zwei weitere Methoden untersucht. Hierzu wurden die neonatalen Keratinozyten wie in 8.1.11 beschrieben in einer 96-*well* Zellkulturplatte ausgesät und mit Voll- und Hungermedium kultiviert (hier: 1:5 und 1:10 verdünntes Vollmedium; bei 1:50 verdünntem Medium des vorherigen Ansatzes ergab eine mikroskopische Prüfung, dass die Zellen nur unzureichend versorgt sind). Zur Messung der Proliferation in der 96-*well* Platte wurde erst ein BrdU-Assay (siehe 8.1.11) und anschließend in der gleichen Platte eine Zellzahlbestimmung mittels Sapphire700™ und DRAQ5® (siehe 8.1.12) durchgeführt. Parallel erfolgte ebenso die Aussaat und Kultivierung der Zellen in einer 6-*well* Platte zur Isolation der Gesamt-RNA und Bestimmung der relativen Genexpression von TLR 3. Abbildung 15 zeigt in Teil A die Ergebnisse der Proliferationsbestimmung (normiert pro Zelldichte auf die Kultivierung mit Vollmedium) und in Teil B die relative Genexpression von TLR 3 aus dem parallelen Ansatz. Die Zellzahl (*Cell Count*, bestimmt mittels Sapphire700™/DRAQ5®) war unabhängig von der ursprünglichen Zelldichte nach drei Tagen Kultivierung mit Vollmedium (im Vergleich zur Kultivierung mit den Hungermedien) jeweils am größten und sank relativ dazu für alle drei Zelldichten im Mittel auf 0,88 für 1:5 verdünntes Vollmedium und auf 0,82 für 1:10 verdünntes Vollmedium. Das bedeutet, dass die Keratinozyten mit Vollmedium insgesamt stärker proliferiert waren. Analog dazu ergab der BrdU-Assay für die Ansätze mit Vollmedium ebenfalls die größten Werte im Vergleich zur Kultivierung mit Hungermedium. Mit der 1:5 Verdünnung lagen die Werte des BrdU-Assays für alle drei Zelldichten im Mittel bei 0,87 und mit der 1:10 Verdünnung im Mittel bei 0,81. Damit verdeutlichte auch diese Methode, dass die Keratinozyten abhängig von den Medienbedingungen unterschiedlich stark proliferiert waren, wobei die Proliferation mit Vollmedium am stärksten war. Die Bestimmung der relativen Genexpression von TLR 3 im parallelen Ansatz mit gleicher Zelldichte (unter Beachtung der größeren Kulturfläche in der 6-*well* Zellkulturplatte, siehe Tabelle 4) ergab, dass die Expression von TLR 3 in Keratinozyten tendenziell durch Kultivierung mit Hungermedien leicht induziert wurde (Teil B in Abbildung 15). Im Mittel lag der relative RQ-Wert für die Kultivierung mit 1:5 verdünntem Vollmedium bei 1,12 und für 1:10 verdünntes Medium bei 1,14, wobei die einzelnen RQ-Werte zwischen 1,34 (Zelldichte 2, 1:10 verdünntes Medium) und 0,83 (Zelldichte 3, 1:10 verdünntes Medium) schwankten.

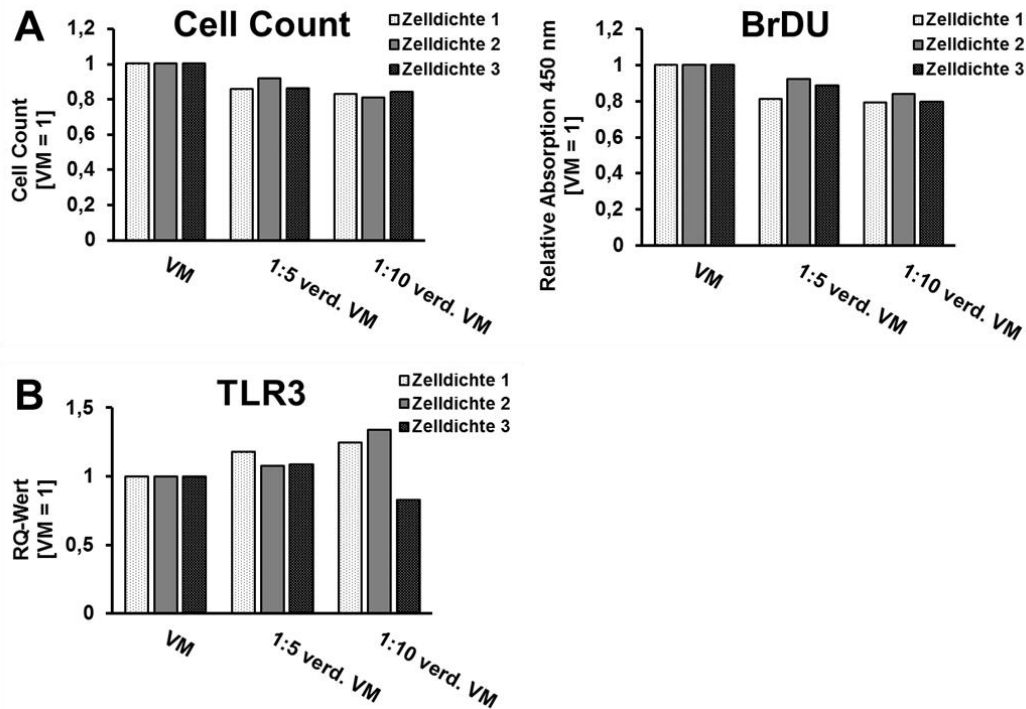


Abbildung 15 – Bestimmung der Proliferation von Keratinozyten mittels BrdU-Assay und Sapphire700™/DRAQ5® und relative Expression von TLR 3 in einem parallelen Ansatz. (A) Neonatale Keratinozyten wurden in eine 96-well Zellkulturplatte gesät, anschließend mit Vollmedium (VM) oder Hungermedium (1:5 und 1:10 verdünntes VM) kultiviert und nach 3 Tagen die Proliferation bestimmt. Die Werte der Zellzahl-Bestimmung mit Sapphire700™/DRAQ5® sind als *Cell Count* angegeben, die Werte des BrdU-Assays spiegeln die Absorption bei 450 nm (Referenz 595 nm) wieder. Beide Werte sind relativ zur Kultivierung mit VM angegeben. (B) Relative TLR 3-Expression in neonatalen Keratinozyten eines zu (A) parallelen Versuchsansatzes in einer 6-well Zellkulturplatte.

Die vorigen Daten haben gezeigt, dass eine unterschiedliche Proliferationsrate in neonatalen Keratinozyten keinen entscheidenden Einfluss auf das Expressionsniveau von TLR 3 hat. In einem weiteren Versuch wurde nun der umgekehrte Weg, d.h. der Effekt des Knockdowns von TLR 3 auf die Proliferation untersucht. Dafür wurden 61.000 Zellen/well in einer 12-well Zellkulturplatte ausgesät und am Folgetag ein siRNA-Knockdown von TLR 3 durchgeführt (siehe 8.1.8). Weitere 24 h später wurde die BrDU-Label-Lösung zugegeben und wiederum am Folgetag sowohl der BrdU-Assay, eine Bestimmung der Zellzahl mit Sapphire700™ und DRAQ5® durchgeführt und aus parallelen wells die Gesamt-RNA zur Überprüfung der Knockdown-Effizienz isoliert.

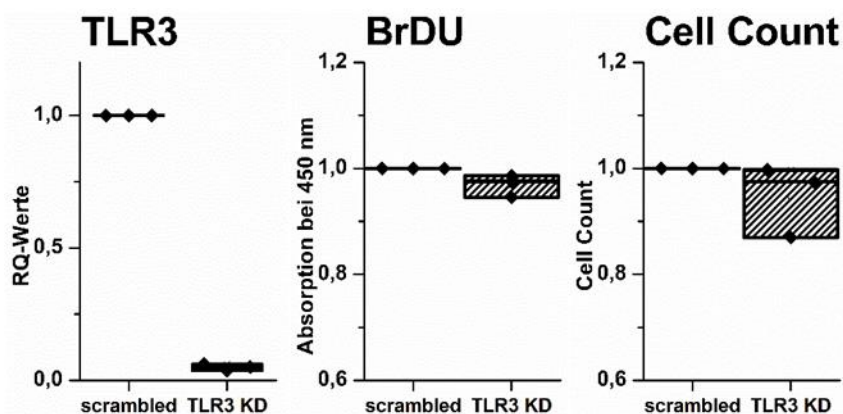


Abbildung 16 – Ergebnisse des TLR 3-Knockdowns (RQ-Werte) in Keratinozyten im 12-well-Format, parallel zu BrDU-Assay und Bestimmung der Zellzahl, normiert auf die *scrambled* Kontrolle. n=3.

Abbildung 16 zeigt, dass der siRNA-vermittelte Knockdown von TLR 3 im 12-well Format sehr effizient (im Median auf etwa 5%) realisierbar war. Im BrDU-Assay und in der Zellzahlbestimmung waren minimale Tendenzen hin zu einer verlangsamten Proliferation in den TLR 3-Knockdown-Zellen im Vergleich zu der *scrambled* Kontrolle zu erkennen. Allerdings war dieser Effekt bei einem sehr effizienten Knockdown von TLR 3 auf ein Niveau von etwa 5 % statistisch nicht signifikant (im Median um 2,5 % für den BrDU-Assay bzw. 2,6 % für den Cell Count).

9.1.3 Toll-like Rezeptor 3-Level in gealterter Haut

Aus den Immunmarkierungen zur Etablierung eines TLR 3-Antikörpers wurde die Hypothese gewonnen (Daten hier nicht darstellbar), dass TLR 3-Level sonnengeschützter Haut im Alter reduziert sind. Daher wurden Kryohautschnitte aus einem jungen und einem alten Kollektiv mit dem TLR 3-Antikörper der Firma R&D Systems parallel unter gleichen Bedingungen markiert, um diese Hypothese zu überprüfen. Anschließend erfolgten die Aufnahme am CLSM und die nachfolgende Auswertung für alle Bilder einheitlich (8.2.9).

Von den für die Auswertung herangezogenen Bildern sind exemplarische Fluoreszenzaufnahmen in Abbildung 17 dargestellt. Auch in diesen Proben war das fast exklusive Auftreten von TLR 3 in der basalen Schicht der Epidermis deutlich sichtbar. Die Immunmarkierung von TLR 3 in den Proben alter Haut lieferte ein erkennbar deutlich schwächeres Signal als in den Proben junger Haut.

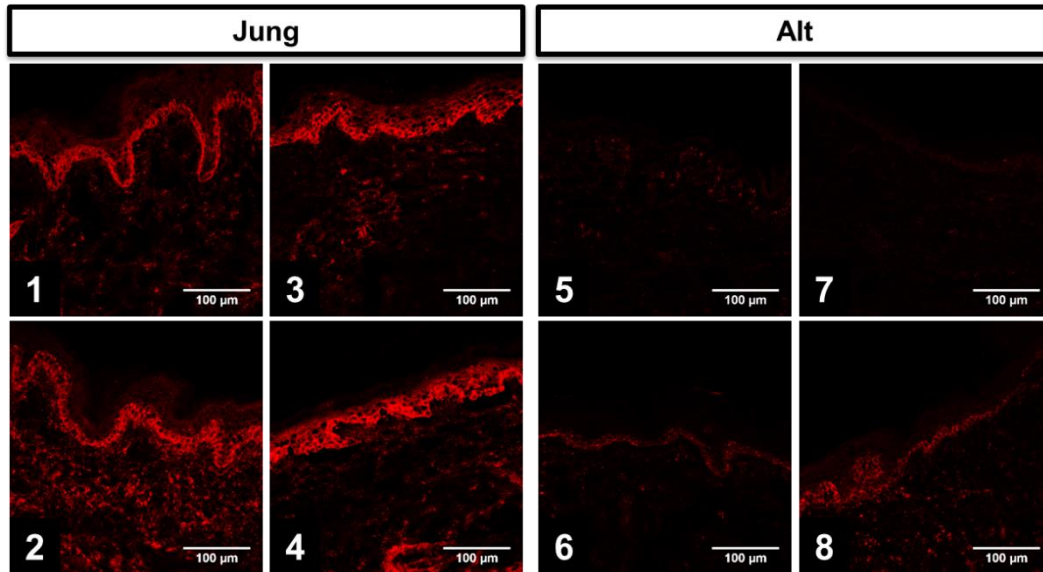


Abbildung 17 - Immunfluoreszenzaufnahmen zur Lokalisierung und Quantifizierung von TLR 3 in Kryohautschnitten junger und alter weiblicher Spender. Dargestellt sind exemplarische Aufnahmen einer TLR 3-Immunmarkierung (rot, R&D Systems, 1:50) auf Kryohautschnitten aus Kollektiven junger (1 bis 4) und alter (5 bis 8) Spender. Jung: 17-31 Jahre, n=7; Alt: 58-73 Jahre, n=5. Maßbalken = 100 µm.

Die in Abbildung 17 visuell erfassbaren Unterschiede wurden über die in Abschnitt 8.2.9 beschriebene Bildauswertung quantifiziert. Die Quantifizierung des TLR 3-Signals als GVI pro 100 Zellen aus Aufnahmen der Kryohautschnitte ist zusammenfassend über das jeweilige Kollektiv in Abbildung 18 dargestellt. Der Median für das junge Kollektiv lag bei 60,4 und im alten Kollektiv signifikant niedriger bei 37,6 (1,6-fach erniedrigt).

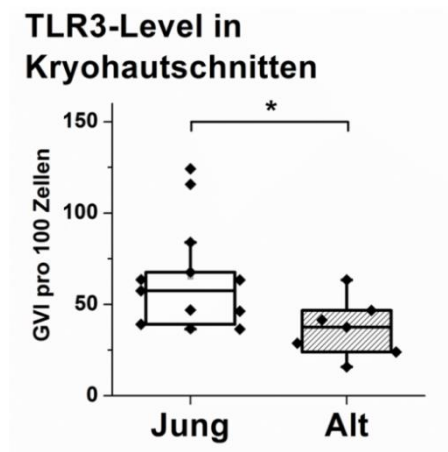


Abbildung 18 – Mittlere Grauwertintensität (GVI) des TLR 3-Signals in der basalen Schicht der Epidermis aus den Fluoreszenzaufnahmen der Kryohautschnitte (siehe Abbildung 17) normiert auf 100 Zellen. Dargestellt sind die TLR 3-Proteinlevel, wie sie über ImageJ aus den Fluoreszenzaufnahmen aus 1-2 Aufnahmen pro Probe bestimmt wurden. (Details siehe 8.2.9). Jung: 17-31 Jahre, n=7; Alt: 58-73 Jahre, n=5. *p<0,05, Mann-Whitney-Test.

9.1.4 UV-Sensibilität in Abhängigkeit des Alters

Davon ausgehend, dass TLR 3 der maßgebliche Sensor für UV-Schaden ist [23], wurde untersucht, inwiefern ein reduziertes Niveau von TLR 3 im Alter sich auch in einer geringeren Sensibilität für UV-Strahlung widerspiegelt. Ein Maß für die Sensibilität ist die Minimale Erythemdosis (MED). 1 MED entspricht der individuellen Dosis UV-Strahlung, die nach 24 Stunden eine klar abgegrenzte Rötung hervorruft. Eine Einteilung in Hauttypen anhand der Fitzpatrick Skala [97, 98] oder eine spektrometrische Bestimmung des Phototyps [99–101] erlauben Abschätzungen der MED eines Probanden, wobei kleine MED-Werte mit niedrigen Haut- und Phototypen korrelieren und einer starken Sensitivität gegenüber UV-Strahlung entsprechen. Darüber hinaus sind allerdings auch innerhalb eines Typs deutliche Variationen bezüglich der individuellen MED zu beobachten [102, 103]. Um die MED und das Alter zu korrelieren, wurden hier intern erhobene Daten [Probandenzentrum, Beiersdorf AG, Hamburg] genutzt, um, nach Phototyp sortiert, die für den einzelnen Probanden gemessene MED gegen das Alter aufzutragen. Um geschlechtsspezifische Unterschiede zu eliminieren, wurden nur die Daten weiblicher Probanden analysiert. Die Darstellung in Abbildung 19 zeigt, dass es sowohl in Phototyp 1 als auch in Phototyp 2 mit steigendem Alter der Probanden einen leichten Trend hin zu höheren MED-Werten gab. Dieser Trend war allerdings nur sehr vage und ließ keine eindeutige Aussage zu, inwieweit ein steigendes Alter mit einer erhöhten UV-Sensibilität einhergeht.

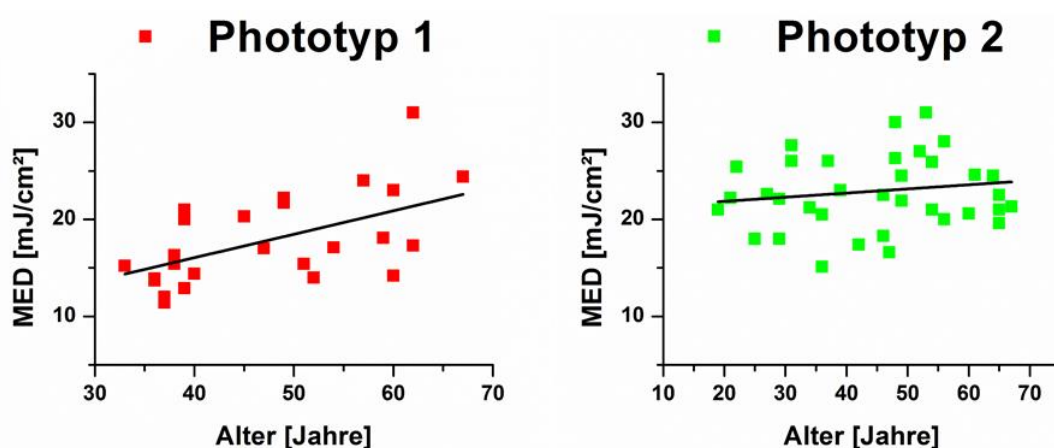


Abbildung 19 – Auftragung der individuell bestimmten MED gegen das Alter des Probanden, gemessen in internen Studien (Probandenzentrum, Beiersdorf AG, Hamburg). Analysiert wurden nur weibliche Probanden. Phototyp 1: n=27; Phototyp 2: n=41.

9.1.5 Korrelation von TLR 3-Level in der Epidermis und individuelle MED

Für die Korrelation des epidermalen Expressionsniveaus von TLR 3 mit der MED des gleichen Probanden standen aus einer internen Studie (Freiburger Ethik Kommission International, Votum Nr. 010/2183, [104]) Stanzbiopsien aus nicht-sonnenexponierten Hautarealen zur Verfügung. Im Rahmen der Studie wurde auch der MED-Wert der einzelnen Spender individuell bestimmt. Es wurden Immunmarkierungen von TLR 3 an Kryohautschnitten dieser Spender durchgeführt, CLSM-Aufnahmen angefertigt und die Bilder analog zu 8.2.9 ausgewertet. Pro Spender wurden Aufnahmen von drei Schnitten angefertigt und die Werte für GVI pro 100 Zellen als Mittelwert zusammengefasst. Die so ermittelten Werte wurden gegen die individuell gemessene MED des Probanden aufgetragen und sind in Abbildung 20 wiedergegeben.

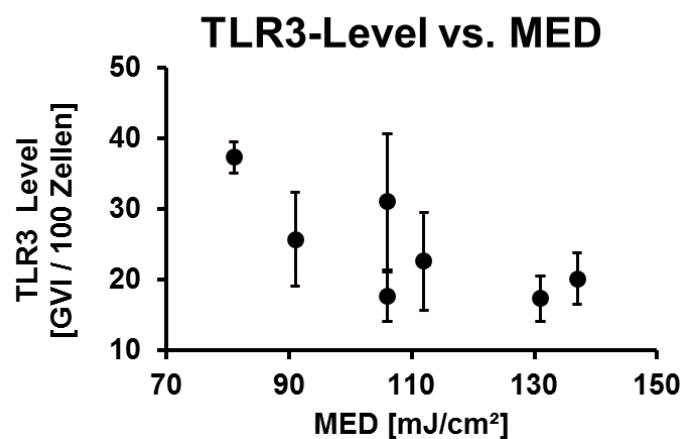


Abbildung 20 – Auftragung des aus der Immunmarkierung am Kryohautschnitt bestimmten jeweiligen TLR 3-Expressionsniveaus gegen die individuelle MED von sieben Probanden. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes des TLR 3-Levels, das aus 3 Messungen pro Proband bestimmt wurde.

Die Auftragung des TLR 3-Levels gegen die individuelle MED der Probanden zeigte trotz der geringen Stichprobengröße von sieben Probanden einen eindeutigen Trend. Ein hohes Level an TLR 3 korrelierte dabei mit einer geringen MED, wohingegen ein niedriges Level von TLR 3 mit einer hohen MED einherging.

In einem weiteren Schritt wurde auch das jeweilige Alter der Probanden (27-46 Jahre zum Zeitpunkt der Studie) miteinbezogen und gegen das individuelle TLR –Level und die MED aufgetragen und ist in Abbildung 21 dargestellt.

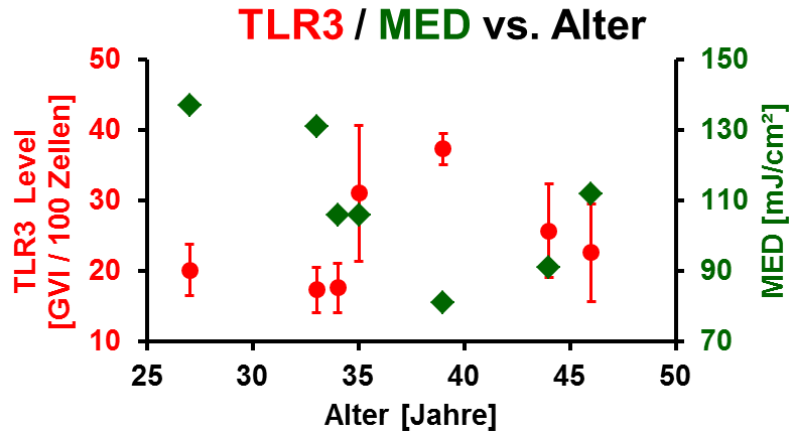


Abbildung 21 - Auftragung von individuellem TLR 3-Level (rote Datenpunkte, bestimmt über Immunmarkierung) und MED (grüne Datenpunkte) gegen das Alter der sieben Probanden. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung des Mittelwertes des TLR 3-Levels, das aus 3 Messungen pro Proband bestimmt wurde.

Auch in dieser Auftragung war die Tendenz zu erkennen, dass ein hoher MED-Wert (grüne Datenpunkte) mit einem niedrigen TLR 3-Level (rote Datenpunkte) einherging. Das Alter hingegen schien nicht im Zusammenhang mit TLR 3-Level und MED zu stehen. Die jeweiligen Werte schwankten über das hier untersuchte Altersspektrum stark hin und her. Ein höheres Alter bedingte nicht einen niedrigeren TLR 3-Level bzw. eine hohe MED oder umgekehrt. Ein reduziertes TLR 3-Level in gealterter Haut, wie es die Ergebnisse in 9.1.3 zeigten, konnte hier nicht bestätigt werden. Allerdings umfasste dort das Kollektiv alter Spender ein Spektrum von 58-73 Jahren und lag damit deutlich über dem hier maximalen Alter von 46 Jahren.

9.1.6 TLR 3 im in vitro Zellkulturmodell

Zur Untersuchung der Funktion von TLR 3 in der Epidermis wurde ein in vitro Modell kultivierter Keratinozyten herangezogen. Dafür wurde in Vorversuchen zunächst die Stimulierbarkeit von neonatalen Keratinozyten (NHEKneo) mit dem künstlichen TLR 3-Liganden Poly(I:C) sowie die Effizienz eines siRNA-vermittelten Knockdowns von TLR 3 im 6-well Format überprüft.

NHEKneo wurden in 6-well-Zellkulturschalen mit einer Dichte von etwa 110.000 Zellen/cm² ausgesät und drei Tage später für 24 h mit verschiedenen Poly(I:C)-Konzentrationen behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und daraus die relative Expression der Zytokine Interleukin-6 und TNF α sowie von TLR 3 bestimmt. Die daraus erhaltenen RQ-Werte (unbehandelte Kontrolle = 1) sind in Abbildung 22 grafisch dargestellt.

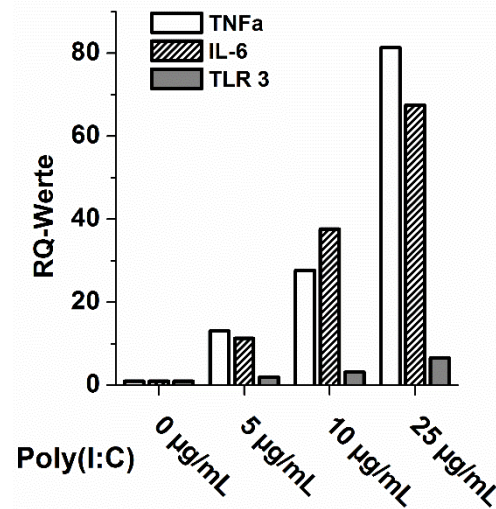


Abbildung 22 - Relative Genexpression von TNF α , IL-6 und TLR 3 in NHEKneo nach 24 h Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen von Poly(I:C). Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle.

In Keratinozyten war durch Zugabe von Poly(I:C) eine deutliche Steigerung der Genexpression von TNF α und Interleukin-6 auf maximal etwa 70- bzw. 80-fach im Vergleich zur parallel unbehandelten Kontrolle zu beobachten, die zudem abhängig von der Konzentration des künstlichen TLR 3-Liganden war. Außerdem war zu erkennen, dass durch Poly(I:C) auch die Expression von TLR 3 selbst induziert wurde. Jedoch lag der RQ-Wert hierfür nahezu unabhängig von der Konzentration niedrig, bei etwa 2 bis 6.

Ob sich eine Induktion der Zytokine durch Poly(I:C) auf mRNA-Ebene auch in einer vermehrten Sezernierung der entsprechenden Proteine in das Zellkulturmedium äußert, wurde mit einem BioPlex-Assay überprüft. Die Quantifizierung von TNF α ist dabei nicht geglückt (vermutlich durch Wechselwirkung mit Medienbestandteilen), jedoch konnte Interleukin-6 im Überstand der Keratinozyten vermessen werden (siehe Abbildung 23). Die Zugabe von Poly(I:C) führte konzentrationsabhängig in Keratinozyten zu einer deutlichen Zunahme der IL-6-Menge im Zellkulturüberstand. In der unbehandelten Kontrolle lag dieser Wert nach 48 h im Mittel bei 29 pg/mL, stieg aber deutlich bei Stimulation mit Poly(I:C) auf 136 pg/mL, 169 pg/mL bzw. 209 pg/mL nach der Zugabe von 1, 5 bzw. 10 μ g/mL Poly(I:C). Der künstliche TLR 3-Ligand stimuliert also in Keratinozyten nicht nur die Induktion proinflammatorischer Zytokine auf mRNA-Ebene, sondern auch deren Sekretion in das Medium.

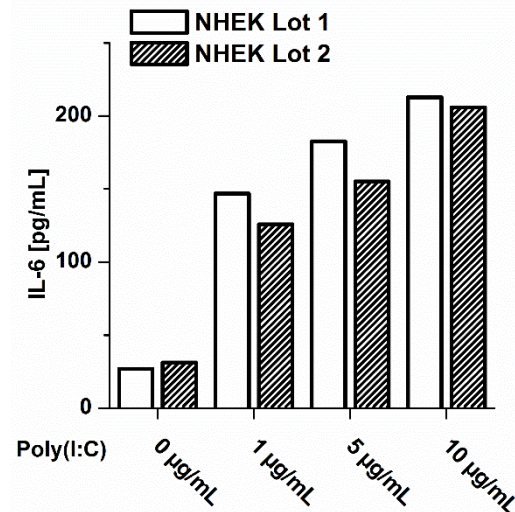


Abbildung 23 - Konzentration von Interleukin-6 im Medium von Keratinozyten nach 48 h Stimulation mit Poly(I:C). NHEKneo aus zwei verschiedenen LOTs wurden in einer Dichte von 6000 Zellen/well in einer 96-well Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit Poly(I:C) aufsteigender Konzentration (0 µg/mL bis 10 µg/mL) in je 100 µL Standardmedium pro well stimuliert. Das Medium wurde nach 48 h abgenommen und die Konzentration von IL-6 mittels BioPlex Assay (siehe 8.3.9) bestimmt.

Ob die beschriebene Induktion proinflammatorischer Zytokine durch Poly(I:C) auch TLR 3-abhängig verläuft, wurde mit Hilfe eines siRNA-vermittelten Knockdowns (siehe 8.1.8) von TLR 3 untersucht. Da ein siRNA-vermittelter Knockdown nur transient ist, wurde nicht nur die Effizienz, sondern in einer Zeitreihe auch die Stabilität dieses Knockdowns überprüft.

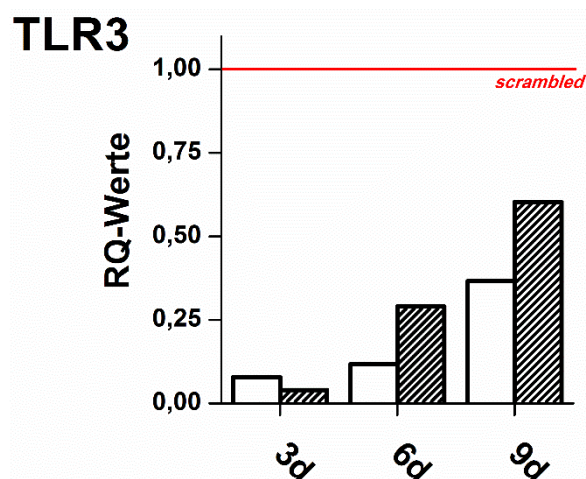


Abbildung 24 - Relative Expression von TLR 3 in Keratinozyten 3, 6 und 9 Tage nach siRNA-vermitteltem Knockdown aus zwei unabhängigen Versuchsansätzen. Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (*scrambled* = 1). n=2.

Drei Tage nach Induktion des Knockdowns in Keratinozyten mit Hilfe spezifischer siRNA war die Expression von TLR 3 im Vergleich zur Kontrolle (*scrambled*) im Mittel auf 6 % reprimiert, d.h. der Knockdown war sehr effizient. Im weiteren Verlauf der Kultivierung ging die Repression von TLR 3 wieder zurück, so dass die TLR 3-mRNA-Level nach 9 Tagen relativ zur Kontrolle im Mittel nur noch auf 48 % reduziert vorlagen. Daher wurden Experimente mit siRNA-vermitteltem TLR 3-Knockdown in Keratinozyten vornehmlich in dem Zeitraum um 3 Tage nach dessen Induktion durchgeführt.

Da die erfolgreiche Repression eines Gens alleine noch keine Aussage zulässt, inwiefern auch die Funktion des entsprechenden Proteins eingeschränkt ist, wurden Keratinozyten ab Tag 3 nach Induktion des TLR 3-Knockdowns für 24 h mit Poly(I:C) behandelt und anschließend die relative Expression von IL-6 bestimmt, als repräsentatives via TLR 3 induzierbares Gen (siehe Abbildung 25).

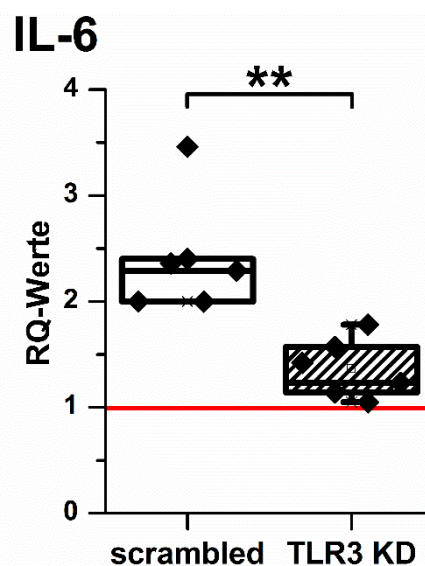


Abbildung 25 - Relative Expression von Interleukin-6 in Keratinozyten (TLR 3 siRNA Knockdown bzw. *scrambled* Kontrolle) nach 24 h Stimulation mit 1 µg/mL Poly(I:C). Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (rote Linie). n=6. **p<0,01, Mann-Whitney-Test.

Die Zugabe von Poly(I:C) führte in den Kontrollzellen (*scrambled*) im Median zu einer etwa 2,3-fachen Induktion von Interleukin-6. Dieser Effekt war durch TLR 3-Knockdown signifikant reduziert. Zwar kam es durch Poly(I:C) auch zu einer Induktion von IL-6, die allerdings nur bei etwa 1,3-fach lag. Das bedeutet, dass der siRNA-vermittelte Knockdown von TLR 3 in Keratinozyten auch zu einem deutlichen

Funktionsverlust des Rezeptors führte, woraus geschlussfolgert werden kann, dass der siRNA-vermittelte Knockdown funktional ist.

9.1.7 TLR 3 im Zusammenhang mit der Lipidbiosynthese

In der Literatur ist beschrieben, dass TLR 3 im Lipidstoffwechsel der Haut eine Funktion haben könnte, wobei die Aktivierung von TLR 3 nicht nur zur Induktion bestimmter Lipidstoffwechsel assoziierter Gene, sondern auch zur Akkumulation intrazellulärer Lipide führt [24]. Um diese Aussagen zu überprüfen, wurde in Keratinozyten ein TLR 3 Knockdown induziert, die Zellen anschließend mit Poly(I:C) behandelt und schließlich die Genexpression ausgewählter Lipidstoffwechsel- bzw. Hautbarriere-assoziiierter Gene gemessen (ABCA12, SMPD1, TGM1, siehe auch 5.3). Außerdem wurde mit zwei verschiedenen Nachweismethoden die Akkumulation intrazellulärer Lipide in Keratinozyten nach Poly(I:C)-Behandlung überprüft.

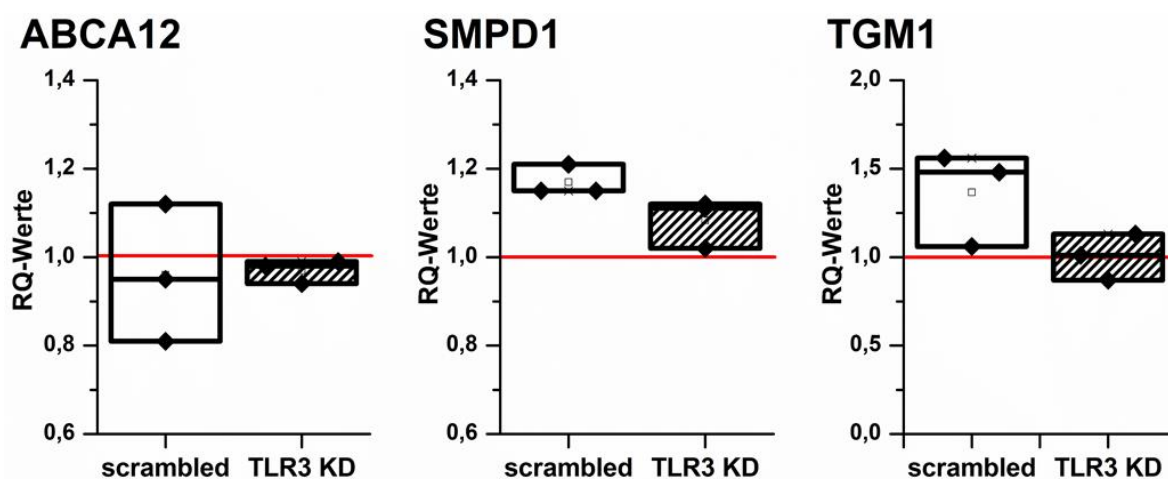


Abbildung 26 - Relative Expression von ABCA12, SMPD1 und TGM1 in Keratinozyten (TLR 3 siRNA Knockdown bzw. *scrambled* Kontrolle) nach 24 h Stimulation mit 1 µg/mL Poly(I:C). Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (rote Linie). n=3. Mann-Whitney-Test: Keine Signifikanzen.

Die Genexpressionsanalyse (Abbildung 26) zeigte, dass keines der hier untersuchten Gene, denen eine Bedeutung für Lipidstoffwechsel und Hautbarriere zugeschrieben wird, durch Poly(I:C) in der *scrambled* Kontrolle signifikant im Vergleich zum TLR 3-Knockdown induziert wurde. Zwar wiesen SMPD1 und TGM1 in der Tendenz eine leichte Induktion auf, die aber nicht signifikant von den Werten des TLR 3-Knockdowns abwich.

Für eine Analyse, ob nach Stimulation mit Poly(I:C) in Keratinozyten grundsätzlich intrazellulär mehr Lipide akkumulieren, wurde ein AdipoRed Assay durchgeführt

(siehe 8.2.6). Dafür wurden 40.000 Zellen/*well* in eine 12-*well* Zellkulturschale gesät und für 4 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. An Tag 4 erfolgte die Zugabe von Poly(I:C) in einer Konzentration von 0 bis 50 µg/mL. Die Durchführung des AdipoRed Assays erfolgte 96 Stunden nach Start der Stimulation. Die daraus am Fluoreszenzmikroskop (CLSM) erhaltenen Bilder sind in Abbildung 27 dargestellt.

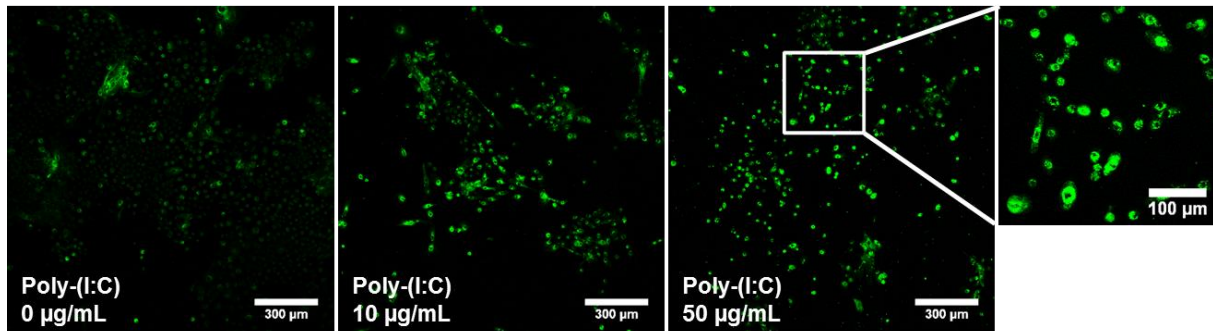


Abbildung 27 - Fluoreszenzaufnahmen von Keratinozyten nach 96 h Stimulation mit Poly(I:C) und Durchführung des AdipoRed Assays Die Fluoreszenz des AdipoRed-Farbstoffs ist in grün dargestellt. Maßbalken: große Bilder 300 µm, kleines Bild 100 µm.

In allen Proben war eine deutliche Hintergrund-Fluoreszenz zu erkennen. Nach Stimulation mit zunehmender Konzentration Poly(I:C) wurde zunehmend eine helle Fluoreszenz um die Zellkerne herum sichtbar, die bei einer Konzentration von 50 µg/mL Poly(I:C) am stärksten war. Die Fluoreszenzsignale sind einer Akkumulation intrazellulärer Lipide zuzuordnen. Eine quantitative Auswertung ist aber mit dem AdipoRed-Assay nicht gelungen, da dafür die Fluoreszenzintensität nicht ausreichte.

Daher wurde eine weitere Färbemethode, die Oil Red O-Färbung (ORO, siehe 8.2.7), zur Markierung der Lipide genutzt. Die Färbung wurde zunächst auf undifferenzierten und differenzierten Adipozyten (die Zellen wurden intern bei Beiersdorf bereitgestellt von Sandra Gehrke) getestet, da diese im Laufe ihrer Differenzierung große intrazelluläre Lipidtröpfchen akkumulieren, die auch im Fluoreszenzmikroskop gut sichtbar sind. Die Fluoreszenzaufnahmen (CLSM) der entsprechenden ORO-Färbung der Adipozyten ist in Abbildung 28 dargestellt.

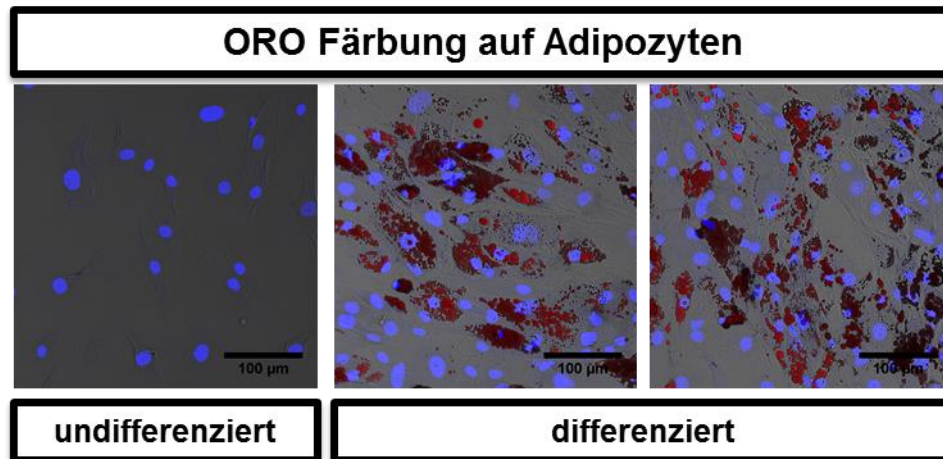


Abbildung 28 - Fluoreszenzaufnahmen von Adipozyten (differenziert und undifferenziert) nach Färbung mit ORO. Dargestellt sind Überlagerungsbilder aus der Durchlichtaufnahme, DAPI (violett, Zellkerne) und Oil Red O (rot, Lipidtröpfchen). Maßbalken: 100 µm.

In den differenzierten Adipozyten war eine starke rote Fluoreszenz innerhalb der Zellen zu erkennen, die sich eindeutig auf die intrazellulären, tröpfchenartigen Strukturen beschränkte. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass hier Lipidtröpfchen angefärbt wurden und die ORO-Färbung zur Markierung intrazellulär akkumulierter Lipide geeignet ist.

Es wurde dann überprüft, ob Keratinozyten durch Stimulation mit Poly(I:C) vermehrt Lipide akkumulieren, die dann mit ORO anfärbbar sind. Dazu wurden die Zellen in LabTek™-Gefäßen mit Deckglasboden kultiviert. Da möglicherweise nur unter differenzierenden Bedingungen Lipide in den Keratinozyten akkumulieren [24], wurden dem Zellkulturmedium verschiedene Konzentrationen Calcium zugesetzt bzw. rFAD-Medium (welches ebenfalls Calcium enthält) verwendet und die Zellen 72 h mit 10 µg/mL Poly(I:C) im jeweiligen Medium kultiviert. Die Färbung mit ORO erfolgte analog zu 8.2.7. Die erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 29 dargestellt. Zwar waren die Zellen durch die Zellkern-Fluoreszenz (DAPI) sehr eindeutig zu erkennen, aber unter allen hier getesteten Bedingungen (vgl. Abbildung 29) konnte kein rotes Fluoreszenzsignal in den Zellen detektiert werden, das dem ORO-Farbstoff zugeordnet werden könnte.

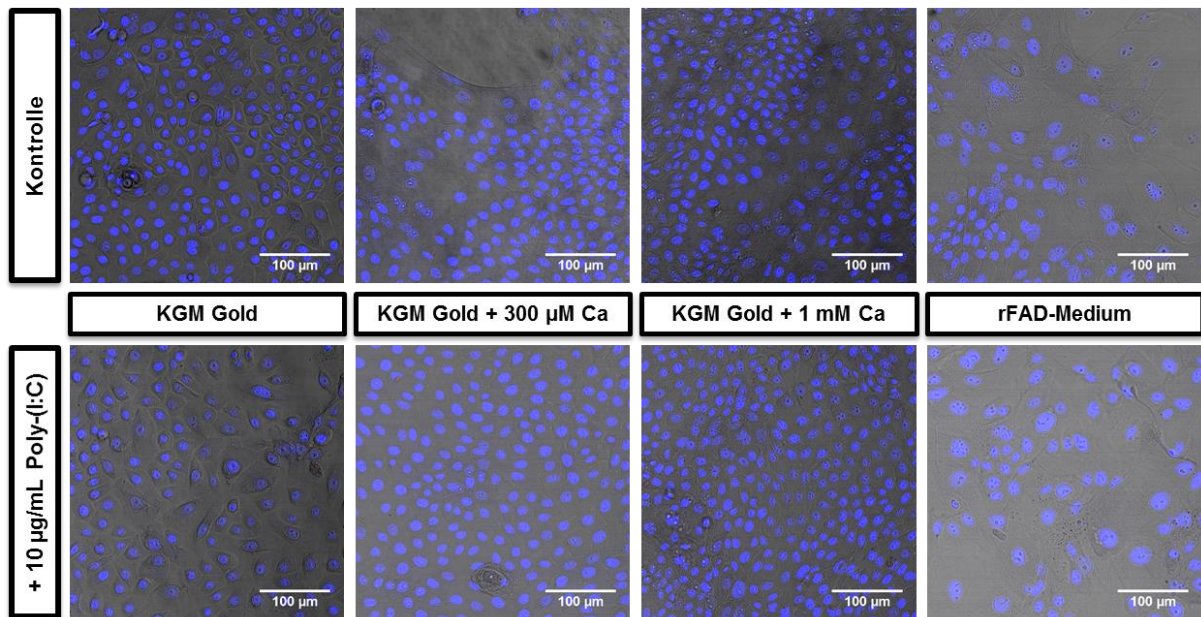


Abbildung 29 - Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Keratinozyten nach 72 h Stimulation mit Poly(I:C) unter verschiedenen Medienbedingungen und nach der Färbung mit Oil Red O (ORO). Dargestellt sind Überlagerungsbilder aus der Durchlichtaufnahme und Fluoreszenzaufnahmen von DAPI (blau) und Oil Red O (rot). Maßbalken: 100 µm.

9.1.8 TLR 3 und Differenzierung

In vorangegangenen Experimenten konnte mittels Immunmarkierung an Kryohautschnitten gezeigt werden, dass TLR 3 in der Haut insbesondere in der basalen Schicht der epidermalen Keratinozyten exprimiert wird. Zusätzlich konnte im in vitro Modell belegt werden, dass undifferenzierte Keratinozyten deutlich stärker TLR 3 exprimieren als differenzierte. Dies legt die Idee nahe, dass TLR 3 selbst auch an der Regulation der Differenzierung beteiligt sein könnte.

Es wurde in NHEKneo ein siRNA-vermittelter Knockdown von TLR 3 durchgeführt und die Keratinozyten 24 h mit 1 µg/mL Poly(I:C) behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für Real-Time PCR mit dem entsprechenden TaqMan®-Assay eingesetzt. Es wurden die Differenzierungsrelevanten Gene Keratin 1, Keratin 10, Notch und HES1 untersucht. Die Werte für die ermittelte relative Genexpression sind als RQ-Werte in Abbildung 30 dargestellt.

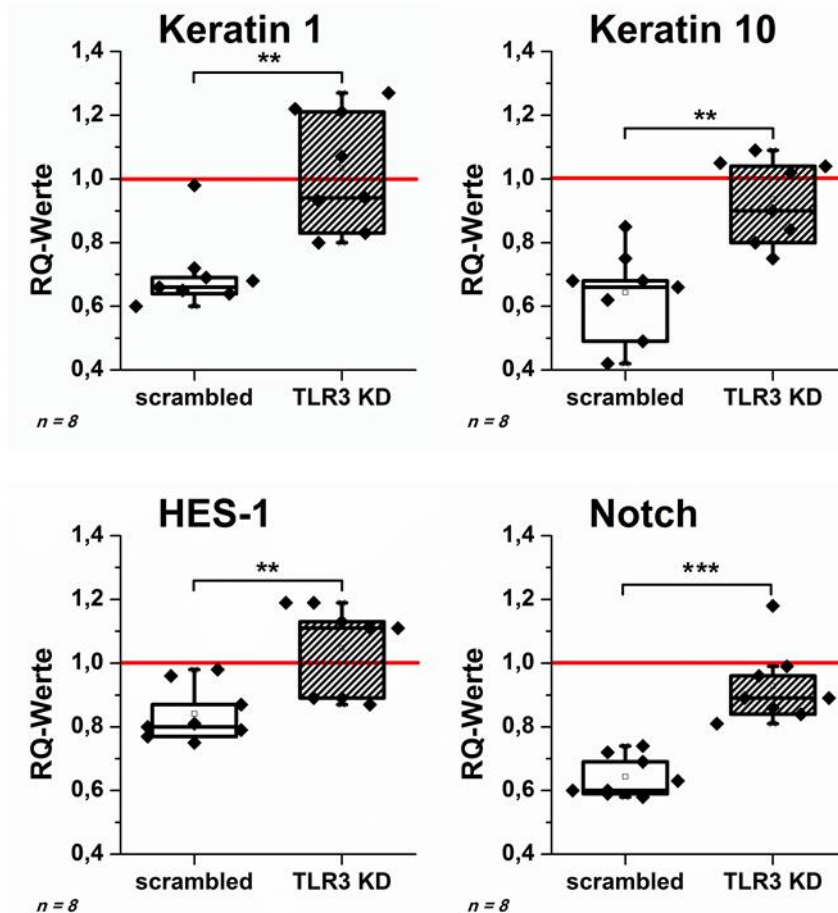


Abbildung 30 - Relative Expression von Keratin 1, Keratin 10, Notch und HES1 in Keratinozyten (TLR 3 siRNA Knockdown bzw. *scrambled* Kontrolle) nach 24 h Stimulation mit 1 µg/mL Poly(I:C). Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (rote Linie). n=8. **p<0,01, ***p<0,005, Mann-Whitney-Test.

In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass die Behandlung mit Poly(I:C) die Expression der untersuchten Gene in den Kontrollansätzen (*scrambled*) deutlich reprimierte (im Median für Keratin 1 auf 0,67; Keratin 10 auf 0,67; Hes 1 auf 0,80; Notch auf 0,62). Dieser reprimierende Effekt von Poly(I:C) blieb im TLR 3 Knockdown aus bzw. war signifikant gemindert. Hier lag die Expression der untersuchten Gene in Relation zur unbehandelten Kontrolle im Median bei 1,00 (Keratin 1), 0,96 (Keratin 10), 1,11 (HES1) bzw. 0,89 (Notch).

9.1.9 TLR 3 in der Calcium-induzierten Differenzierung

Es ist bekannt, dass durch Zugabe einer erhöhten Konzentration von Calcium in das Zellkulturmedium, die Differenzierung in Keratinozyten induziert werden kann [105]. Daher wurde nun geprüft, inwiefern die bereits untersuchten Differenzierungsmarker Keratin 1, 10, HES1 und Notch durch Calcium induziert werden können und ob die Aktivierung von TLR 3 durch Poly(I:C) diesem Effekt möglicherweise entgegenwirken

kann. Dazu wurde in NHEKneo ein siRNA-vermittelter Knockdown von TLR 3 durchgeführt und die Keratinozyten ab Tag 2 nach Knockdown für 24 h mit 1 µg/mL Poly(I:C) und/oder 0,5 mM Calcium behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und die relative Genexpression ermittelt. Die erhaltenen Werte sind als RQ-Werte bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle in Abbildung 31 dargestellt.

Die Genexpressionsanalysen zeigten hier in der Tendenz den gleichen Effekt von Poly(I:C) auf die Expressionslevel von Keratin 1, 10, HES1 und Notch, wie sie auch schon in den vorangegangenen Versuche beobachtet wurde: Eine Repression in der *scrambled* Kontrolle, die bei Knockdown von TLR 3 ausbleibt bzw. nur abgeschwächt auftritt. Die Behandlung der Zellen mit Calcium führte für die *scrambled* Kontrolle und den TLR 3 Knockdown zu einer Induktion der Gene Keratin 1, 10 und HES1. Die gleichzeitige Behandlung mit Poly(I:C) führte sowohl in den *scrambled* Kontrollen, als auch im TLR 3 Knockdown zu einer Minderung des induktiven Effektes von Calcium für Keratin 1 und Keratin 10. Die Expressionslevel von HES1 blieben hingegen bei zusätzlicher Behandlung mit Poly(I:C) auf ähnlichem Niveau. Eine Induktion von Notch durch Calcium konnte unter keiner der Bedingungen beobachtet werden. Allerdings wurde in der *scrambled* Kontrolle Notch auch bei gleichzeitiger Stimulation mit Poly(I:C) reprimiert, wohingegen dieser Effekt bei TLR 3 Knockdown in den Keratinozyten ausblieb.

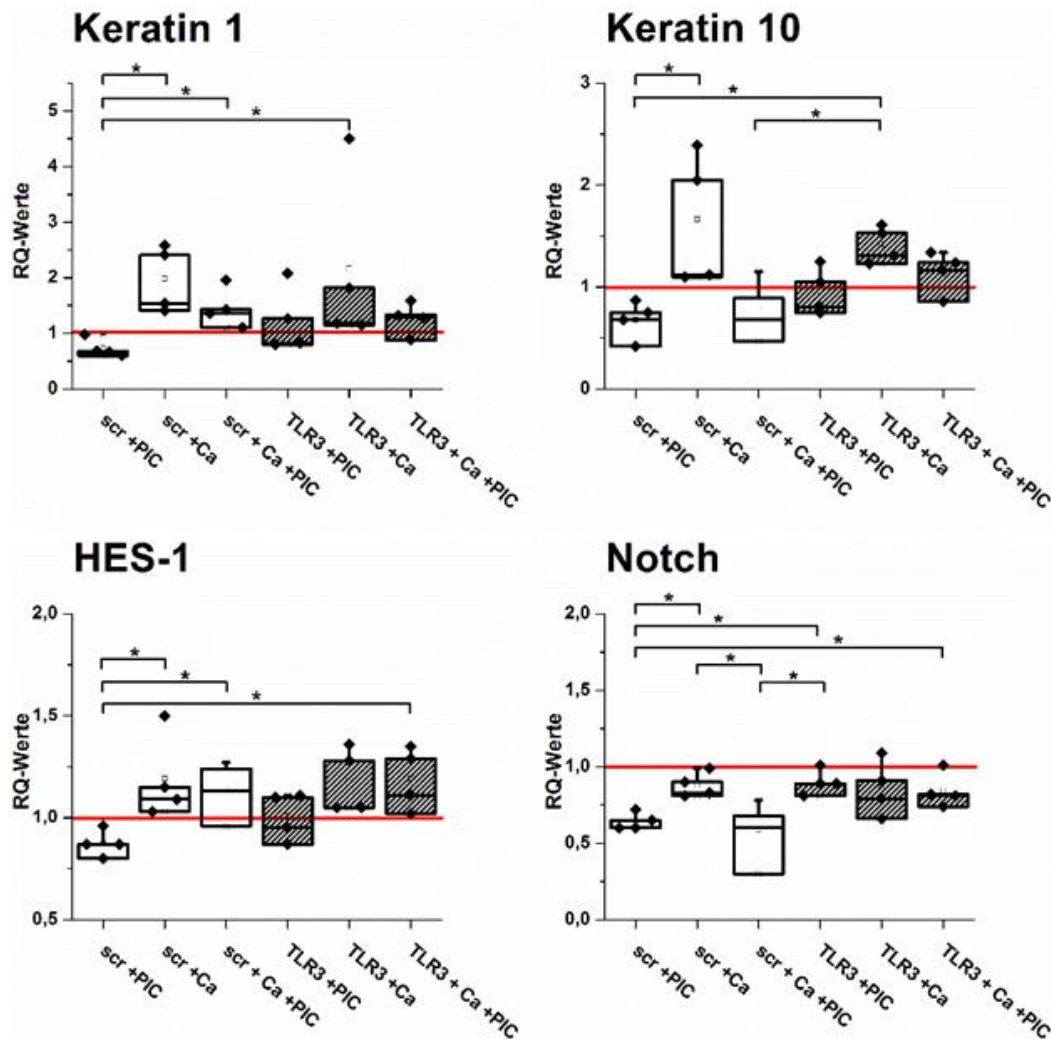


Abbildung 31 - Relative Expression von Keratin 1, Keratin 10, Notch und HES1 in Keratinozyten (TLR 3 siRNA Knockdown bzw. *scr* scrambled Kontrolle) nach 24 h Stimulation mit 1 µg/mL Poly(I:C) (PIC) und/oder 0,5 mM Calcium (Ca). Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (rote Linie). n=4. *p<0,05, Mann-Whitney-Test.

9.1.10 Poly(I:C) Behandlung bei verschiedenen Konfluenz-Stadien

Bei den in 9.1.9 vorgestellten Daten, konnte ein Einfluss der Aktivierung von TLR 3 durch Poly(I:C) hinsichtlich einer Unterdrückung der Calcium-induzierten Differenzierung nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ein maßgeblicher Faktor kann dabei die Konfluenz der Zellen sein. Bisher vorgestellte Experimente wurden mit 150.000 Zellen/*well* in einer 6-*well* Platte am Vortag der Induktion des siRNA vermittelten Knockdowns durchgeführt. Obwohl die gemessene Zellzahl bei Aussaat und auch das Lot. der NHEKneo immer gleich gehalten wurden, entstand der Eindruck, dass bei späteren Experimenten die Zellen zum Zeitpunkt der Stimulation

mit Poly(I:C) (48 h nach siRNA Knockdown) konfluent waren, als in vorangegangenen Experimenten (keine Daten dazu verfügbar). Eine sorgfältige Überprüfung sämtlicher Kulturbedingungen ließ nur den Schluss zu, dass die Zellen möglicherweise durch Veränderungen im kommerziell erworbenen Zellkulturmedium besser anwuchsen und damit 48 h nach siRNA Knockdown eine höhere Konfluenz aufwiesen als in vorangegangenen Experimenten. Daher wurden in weiteren Experimenten NHEKneo parallel in Zelldichten von 75.000 bzw. 100.000 Zellen/*well* in der 6-*well* Zellkulturplatte ausgesät und analog der siRNA-Knockdown, sowie Poly(I:C)-Behandlung und Genexpressionsanalyse durchgeführt.

Aus Abbildung 32 kann entnommen werden, dass der Grad der Konfluenz einen deutlichen Einfluss auf die Expression der Differenzierungsmarker Keratin 1, 10, HES1 und Notch und auch auf die Wirkung von Poly(I:C) hatte. In den dichter ausgesäten Zellen (100.00 Zellen/*well*) war durch Behandlung mit Poly(I:C) keine eindeutige Tendenz hin zu einer Repression der Marker in den Keratinozyten der *scrambled* Kontrolle zu erkennen, die beim TLR 3 Knockdown ausblieb. Hingegen war in den dünner ausgesäten Zellen (75.000 Zellen/*well*) im Trend eine Repression der untersuchten Gene durch Poly(I:C) zu erkennen, die bei Knockdown von TLR 3 ausblieb bzw. hier sogar zu einer leichten Induktion der Gene führte.

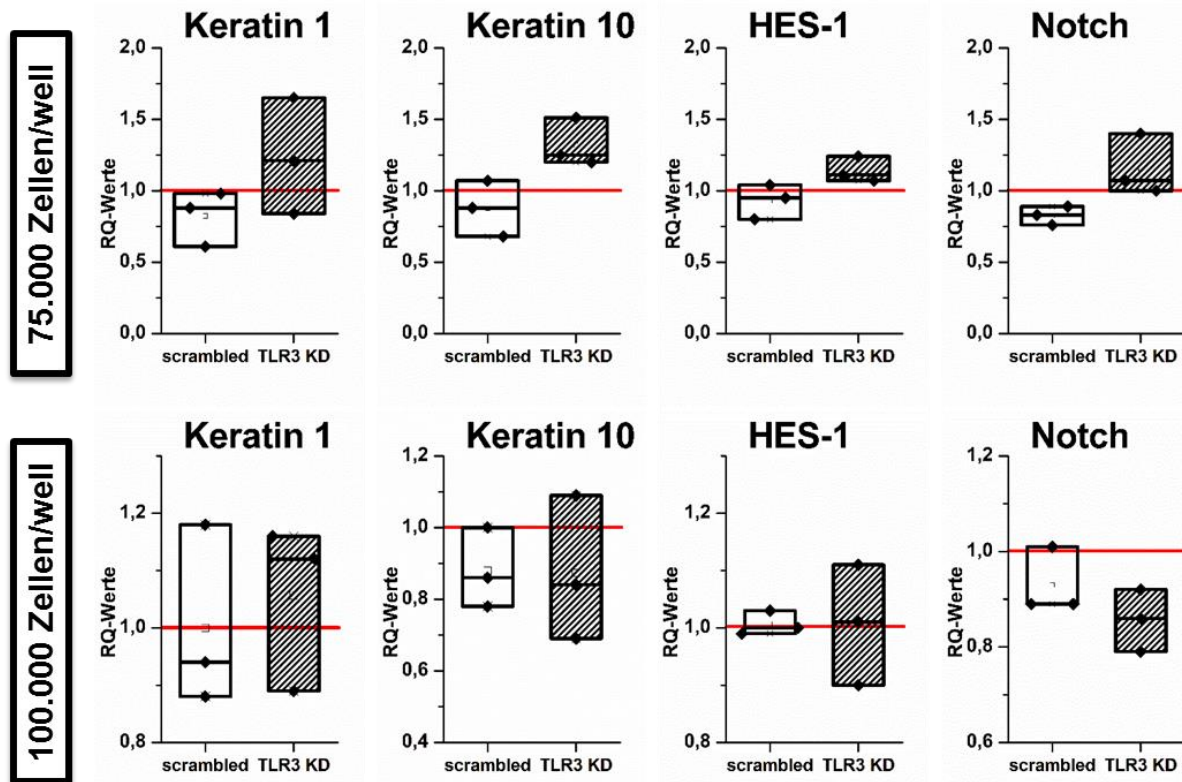


Abbildung 32 - Relative Expression von Keratin 1, Keratin 10, Notch und HES1 in Keratinozyten (TLR 3 siRNA Knockdown bzw. *scrambled* Kontrolle) nach 24 h Stimulation mit 1 µg/mL Poly(I:C) (PIC) und/oder 0,5 mM Calcium (Ca). Ausgesät wurden Zelldichten von 75.000 bzw.-100.000 Zellen/well in eine6-well Zellkulturplatte. Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle (rote Linie). n=3.

9.1.11 Whole Genome Microarray Poly(I:C) behandelter Keratinozyten

Um einen genomweiten Überblick über die Funktion von TLR 3 in Keratinozyten zu gewinnen, wurde ein *Whole Human Genome Microarray* bei der Firma Agilent durchgeführt. Dafür wurden sechs Probensets herausgegriffen. Ein Probenset bestand aus *scrambled* Kontrolle und TLR 3 Knockdown in NHEKneo, jeweils unbehandelt und Poly(I:C) stimuliert. Bei der Datenanalyse mit Hilfe der Statistiksoftware R wurden alle unbehandelten *scrambled* Proben gegen alle Poly(I:C) behandelten *scrambled* Proben verglichen. Gleichsam wurde mit den TLR 3-Knockdown Proben verfahren. Unter Verwendung eines adjustierten p-Wertes von $< 0,01$ ergab sich dabei für die *scrambled* Proben eine Zahl von 1290 unter Poly(I:C)-Behandlung differenziell regulierten Genen. Für den TLR 3-Knockdown konnten unter diesen Bedingungen keine signifikant regulierten Gene identifiziert

werden. Alle in der Kontrolle als reguliert gefundenen Gene unterlagen damit also einer TLR 3-Abhängigkeit.

Die in der *scrambled* Kontrolle nach Poly(I:C)-Behandlung differenziell regulierten Gene wurden mittels *Ingenuity Pathway Analysis Software* (IPA) analysiert. Dabei wurden biologische Annotationen auf *diseases and functions* basierend auf den Genexpressionsänderungen ermittelt. Näher betrachtet wurden hierbei Annotationen biologischer Funktionen mit einem p-Wert $< 0,001$. IPA ermittelt dazu außerdem einen *Activation z-score*, ein Faktor, der eine positive oder negative Regulation der entsprechenden biologischen Funktion vorhersagt. In Abbildung 33 ist eine Auswahl regulierter biologischer Funktionen wiedergegeben. Besonders stark positiv reguliert sind dabei immunologische Funktionen, z.B. inflammatorische Antwort und Zellbewegung (Chemotaxis, Migration, Invasion). Daneben sind auch Funktionen positiv reguliert, die in entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Psoriasis oder Rheuma eine Rolle spielen. Es finden sich außerdem Regulationen von Funktionen, die Zelltod und –überleben betreffen. So sind Zellviabilität und –überleben positiv reguliert, wohingegen Apoptose negativ reguliert ist.

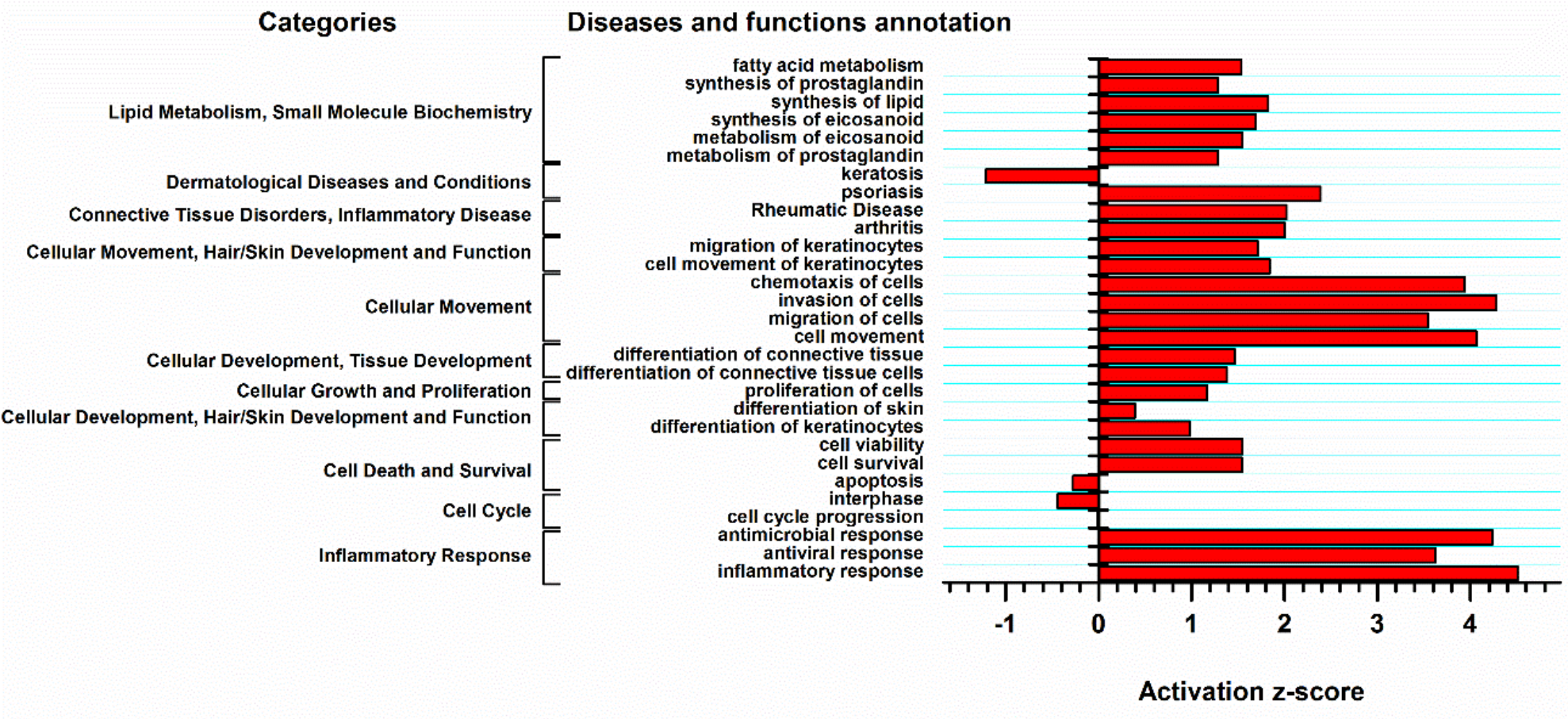


Abbildung 33 – Microarray-Analyse Poly(I:C)behandelter Keratinozyten.

9.1.12 Validierung des Whole Human Genome Microarray

Zur Validierung des Microarrays wurden insgesamt acht Gene ausgewählt und mittels Real Time PCR die Richtung der im Array ermittelten Relativen Genexpression (Induktion oder Repression) überprüft. Es wurden TaqMan-Assays für MMP9 (*matrix metalloproteinase 9*), IL36G (*interleukin 36, gamma*), CLDN1 (*claudin 1*), TJP2 (*tight junction protein 2*) als Beispiele für unterschiedlich starke Induktionen und AQP10 (*aquaporin 10*), KRT10 (*keratin 10*), DSG1 (*desmoglein 1*) und KRT4 (*keratin 4*) als Beispiele für unterschiedlich starke Repressionen durchgeführt. Die relative Genexpression (RQ), die im Array für die *scrambled* Proben ermittelt wurde, ist in nachfolgender Tabelle 5 dem medianen RQ-Wert aus der qRT-PCR gegenüber gestellt.

Tabelle 5 – Gegenüberstellung der RQ-Werte ausgewählter Gene aus Microarray und qRT-PCR.

Gen	RQ Array	RQ qRT-PCR
MMP9	27,06	41,33
IL36G	6,09	7,52
CLDN1	1,97	2,06
TJP2	1,29	1,21
AQP10	0,69	0,71
DSG1	0,59	0,69
KRT4	0,63	0,31
KRT10	0,43	0,63

Die im Microarray ermittelten RQ-Werte stimmten sehr gut mit den Daten der RealTime-PCR überein. Alle im Array als induziert ermittelten Gene zeigten auch in der qRT-PCR eine Induktion. Ebenso ist die Reprimierung der ausgewählten Gene sowohl im Array als auch im TaqMan-Assay messbar. Insbesondere stimmten die Größenordnung von Induktion und Repression der Gene im Vergleich der Methoden überein. Dies zeigte eindeutig, dass die im Microarray ermittelten Daten valide sind.

Obwohl im Microarray mit den dort angelegten Kriterien nur für die *scrambled* Kontrolle signifikant differenziell regulierte Gene nach Poly(I:C) –Behandlung ermittelt werden konnten, wurden die TaqMan-Assays der für die Validierung ausgewählten Gene auch für die TLR 3 Knockdown Proben eingesetzt. Eine Zusammenfassung aller in der qRT-PCR bestimmten RQ-Werte ist in Abbildung 34 dargestellt.

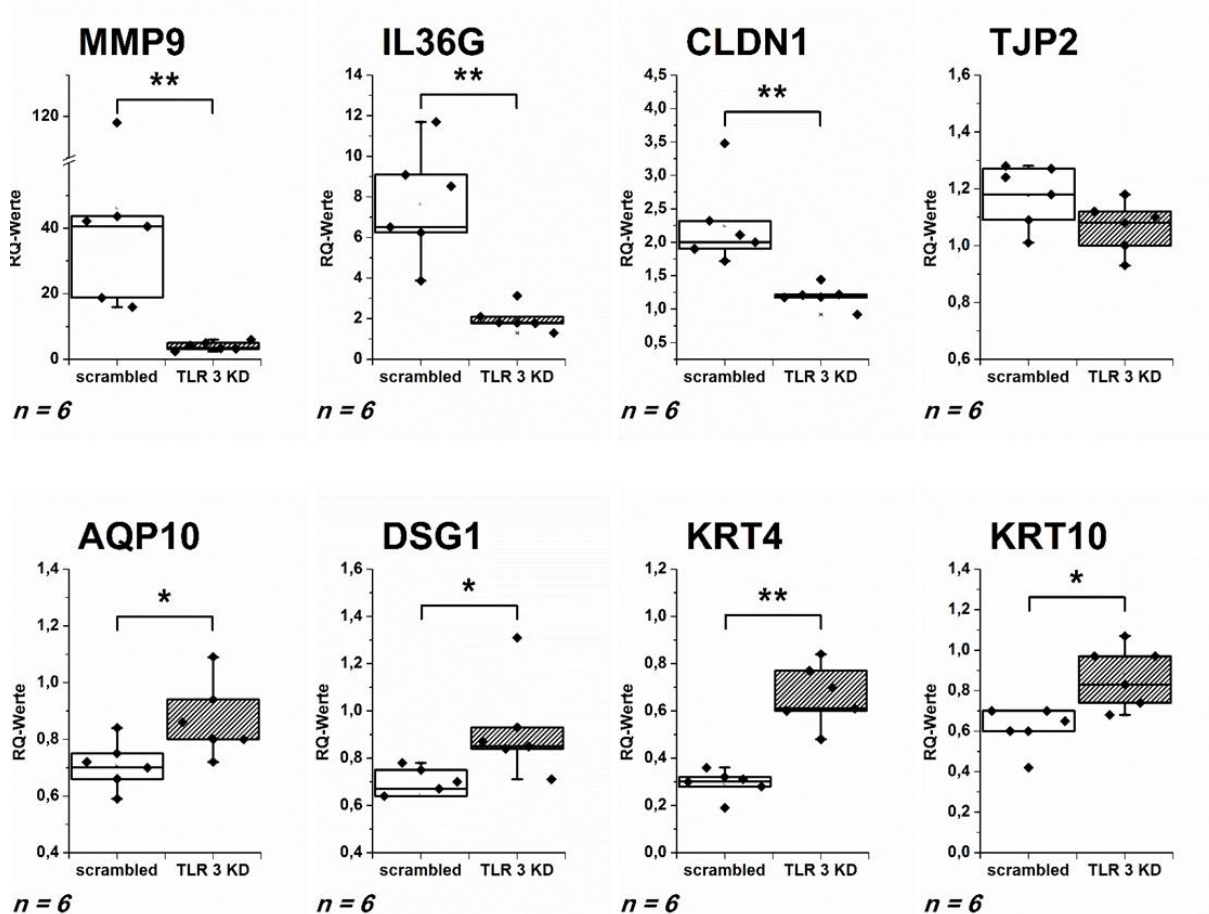


Abbildung 34 – Validierung des *Whole Human Genome Arrays* mit ausgewählten Genen. Relative Expression ausgewählter Gene in Keratinozyten (TLR 3 siRNA Knockdown bzw. *scrambled* Kontrolle) nach 24 h Stimulation mit 1 µg/mL Poly(I:C). Dargestellt ist die auf 18S rRNA normalisierte relative Genexpression RQ, bezogen auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle. n=6. *p<0,05, **p<0,01, Mann-Whitney-Test.

Die RQ-Werte der *scrambled* Proben sind in Tabelle 5 dargestellt. Obwohl der Array unter den ausgewählten Parametern im TLR 3 Knockdown keine differenzielle Regulation von Genen nach Poly(I:C)-Behandlung detektieren konnte, zeigten die TaqMan-Assays dennoch eine Regulation. Ebenso wie in den *scrambled* Proben waren im TLR 3 Knockdown MMP9 (RQ-Wert im Median 3,78), IL36G (1,81) und CLDN1 (1,20) induziert. Für TJP2 konnte keine Regulation beobachtet werden (1,09). AQP10 (0,83), DSG1 (0,86), KRT4 (0,66) und KRT10 (0,9) waren auch in den TLR 3 KD Proben reprimiert. Wenngleich auch im TLR 3 KD eine Regulation (bis auf TJP2) der ausgewählten Gene ermittelt werden konnte, so war die Regulation im Vergleich zu *scrambled* signifikant verschieden.

9.2 Tropoelastin/Elastin im Zellkulturmodell

Da es keinen Antikörper gibt, der zwischen dem unreifen monomeren Tropoelastin (TE) und dem reifen Elastin der elastischen Faser unterscheiden kann, wird hier im Zusammenhang mit dem Antikörper-markierten Protein von TE/Elastin gesprochen.

9.2.1 Validierung von Transportorganell-spezifischen Antikörpern

Für Kolokalisationsexperimente zum TE/Elastin-Trafficking wurden in ersten Versuchen Organell-spezifische Antikörper an neonatalen humanen dermalen Fibroblasten getestet. Dazu wurden die Zellen in LabTek®-Gefäßen mit Deckglasboden ausgesät, unter Standard-Bedingungen kultiviert und schließlich fixiert und markiert. Getestet wurden Antikörper gegen die Proteindisulfid-Isomerase (PDI) zur Markierung des ER und ein Antikörper gegen Golgin-97, einem spezifischen Protein des Golgi-Apparates. Die Immunfluoreszenz-Bilder wurden an einem konfokalen Laserraster-Mikroskop (CLSM, Leica TCS SP5) aufgenommen und sind exemplarisch in Abbildung 35 dargestellt.

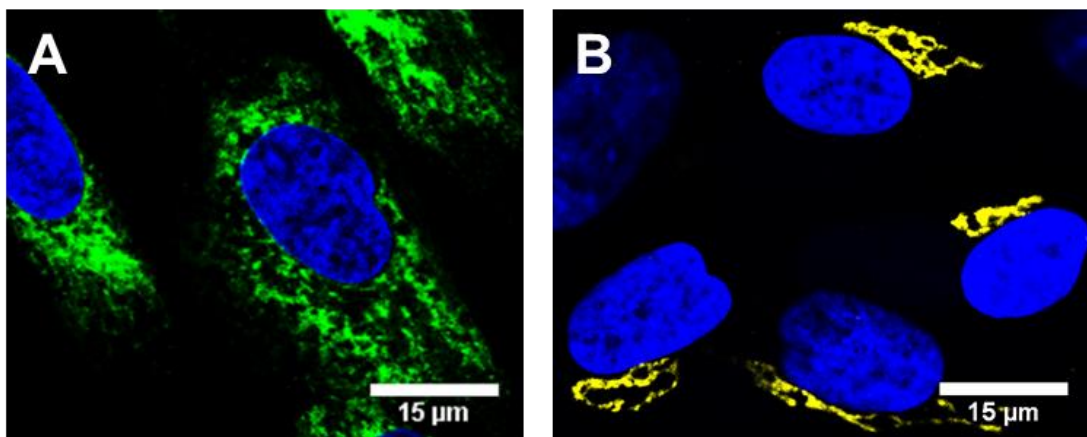


Abbildung 35 - Immunfluoreszenz-Bilder eines Tests von Organell-spezifischen Antikörpern an HDFneo-Zellen. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen kultiviert, mit PFA fixiert und mit verschiedenen Organell-spezifischen Antikörpern markiert. Getestet wurden Antikörper gegen die PDI (Bild A, grün, abcam, #ab2792, Verdünnung 1:1000) und Golgin-97 (Bild B, gelb, Invitrogen, #A21270, 1:500). Die Zellkerne wurden mit DAPI (jeweils in blau) gegen gefärbt. Weitere Details siehe Text. Maßbalken: 15 µm.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die zwei hier getesteten Antikörper eine spezifische klar definierte Struktur innerhalb der Zelle markieren. Der PDI-Antikörper von abcam (Abbildung 35, Teil A) zeigt eine Netzwerk-artige Struktur, die sich über große Teile der Zelle um den Zellkern herum erstreckt, der Golgin-97-Antikörper (Abbildung 35, Teil B) markiert eine deutlich kleinere Kappen-ähnliche Struktur, die immer nur an einer Seite des Zellkerns zu finden ist. Da die hier markierten

Strukturen mit den Erwartungen aus allgemeinen Literaturstellen übereinstimmen, wurden die hier getesteten Antikörper für die Markierung von Organellen in HDFneo-Zellen in nachfolgenden Experimenten eingesetzt.

9.2.2 Intrazelluläre Lokalisation von TE/Elastin

Zur Analyse der intrazellulären Verteilung wurden HDFneo mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in LabTek®-Gefäßen ausgesät, über Nacht kultiviert und anschließend mit 10 ng/mL TGF- β stimuliert. Parallel erfolgte als Kontrolle eine Kultivierung ohne TGF- β . Die Zellen wurden 0, 24 und 48 h nach Start der Stimulation mit Methanol/Aceton fixiert und in einer Doppelfärbung TE/Elastin und der Golgi-Apparat bzw. das ER markiert. Aufnahmen der Färbungen erfolgten im CLSM und sind als Maximalprojektionen für Färbungen von TE/Elastin und Golgi-Apparat in Abbildung 36 bzw. für Färbungen von TE/Elastin und ER in Abbildung 37 dargestellt.

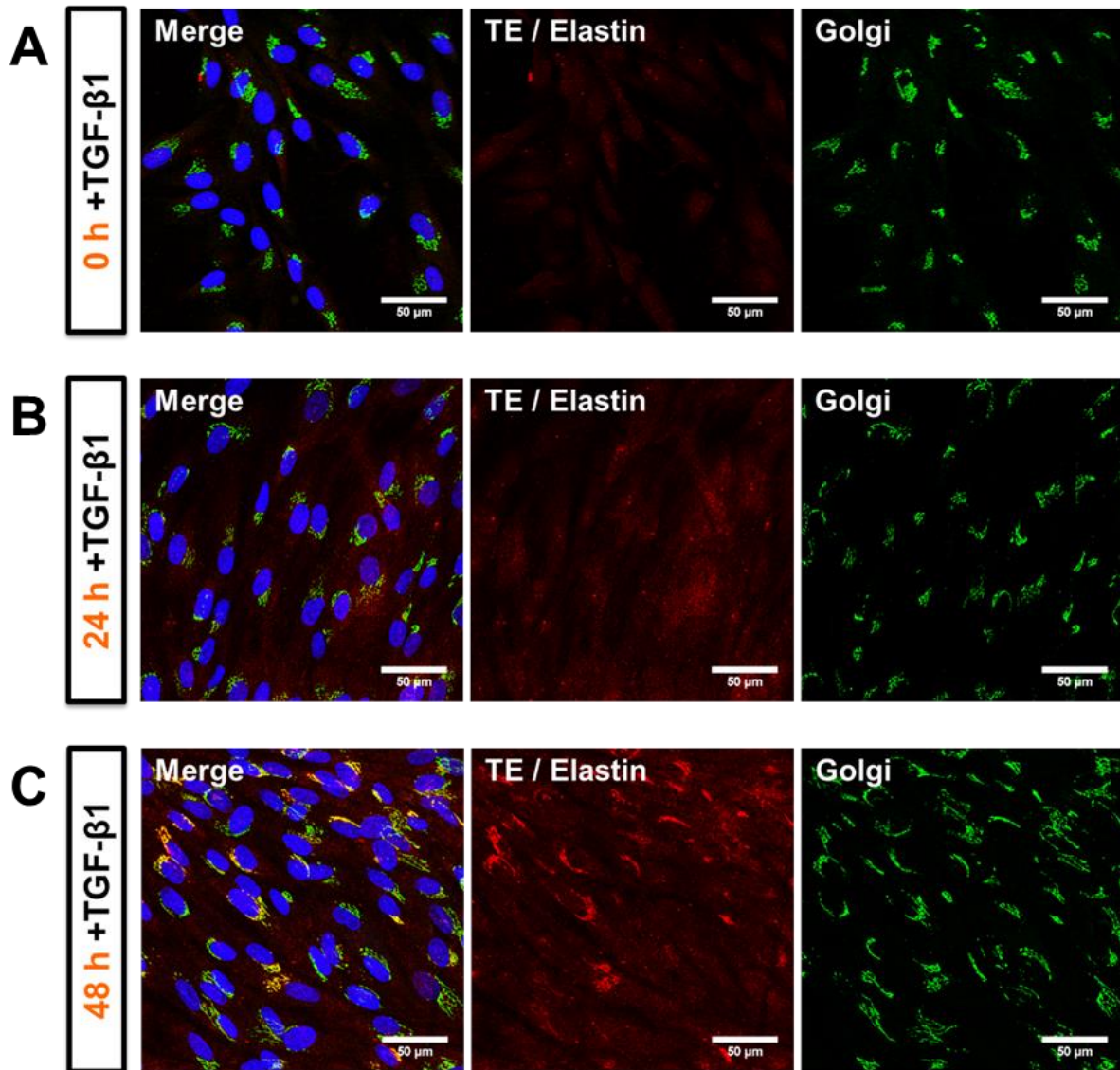


Abbildung 36 – Immunfluoreszenzbilder von HDFneos. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in LabTek®-Gefäßen ausgesät und über Nacht kultiviert. Fixierung mit Methanol/Aceton vor dem Start der TGF-β1-Stimulation (A) und nach 24 h (B) bzw. 48 h (C) Stimulation mit 10 ng/mL TGF-β1. In einer Doppelfärbung wurden jeweils Elastin (rot, Kaninchen-anti-Elastin 1:1000, PR398 von EPC) und der Golgi-Apparat (grün, Maus-anti-Golgin 97 1:500) markiert. Die Aufnahmen erfolgten am CLSM (Leica TCS SP5). Maßbalken: 50 µm.

In Abbildung 36 A bis C ist zu erkennen, dass nach 48-stündiger Behandlung der Zellen mit TGF-β in etwa 50-60 % der Zellen ein verstärktes TE/Elastin-Signal (rot) in der Nähe des Zellkerns (blau) auftritt (Abbildung 36 C). Während vor TGF-β1-Stimulation (Abbildung 36 A) das TE/Elastin eher diffus in der Zelle verteilt zu sein scheint, lässt sich das nach 48 h akkumulierte TE/Elastin dem Golgi-Apparat (grün) zuordnen. Außerdem ist zu erkennen, dass das TE/Elastin-Signal insgesamt stärker wird.

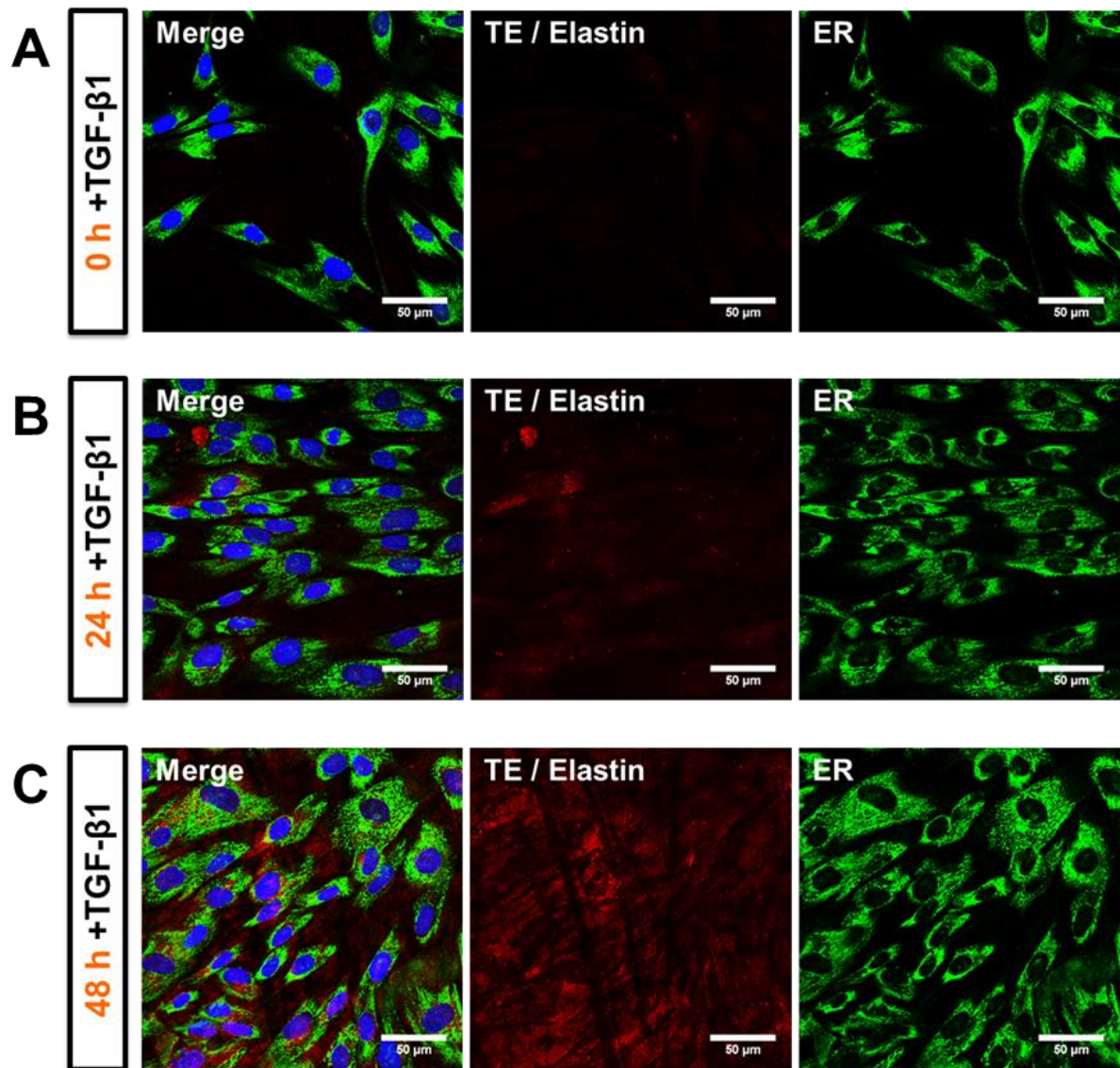


Abbildung 37 - Immunfluoreszenzbilder von HDFneoz. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in LabTek®-Gefäßen ausgesät und über Nacht kultiviert. Fixierung mit Methanol/Aceton vor dem Start der TGF-β1-Stimulation (A) und nach 24 h (B) bzw. 48 h (C) Stimulation mit 10 ng/mL TGF-β1. In einer Doppelfärbung wurden jeweils Elastin (rot, Kaninchen-anti-Elastin 1:1000, PR398 von EPC) und das ER (grün, Maus-anti-PDI 1:1000). Die Aufnahmen erfolgten am CLSM (Leica TCS SP5). Maßbalken: 50 µm.

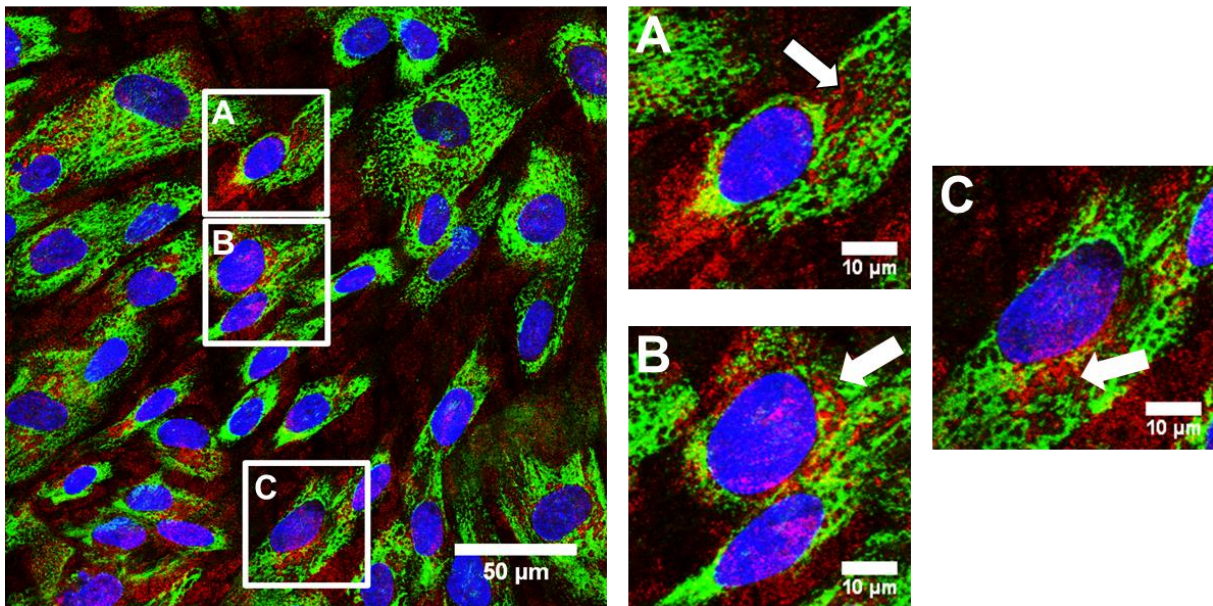


Abbildung 38 - Vergrößerte Darstellungen einiger Bereiche aus Abbildung 37 C. Maßbalken: 50 µm (großes Bild) bzw. 10 µm (kleine Bilder).

Die Doppelfärbungen in Abbildung 37 A bis C zeigen ebenfalls eine Zunahme des TE/Elastin-Signals (rot). Allerdings lässt sich zu keinem der gewählten Zeitpunkte nach Start der Behandlung mit TGF- β das TE/Elastin-Signal eindeutig dem ER (grün) zuzuordnen. Zwar deutet sich in dem gewählten Bildausschnitt in Abbildung 37 C eine zellkernnahe Akkumulation des Tropoelastins innerhalb einiger Zellen ähnlich wie in Abbildung 36 C an, jedoch scheint dieses verstärkte Signal eher in Bereichen zu sein, die nicht dem ER zuzuordnen sind, wie die vergrößerten Ausschnitte in Abbildung 38 verdeutlichen (siehe insbesondere Pfeile in Abbildung 38).

Zur Analyse der intrazellulären TE-Menge zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Start der TGF- β -Behandlung wurden zunächst entsprechende Proteinlysate von HDFneo-Zellen hergestellt und je 30 µg Protein in der SDS-PAGE eingesetzt. Die Immundetektion von TE/Elastin und GAPDH (als Ladekontrolle) erfolgte nach dem Westernblot (siehe Abbildung 39).

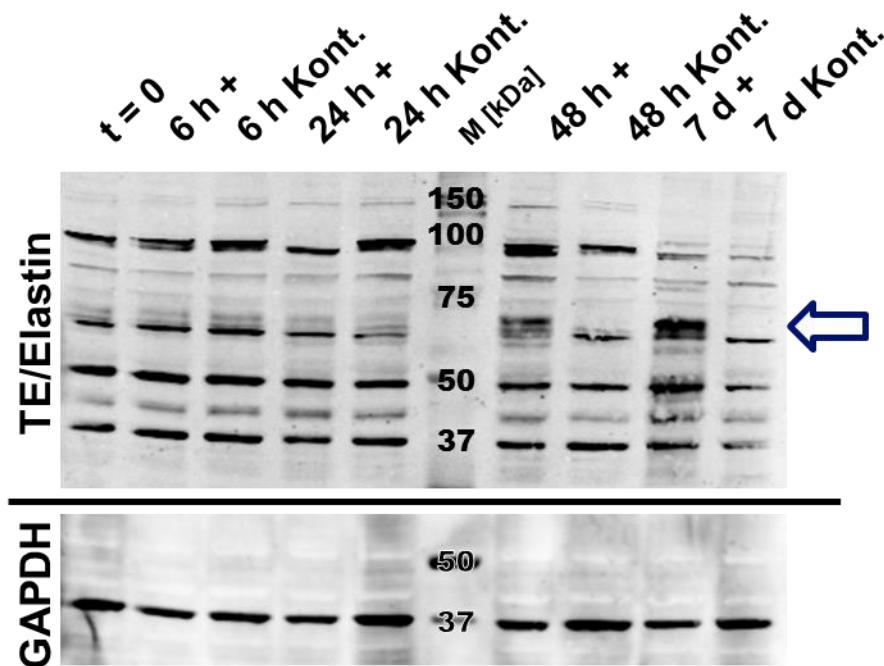


Abbildung 39 - Westernblot: TE/Elastinmenge in HDFneo zu verschiedenen Zeitpunkten nach Start der TGF- β 1-Behandlung. Proteinlysate wurden 0, 6, 24, 48 Stunden und 7 Tage nach Start der TGF- β -Behandlung (+) bzw. ohne Behandlung (Kont.) hergestellt und jeweils 30 μ g Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Als Größenkontrolle diente ein Proteinstandard (M, Größen in kDa) und als Ladekontrolle GAPDH (unten, Ziege-anti-GAPDH, 1:200). Der Elastin-Antikörper (oben, Kaninchen-anti-Elastin 1:1000, PR398 von EPC) erkennt eine Vielzahl von Banden, von denen nur eine (blauer Pfeil) vermutlich TE/Elastin zuzuordnen ist.

Durch die Behandlung mit TGF- β ist in den Proteinlysaten von HDFneo-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle grundsätzlich eine zusätzliche bzw. deutlich stärkere TE/Elastinbande auf einer Höhe von etwa 60 kDa zu erwarten. Wie in Abbildung 39 (oben) zu erkennen ist, detektiert der Elastin-Antikörper von EPC eine Vielzahl von Banden, von denen lediglich eine (blauer Pfeil) in TGF- β behandelten Proben, aber nicht in den Kontrollen auftaucht und zudem die für TE/Elastin vorhergesagte Größe von etwa 60 kDa besitzt. Diese Bande repräsentiert daher höchstwahrscheinlich das TE/Elastin-Protein. Ausgehend von dieser Annahme ist aus der Abbildung ist außerdem ersichtlich, dass die TE/Elastinmenge schon nach 48 h TGF- β Stimulation deutlich zugenommen hat und nach 7 Tagen am stärksten war. Das Signal der Ladekontrolle GAPDH war im Vergleich dazu unabhängig vom Zeitpunkt und der Behandlung konstant.

9.2.3 Effekte von Inhibitoren auf den intrazellulären TE-Transport

Da mittels der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Immunmarkierungen nach TGF- β 1-Stimulation das intrazelluläre TE lediglich dem Golgi-Apparat eindeutig zugeordnet werden konnte, wurden in weiterführenden Versuchen Transportinhibitoren eingesetzt, für die beschrieben ist (siehe 5.7), dass sie die Proteinsekretion an definierten Stellen unterbrechen, so dass TE in einzelnen Zellorganellen angereichert werden würde und dadurch potenziell für eine Immunmarkierung leichter zugänglich sein könnte.

HDFneo-Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät und über Nacht kultiviert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit 10 ng/mL TGF- β 1 für 24 Stunden und schließlich zusätzlich eine Inkubation mit den Inhibitoren mit den in 8.1.4 angegebenen Konzentrationen in Standardmedium. Nach drei Stunden wurden die Zellen fixiert und TE/Elastin, der Golgi-Apparat und das ER für Fluoreszenzaufnahmen am CLSM markiert. Die entsprechenden Aufnahmen sind in Abbildung 40 bis Abbildung 44 dargestellt.

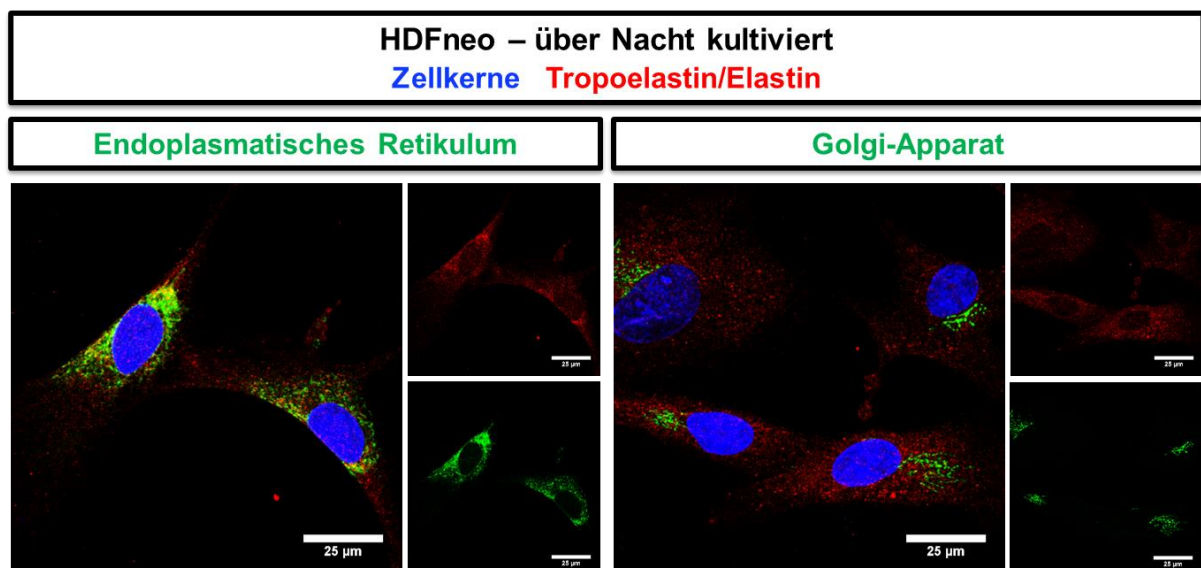


Abbildung 40 – Fluoreszenzaufnahmen über Nacht inkubierter HDFneo-Zellen. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät, über Nacht kultiviert, mit Methanol/Aceton fixiert und in einer Doppelfärbung TE/Elastin (rot, Kaninchen-anti-Elastin 1:1000, PR398 von EPC) und das ER (grün, Maus-anti-PDI 1:1000) bzw. der Golgi-Apparat (grün, Maus-anti-Golgin 97 1:500) markiert. Die Aufnahme erfolgte am CLSM (Leica TCS SP5). Maßbalken: 25 μ m.

Die Zellen der über Nacht kultivierten unbehandelten Kontrolle (Abbildung 40) zeigen vor Stimulation mit TGF- β 1 keine auffälligen Strukturen. Das ER erscheint als intaktes Netzwerk, das sich über die Zelle erstreckt, und der Golgi-Apparat als

zellkernnahe tubuläre Struktur. Ebenso ist die intrazelluläre Verteilung des TE/Elastins nicht auffällig verändert. Die Überlagerungsbilder erlauben außerdem keine eindeutige Lokalisation von TE/Elastin im ER oder Golgi-Apparat.

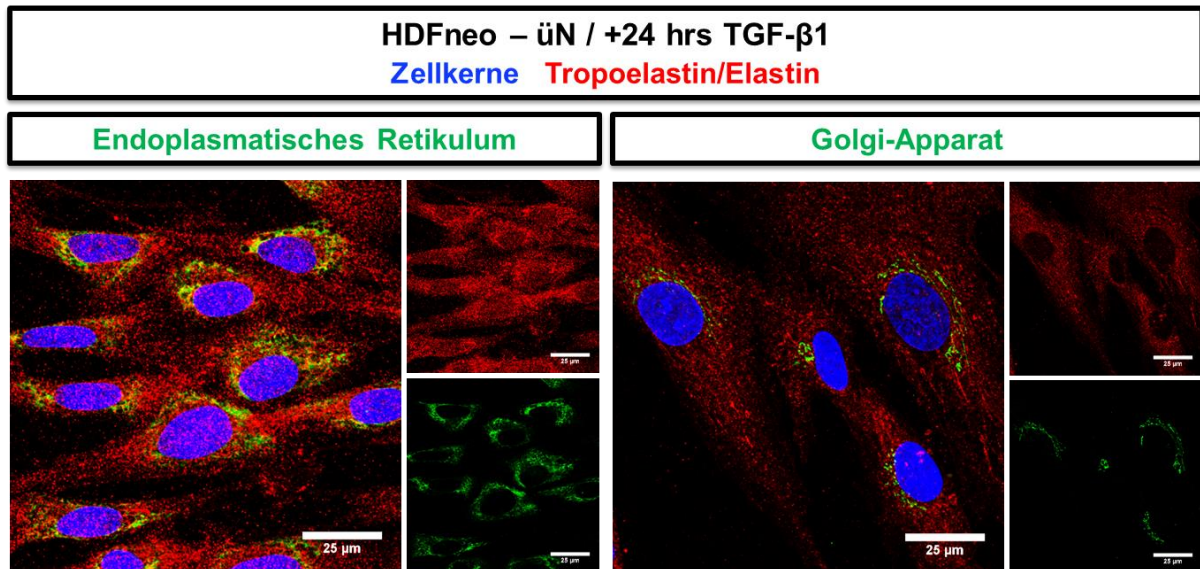


Abbildung 41 – Fluoreszenzaufnahmen üN und mit TGF- β 1 inkubierter HDFneo. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät, über Nacht kultiviert, 24 h mit 10 ng/mL TGF- β 1 stimuliert, mit Methanol/Aceton fixiert und in einer Doppelfärbung TE/Elastin (rot, Kaninchen-anti-Elastin 1:1000, PR398 von EPC) und das ER (grün, Maus-anti-PDI 1:1000) bzw. der Golgi-Apparat (grün, Maus-anti-Golgin 97 1:500) markiert. Die Aufnahme erfolgte am CLSM (Leica TCS SP5). Maßbalken: 25 μ m

Abbildung 41 zeigt, dass die 24-stündige Behandlung mit TGF- β 1 allein keinen Einfluss hat auf die Morphologie von ER und Golgi-Apparat. Im Vergleich zu den Bildern gänzlich unbehandelter Fibroblasten (Abbildung 40) ist aber eine deutliche Zunahme des intrazellulären TE/Elastinsignals zu erkennen, wobei sich das TE/Elastin vor allem in kleinen punktuellen Strukturen in der Nähe des Zellkerns findet. Eine Kolokalisation mit dem ER oder dem Golgi-Apparat kann auch hier nicht beobachtet werden.

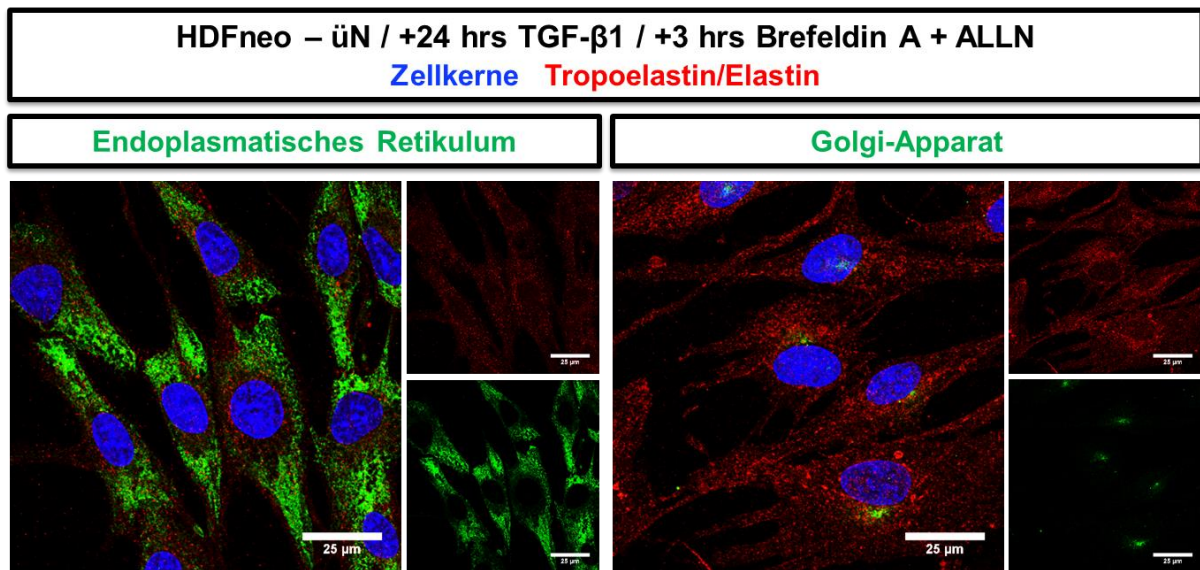


Abbildung 42 - Fluoreszenzaufnahmen üN, mit TGF- β 1 und mit Brefeldin A/ALLN inkubierter HDFneo. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät, über Nacht kultiviert, 24 h mit 10 ng/mL TGF- β 1 stimuliert, 3 h mit Brefeldin A/ALLN behandelt, mit Methanol/Aceton fixiert und in einer Doppelfärbung TE/Elastin (rot, Kaninchen-anti-Elastin 1:1000, PR398 von EPC) und das ER (grün, Maus-anti-PDI 1:1000) bzw. der Golgi-Apparat (grün, Maus-anti-Golgin 97 1:500) markiert. Die Aufnahme erfolgte am CLSM (Leica TCS SP5). Maßbalken: 25 μ m.

Nach Behandlung der mit TGF- β 1 stimulierten Fibroblasten mit Brefeldin A/ALLN ist der Einfluss des Inhibitors auf die Morphologie der Zellorganellen deutlich erkennbar (Abbildung 42). Das ER schwillt an und erstreckt sich flächig über die Zelle (linke Seite, grün), wohingegen der Golgi-Apparat disassembliert und nur noch als kleiner zellkernnaher Punkt erkennbar bleibt (rechte Seite, grün). Dies entspricht der Erwartung, dass Brefeldin A den Transport sekretorischer Proteine aus dem ER heraus hemmt, aber der retrograde Transport vom Golgi zum ER dennoch stattfindet, so dass ein großes Golgi/ER-Kompartiment entsteht. TE/Elastin (rotes Signal) erscheint ebenfalls punktförmig, wobei sich an einigen Stellen recht große globuläre Strukturen gebildet haben, die sich eher in Zellkernnähe finden. Eine Zuordnung zu einem der hier markierten Organellen ist auch aus dieser Abbildung nicht möglich.

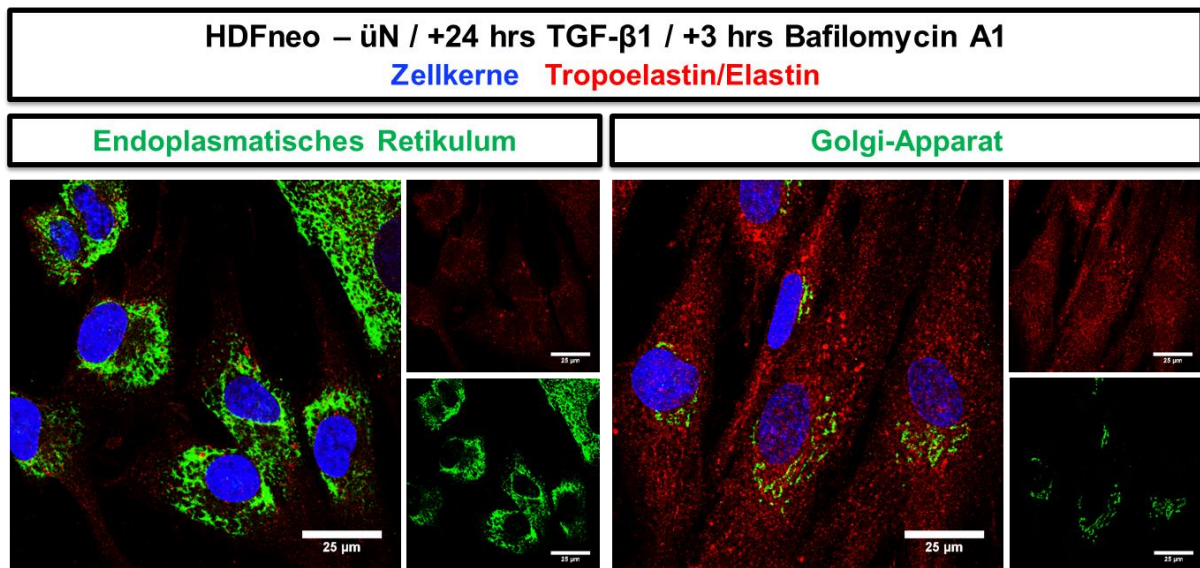


Abbildung 43 - Fluoreszenzaufnahmen üN, mit TGF- β 1 und mit Bafilomycin A1 inkubierter HDFneo. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät, über Nacht kultiviert, 24 h mit 10 ng/mL TGF- β 1 stimuliert, 3 h mit Bafilomycin A1 behandelt, mit Methanol/Aceton fixiert und in einer Doppelfärbung TE/Elastin (rot, Kaninchen-anti-Elastin 1:1000, PR398 von EPC) und das ER (grün, Maus-anti-PDI 1:1000) bzw. der Golgi-Apparat (grün, Maus-anti-Golgin 97 1:500) markiert. Die Aufnahme erfolgte am CLSM (Leica TCS SP5). Maßbalken: 25 μ m.

Bafilomycin A1 hemmt die H⁺-ATPase des V-Typs, wodurch das TGN, sowie lyso- und endosomale Kompartimente nicht korrekt angesäuert werden können. Die Inkubation der Fibroblasten mit Bafilomycin A1 (Abbildung 43) lässt in der Morphologie von ER und Golgi-Apparat keinen Einfluss erkennen. Allerdings erscheint das TE/Elastinsignal relativ zu der Kontrolle in Abbildung 41 in deutlich vergrößerten globulären Strukturen, die sich eher in der Peripherie der Zellen, d.h. etwas entfernt vom Zellkern befinden. Aber auch hier ist eine Kolo-kalisation von TE/Elastin mit dem ER oder dem Golgi-Apparat nicht zu beobachten.

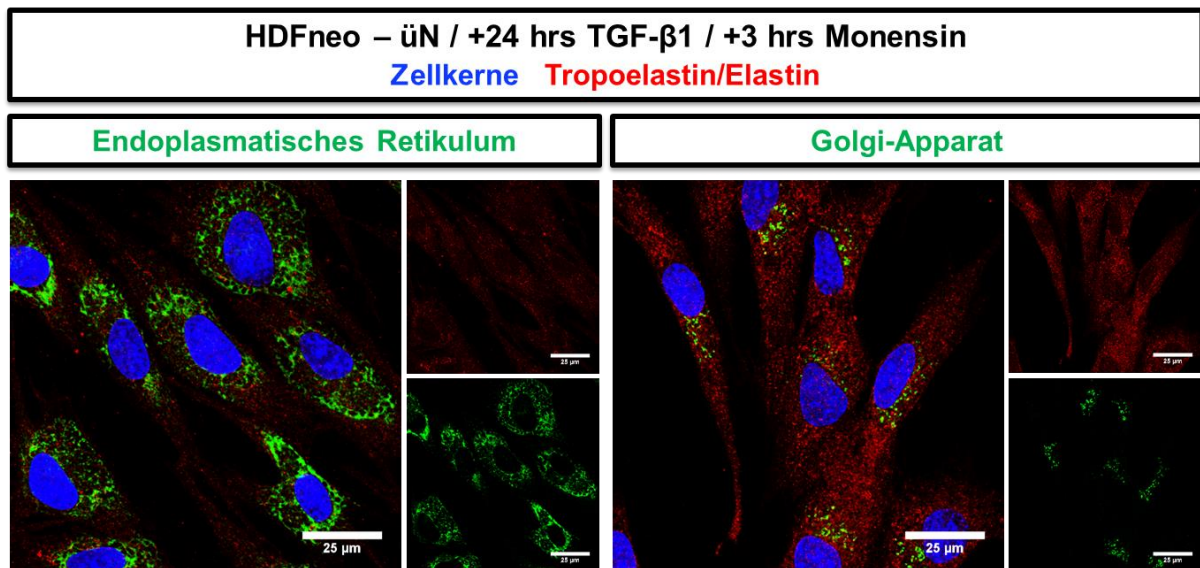


Abbildung 44 - Fluoreszenzaufnahmen üN, mit TGF-β1 und mit Monensin inkubierter HDFneo. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät, über Nacht kultiviert, 24 h mit 10 ng/mL TGF-β1 stimuliert, 3 h mit Monensin behandelt, mit Methanol/Aceton fixiert und in einer Doppelfärbung TE/Elastin (rot, Kaninchen-anti-Elastin 1:1000, PR398 von EPC) und das ER (grün, Maus-anti-PDI 1:1000) bzw. der Golgi-Apparat (grün, Maus-anti-Golgin 97 1:500) markiert. Die Aufnahme erfolgte am CLSM (Leica TCS SP5). Maßbalken: 25 µm.

Monensin unterbindet innerhalb des Golgi-Apparates den Transport von der zellkernnahen *cis*- zur *trans*-Seite. Abbildung 44 zeigt, dass Monensin einen deutlichen Effekt auf die Morphologie der Zelle hat. Das ER bleibt intakt, wohingegen der Golgi-Apparat deutlich fragmentiert. Das TE/Elastin Signal findet sich in verdickten vesikulären Strukturen, die sich über die Fläche der Zelle verteilen. Allerdings kann auch anhand dieser Bilder keine Zuordnung des TE/Elastins zu einem der Zellorganellen erfolgen.

9.2.4 Transiente Transfektion von HDFneo mit EGFP-ELN und HA/His/c-Myc-ELN

Zur Untersuchung des intrazellulären Tropoelastin-Transportes wurde angestrebt, diesen möglichst im *Live Cell* Modus nachzuvollziehen. Daher sollte mit einem Protein-Tag versehenes Tropoelastin in Fibroblasten mittels Elektroporation transient exprimiert und zunächst auf seine Fähigkeit der Faserbildung hin untersucht werden.

Zunächst wurde mit einem Kontroll-Plasmid (pEGFP-C1) überprüft, ob sich die Elektroporation mit dem NeonTM System zur Transfektion neonataler Fibroblasten grundsätzlich eignet. Dafür wurden Fibroblasten in einem 100 µL Ansatz transfiziert und in Kammerdeckglasgefäßen ausgesät. Als Negativkontrolle diente eine Zellsuspension ohne Plasmid-DNA. Am Folgetag wurden die in Abbildung 45 dargestellten Bilder am CLSM aufgenommen.

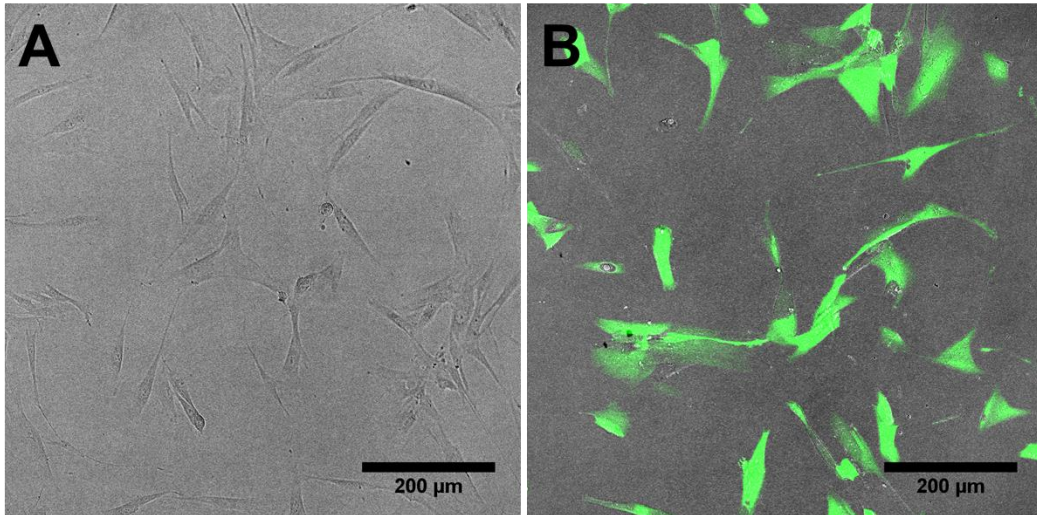


Abbildung 45 – CLSM-Aufnahmen von Fibroblasten nach Elektroporation. HDFneo wurden in einem Verhältnis von $3 \cdot 10^5$ Zellen zu $10 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA in einem $100 \mu\text{L}$ Ansatz mit dem Neon™-System transfiziert und in Kammerdeckglasgefäße ausgesät. Als Negativkontrolle diente eine Zellsuspension ohne Plasmid-DNA. Am Folgetag wurden Aufnahmen am CLSM-Mikroskop angefertigt. **A** Kontrolle ohne Plasmid, **B** mit pEGFP-C1-Plasmid. Maßbalken: $200 \mu\text{m}$.

Abbildung 45 B gibt klar wieder, dass jede Zelle GFP exprimierte, d.h. die Transfektion mit dem pEGFP-C1 Plasmid ist mit einer 100 %-igen Effizienz erfolgt. Die Kontrollzellen hingegen weisen keine Fluoreszenz auf (Teil A in Abbildung 45). Das Neon™ System von Invitrogen ist also prinzipiell zur Transfektion von HDFneo geeignet.

Um zu prüfen, ob das EGFP-Plasmid möglicherweise mittels Lipofektion besser in Fibroblasten eingebracht werden kann, wurden entsprechende Experimente mit Lipofectamine™ 2000 nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die am Folgetag der Lipofektion erhaltenen Fluoreszenzbilder sind in Abbildung 46 wiedergegeben.

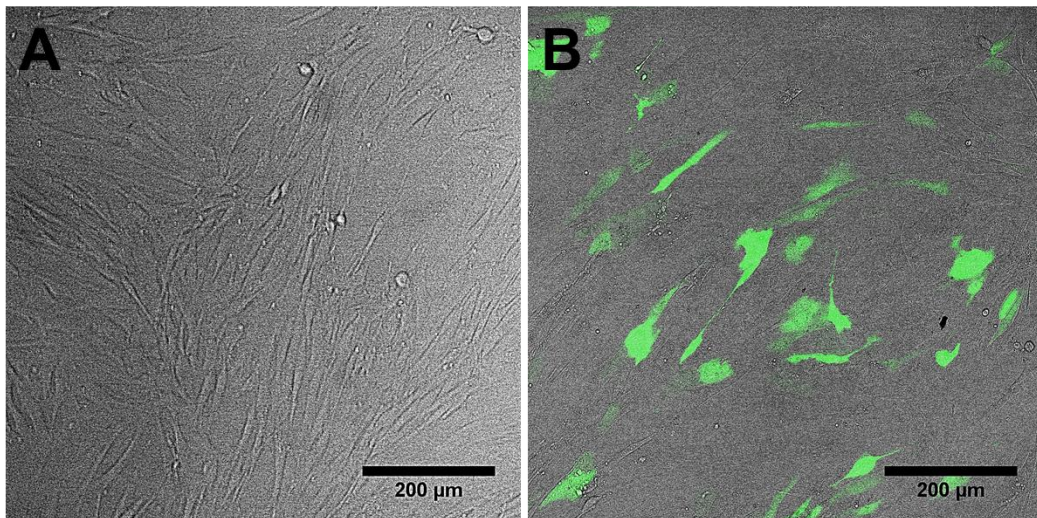


Abbildung 46 - CLSM-Aufnahmen von Fibroblasten nach Lipofektion. **A** Kontrolle ohne Plasmid, **B** mit EGFP-Plasmid: Für B wurde ein Verhältnis von 1 µg DNA zu 2 µL Lipofectamine™ 2000 verwendet. Weitere Details, siehe Text. Maßbalken: 200 µm.

In Abbildung 46 B ist eindeutig zu erkennen, dass die transfizierten Fibroblasten GFP exprimieren (rund 63 % aller Zellen, bestimmt durch Auszählung des Anteils GFP-positiver Zellen an Gesamtzellzahl im Bildausschnitt). Die Transfektion mit dem pEGFP-C1-Plasmid ist also geglückt, so dass auch die Lipofektion zur Transfektion von HDFneo geeignet ist. Die Kontrollzellen (Teil A) weisen dagegen keine erkennbare Fluoreszenz auf. Vergleicht man die Zellen nach Elektroporation und Lipofektion, ist zu erkennen, dass die Fibroblasten in ihrer Form und Morphologie nach der Elektroporation gleichmäßiger aussehen und ein höherer Prozentsatz der Zellen GFP-positiv ist als nach der Lipofektion. Es wurde daher davon ausgegangen, dass die Elektroporation für die Fibroblasten schonender und effizienter ist und daher das Neon™ System für das Einbringen von Plasmid-DNA in Fibroblasten der Lipofektion vorzuziehen war.

Zur Überexpression von markiertem Elastin wurde für humanes TE eine cDNA-Sequenz ausgewählt, wie sie von Zhang et al. [86] für humane Fibroblasten publiziert wurde. Diese Sequenz wurde durch sechs zusätzliche Aminosäuren des Exons 24A ergänzt, die von Fazio et al. [87] beschrieben sind und ebenfalls auf der cDNA von Tropoelastin aus humanen Fibroblasten basiert. Ausgehend von dieser Sequenz standen verschiedene fluoreszente und nicht-fluoreszente Tags für die transiente Überexpression von markiertem Elastin zur Verfügung (siehe 7.12).

HDFneo wurden mit dem EGFP- und dem HA/His/c-Myc-ELN-Plasmid durch Elektroporation (siehe 8.1.6) transfiziert.

Zur Überprüfung der Funktionalität des markierten TE wurden die transfizierten Zellen zusätzlich mit TGF- β 1 kultiviert, um die Faserbildung zu stimulieren. Über Immunmarkierungen (TE/Elastin, HA/His/Myc-*Tag*) oder eigene Fluoreszenz (EGFP) sollte anschließend analysiert werden, ob sowohl für TE als auch für das entsprechende *Tag* faserartige Strukturen kolokalisiert am CLSM nachweisbar sind, so dass von einer Funktionalität des *getaggen* TE, d.h. der Fähigkeit zum Einbau in Elastinfasern ausgegangen werden kann.

Eine Kolokalisation des TE/Elastinsignals und des *Tag*-Signals ist nach Transduktion mit dem HA/His/Myc-Elastin über entsprechende Immunmarkierungen erfolgt und in Abbildung 47 dargestellt. Dafür wurden die transfizierten Zellen nach der Transfektion 14 d mit TGF- β 1 behandelt, mit Methanol-Aceton fixiert und anschließend eine Immunmarkierung mit Primärantikörpern gegen TE/Elastin und das HA-*Tag* durchgeführt.

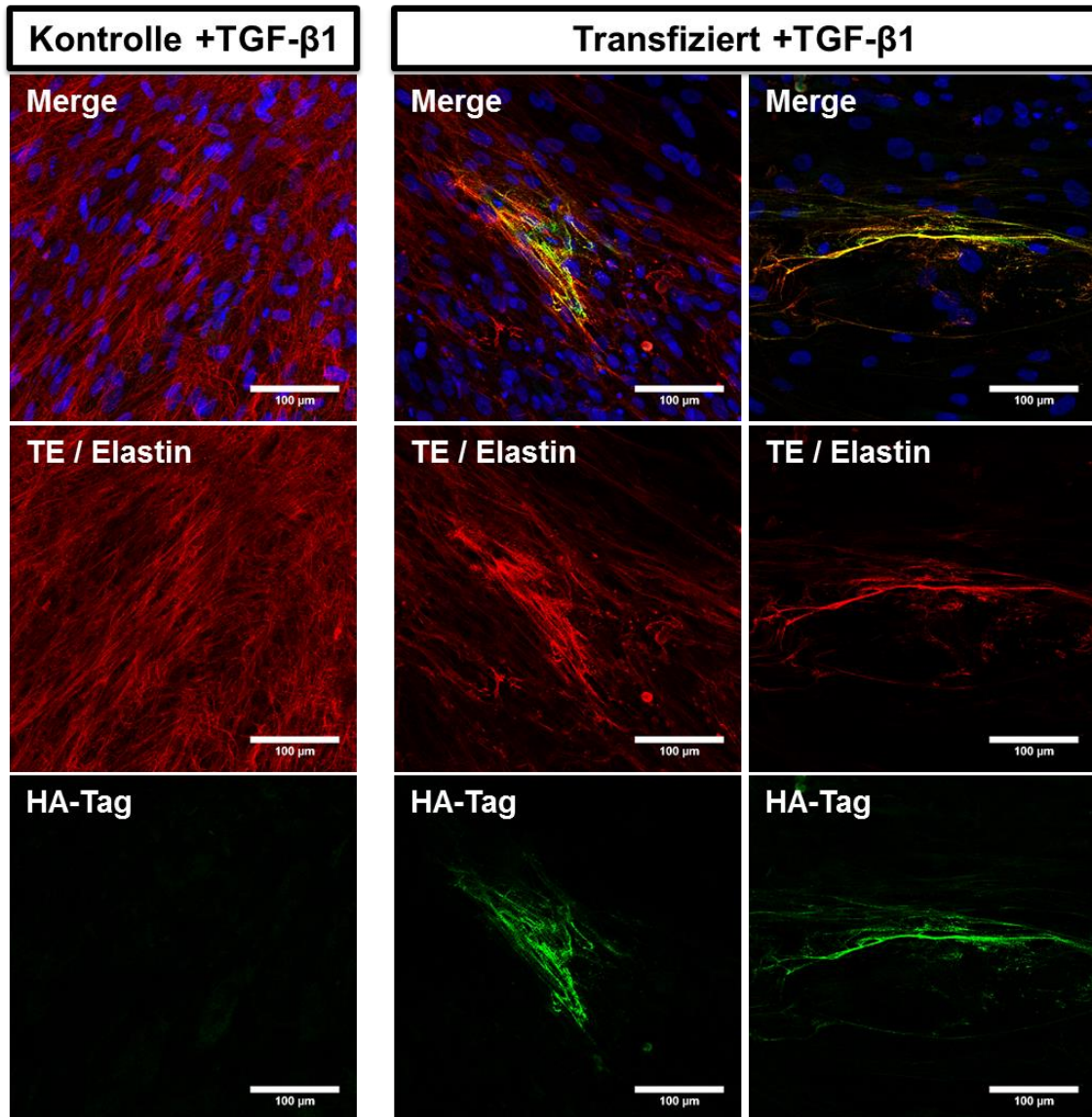


Abbildung 47 – Immunfluoreszenzbilder von untransfizierten (Kontrolle, linke Spalte) und HA/His/Myc-Elastin transfizierten (zweite und dritte Spalte) HDFneos nach 14 d TGF-β1-Behandlung. Die Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert, in LabTeks kultiviert, mit Methanol-Aceton fixiert, immunmarkiert und mit dem CLSM abgebildet. Elastin ist rot (Kaninchen-anti-Elastin 1:200, abcam), das HA-Tag grün (Maus-anti-HA 1:500, Covance) und Zellkerne blau dargestellt. Die obere Reihe zeigt die Überlagerung der Einzelkanäle. Maßbalken: 100 µm.

Sowohl in den transfizierten Zellen als auch in den Kontrollzellen ist nach 14-tägiger Behandlung mit TGF-β1 eine deutliche Bildung von TE/Elastinfasern (rotes Signal) zu erkennen. In den Kontrollzellen ist entsprechend den Erwartungen kein Signal für das HA-Tag erhalten worden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Antikörper gegen das HA-Tag nicht unspezifisch bindet. Hingegen konnte in den transfizierten Zellen (zweite und dritte Spalte in Abbildung 47) das HA-Tag über die Antikörpermarkierung in faserartigen Strukturen (grünes Signal) detektiert werden. Das Signal für das HA-Tag lag nahezu vollständig kolokalisiert mit dem Signal der TE/Elastinfasern vor. Dies ist aus der Überlagerung der Einzelsignale (obere Reihe in

Abbildung 47) zu sehen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die ursprünglich gewählte Elastin-Sequenz funktional ist und von den Fibroblasten im *in vitro* Modell in die Elastinfasern eingebaut werden kann.

Allerdings scheinen die Zellen das markierte Elastin nur in geringen Mengen zu exprimieren, so dass mit Hilfe des fluoreszenten EGFP-*Tags* überprüft wurde, ob die Transfektionseffizienz möglicherweise generell nur sehr niedrig ist. Dafür wurden HDFneos mit dem EGFP-Konstrukt transfiziert, wenige Tage später mehrfach mit PBS gewaschen und unfixiert in PBS am CLSM abgebildet, um mögliche Effekte auf die Fluoreszenz durch Fixierung auszuschließen. Parallel dazu wurde eine untransfizierte Kontrollkultur abgebildet. Abbildung 48 zeigt, dass nicht nur die transfizierten Zellen (A, links), sondern auch die Kontroll-Zellen (B, rechts) eine grüne Fluoreszenz aufwiesen, die sich insbesondere auf intrazelluläre Bereich beschränkt und eher schwach war. Lediglich einzelne Bereich der EGFP-ELN transfizierten HDFneos weisen eine starke grüne Fluoreszenz auf (Pfeil in Abbildung 48), die sich auch im Blick durch das Okular (hier nicht darstellbar) farblich von der eher gelblichen intrazellulären Fluoreszenz der Zelle unterschied.

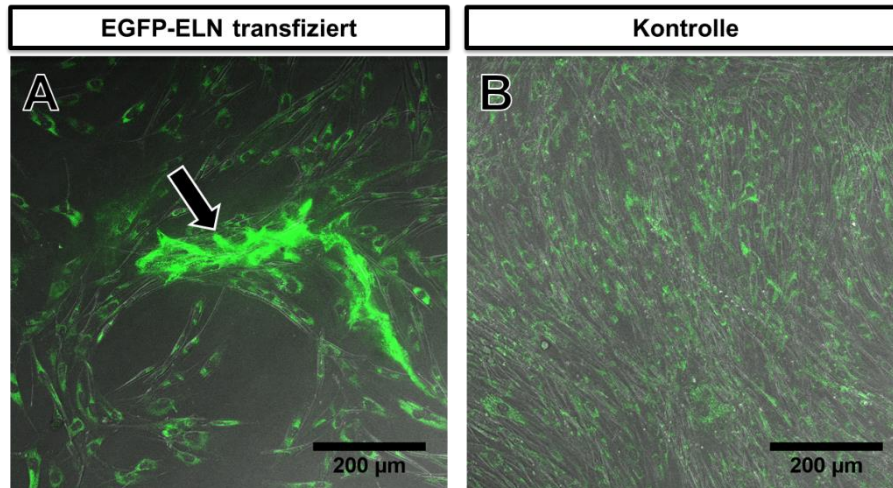


Abbildung 48 – EGFP-ELN-transfizierte und Kontroll-Zellen (HDFneo) im CLSM. Die Zellen wurden durch Elektroporation transfiziert, in LabTeks kultiviert und unfixiert abgebildet. Maßbalken: 200 µm.

Um die Expression des getaggen Elastin-Konstruktes auf Proteinebene zu überprüfen, wurden Proteinlysate von transfizierten HDFneo und Kontrollzellen hergestellt, 50 µg Protein im Western Blot eingesetzt und anschließend mit einem Antikörper gegen GFP (Maus-anti-GFP 1:50) detektiert.

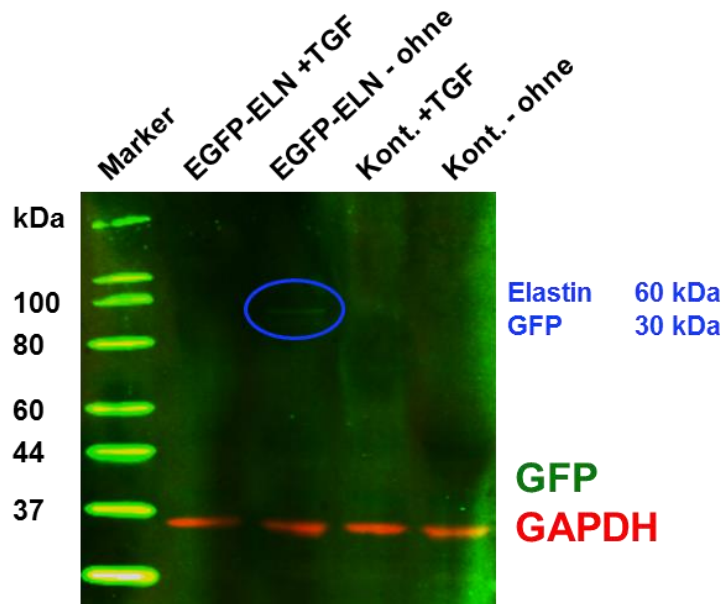


Abbildung 49 - Westernblot: Detektion von GFP in EGFP-ELN transfizierten und untransfizierten Fibroblasten. Fibroblasten wurden mit dem EGFP-ELN-Konstrukt transfiziert, mit (+TGF) und ohne TGF- β (ohne) weiter kultiviert und für Proteinlysate verwendet. Als Kontrolle dienten untransfizierte Fibroblasten. Eingesetzt wurden 50 μ g Protein pro Spur. Detektiert wurde GFP (grün) und als Ladekontrolle GAPDH (rot).

Abbildung 49 zeigt, dass mit dem GFP-Antikörper lediglich in den ohne TGF- β kultivierten transfizierten Zellen eine Bande detektiert werden konnte (blauer Kreis). Diese liegt auf einer Höhe von etwa 90 kDa und entspricht damit der erwarteten Größe des EGFP-Elastin Konstruktes (Elastin ~60 kDa + GFP ~30 kDa). Allerdings ist diese Bande nur sehr schwach und nicht in beiden Proben der transfizierten Zellen erkennbar.

9.2.5 Stabile Expression von Citrin-markiertem Elastin mittels lentiviraler Transduktion

Da die Transduktion durch Elektroporation nicht erfolgreich zu einer gleichmäßigen Transfektion der neonatalen Fibroblasten und deutlichen Überexpression von markiertem Elastin geführt hat, wurde als weitere Methode die Transduktion mit lentiviralen Partikeln zur Einbringung der Fremd-DNA in die Zellen verwendet. Dafür wurde die als funktional eingestufte Tropoelastinsequenz um die Sequenzen für einen Linker, das Fluoreszenzprotein Citrin [106] und für die Subklonierung nötigen Rekombinationsstellen (Sequenz, siehe 15.1) erweitert. Citrin wurde als Fluoreszenzprotein ausgewählt, da seine Eignung für die hochauflösende Fluoreszenz-Mikroskopie bereits in der Literatur beschrieben ist [107]. Die Gensynthese, Subklonierung und abschließende Virusproduktion wurden bei der

Firma Life Technologies (Carlsbad, USA) in Auftrag gegeben (siehe auch 8.1.9). Der erhaltene Virus wurde dann zur Transduktion von Fibroblasten eingesetzt.

In ersten Experimenten wurden neonatale Fibroblasten in LabTek-Gefäßen ausgesät und mit verschiedenen MOIs dem Protokoll der adhärennten Transduktion folgend (siehe 8.1.9) mit Citrin-Elastin-Virus infiziert, zur Stimulation der Faserbildung mit TGF- β 1 weiterkultiviert und die Fluoreszenz am konfokalen Mikroskop dokumentiert. Abbildung 50 zeigt die CLSM-Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion und TGF- β 1-Stimulation. Es ist deutlich zu erkennen, dass Fibroblasten, die mit einer MOI von 1 bzw. 2 transduziert wurden, bereits an Tag 2 nach Transduktion eine im Vergleich zur Kontrolle (MOI 0) eindeutige Fluoreszenz aufwiesen, d.h. die Zellen das gewünschte Citrin-Elastin exprimierten. Zur Überprüfung, wie sich das fluoreszenzmarkierte Elastin in der Faserbildung verhält, wurden die Zellen unter Zugabe von 10 ng/mL TGF- β 1 weiter kultiviert. Nach einer Kulturdauer von insgesamt 14 Tagen war ersichtlich, dass die Fluoreszenz über diesen Zeitraum in den transduzierten HDFneo im Vergleich zur nicht-transduzierten Kontrolle (linke Spalte in Abbildung 50) erhalten geblieben war. Demzufolge wurde Citrin-Elastin nicht nur transient exprimiert, sondern es erfolgte wahrscheinlich der bei lentiviraler Transduktion zu erwartende stabile Einbau der Gensequenz in das Genom der Zellen.

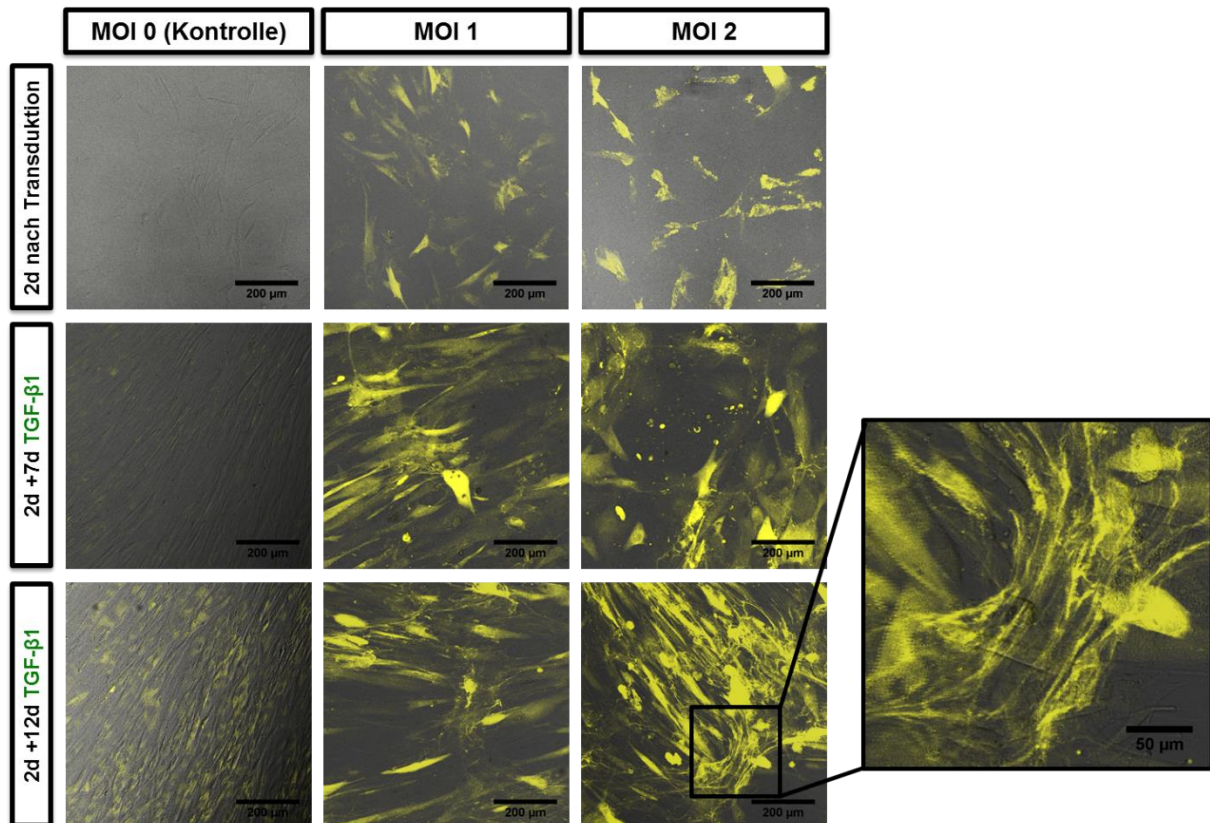


Abbildung 50 - Neonatale Fibroblasten wurden in LabTek-Gefäßen ausgesät und mit verschiedenen MOIs dem Protokoll der adhärennten Transduktion folgend (siehe 8.1.9) mit Citrin-Elastin-Virus infiziert, zur Stimulation der Faserbildung mit 10 ng/mL TGF- β 1 weiterkultiviert und die Fluoreszenz des Citrins mit dem CLSM dokumentiert. Dargestellt sind Überlagerungsbilder aus der Fluoreszenz des Citrins und Durchlicht-Bildern zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transduktion. Maßbalken: 200 μ m bzw. 50 μ m (vergrößerter Ausschnitt rechts).

In einigen Bereichen der TGF- β 1 behandelten Zellen waren nach insgesamt 14 d Kulturdauer erste fluoreszierende faserartige Strukturen detektierbar (vergrößerter Ausschnitt in Abbildung 50), die in der stärkeren Vergrößerung erkennbar auch nicht den Zellen zuzuordnen sind, sondern als extrazelluläre Bestandteile identifiziert werden konnten. Die in der Kontrolle nach 14 d sichtbare leichte Fluoreszenz ist dagegen nur intrazellulär zu finden und daher auf zelluläre Autofluoreszenz zurückzuführen.

17 Tage nach Transduktion der Fibroblasten wurden die Zellen mit Methanol-Aceton fixiert, eine Immunfluoreszenzmarkierung gegen TE/Elastin durchgeführt und CLSM-Aufnahmen zur Detektion von TE/Elastin und Citrin angefertigt, die in Abbildung 51 zusammengestellt sind.

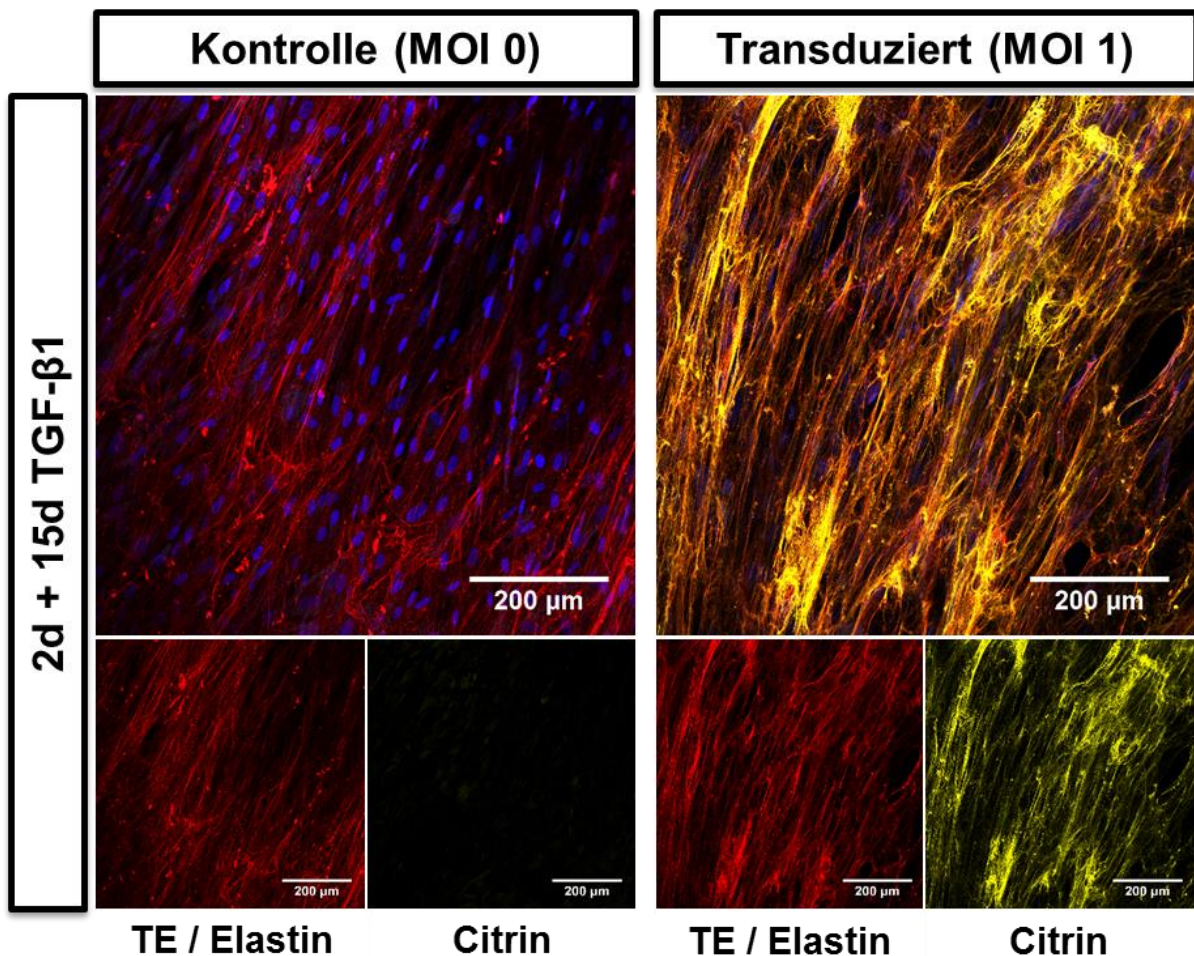


Abbildung 51 - CLSM-Aufnahmen fixierter und immunmarkierter Fibroblasten 17 Tage nach Infektion mit Citrin-ELN tragenden Viruspartikeln (davon 15 Tage mit TGF- β 1-Behandlung). TE/Elastin (Kaninchen-anti-Elastin 1:200, abcam) ist in Rot, das Citrin-Signal in Gelb und Zellkerne in Blau dargestellt. Oberer Reihe: Überlagerung aller drei Einzelkanäle; untere Reihe: Einzelkanäle von TE/Elastin und Citrin. Maßbalken: 200 μ m.

Sowohl in der Kontrolle als auch in den mit MOI 1 transduzierten Zellen war ein faseriges TE/Elastin-Netzwerk entstanden. In den Kontrollen konnte erwartungsgemäß kein Fluoreszenz-Signal im Wellenlängenbereich von Citrin detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigten die transduzierten Zellen (rechte Seite, Abbildung 51) ein starkes Citrin-Signal faserförmiger Strukturen. Die Überlagerung von Antikörpersignal und Citrin-Signal zeigt eindeutig eine Koloalität mit TE/Elastin an. Das bedeutet, dass das Citrin-markierte Elastin im hier gezeigten *in vitro* Modell in die Elastinfasern eingelagert wurde und damit funktional ist.

9.2.6 Genexpressionsanalyse Citrin-ELN-exprimierender HDFneos und Quantifizierung aus Immunfluoreszenzanalysen

Weiterführend wurden Genexpressionsanalysen Citrin-Elastin-exprimierender HDFneos durchgeführt, sowie Expressions-Unterschiede auf Proteinebene semiquantitativ mit Hilfe von Immunfluoreszenzmarkierungen und CLSM-Aufnahmen ermittelt.

Um einen größeren Bestand transduzierter HDFneos zu generieren, wurden HDFneos der Passage 0 dem Protokoll der Suspensions-Transduktion folgend (8.1.9) mit Citrin-ELN-Virus infiziert. 48 h nach der Transduktion wurde das Transduktionsmedium ersetzt durch Selektionsmedium (5 µg/mL Blasticidin S) und die Fibroblasten weiter kultiviert. Selektionierte Zellen wurden subkultiviert und kryokonserviert, wobei eine nicht-transduzierte und nicht-selektionierte Kontrolle parallel mitgeführt wurde. Für die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden Zellen in Passage zwei nach Transduktion genutzt.

Zur Genexpressionsanalyse wurden Citrin-ELN- und Kontrollzellen in einer Dichte von $2 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in einer 6-well Platte ausgesät und ab dem Folgetag mit 10 ng/mL TGF-β₁ stimuliert oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Nach 24 h wurde die Gesamt-RNA isoliert, um die Expressionsniveaus von Elastin, Fibrillin-1 und Citrin zu bestimmen (siehe 8.3.1, 8.3.2 und 8.3.3).

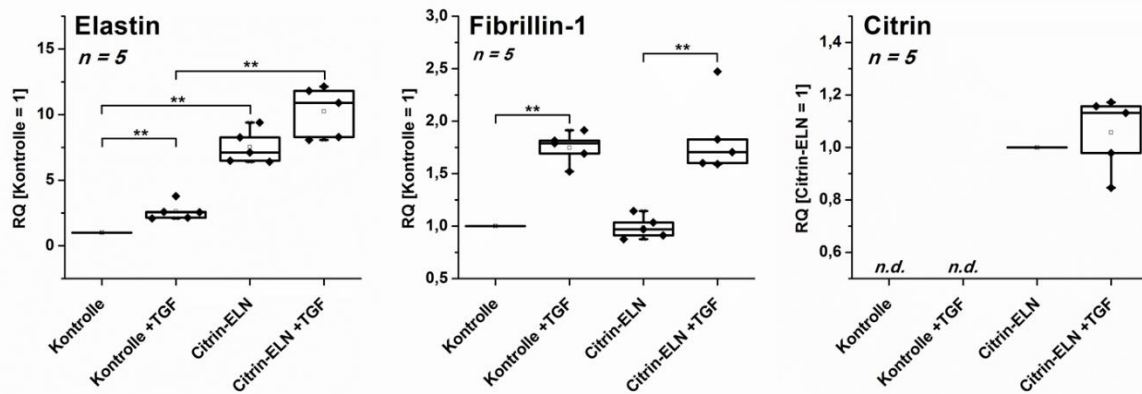


Abbildung 52 – Relative Genexpressionslevel von Elastin, Fibrillin-1 und Citrin in untransduzierten (Kontrolle) und transduzierten (Citrin-ELN) HDFneos, 24 h mit 10 ng/mL TGF- β 1 (+TGF) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Expressionslevel wurden normalisiert gegen 18S rRNA und sind dargestellt als Abweichung (RQ) relativ zur untransduzierten Kontrolle bzw. Citrin-ELN ohne TGF- β 1-Stimulation. Ergebnisse sind gezeigt als Median aus 5 Experimenten. n.d.: nicht detektierbar. ** $p < 0.01$, Mann-Whitney Test.

Abbildung 52 zeigt die relativen mRNA Level von Elastin, Fibrillin-1 und Citrin als relative Abweichung im Median von fünf Experimenten. Die relative Abweichung (RQ) wurde berechnet aus den normalisierten Expressionsniveaus, wobei die unbehandelte nicht-transduzierte Kontrolle bzw. für Citrin die unbehandelten transduzierten Zellen als Referenz dienten (=100 %). In untransduzierten Fibroblasten führte die 24-stündige Inkubation mit TGF- β 1 im Median zu einer signifikanten 2,56-fachen Induktion von Elastin mRNA Level. Die Citrin-ELN transduzierten Zellen zeigten auch ohne Stimulation eine im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle signifikante 7,12-fache Induktion der Elastinlevel, die durch Stimulation mit TGF- β 1 nicht-signifikant auf 10,9-fach gesteigert wurde, aber signifikant erhöht war im Vergleich zur unbehandelten untransduzierten Kontrolle. Das Expressionslevel von Fibrillin-1 war in den transduzierten Fibroblasten im Vergleich zur untransduzierten Kontrolle nicht erhöht. Allerdings wurde Fibrillin-1 durch TGF- β 1 in beiden Zelltypen ähnlich stark induziert (untransduziert 1,79-fach, transduziert 1,71-fach). Die TaqManTM-Sonde für Citrin detektierte in den untransduzierten Zellen keine Transkripte, wohingegen in den transduzierten Fibroblasten ein deutliches Citrin-Level bestimmt werden konnte, dass sich auch durch Inkubation mit TGF- β 1 nicht signifikant änderte.

Um zu überprüfen, ob das fluoreszenzmarkierte Elastin auch auf Proteinebene exprimiert wird, wurden Citrin-ELN exprimierende HDFneo ausgesät, drei Tage mit

und ohne TGF- β 1 kultiviert und anschließend entsprechende Proteinlysate im Westernblot zur Immundetektion von Elastin eingesetzt.

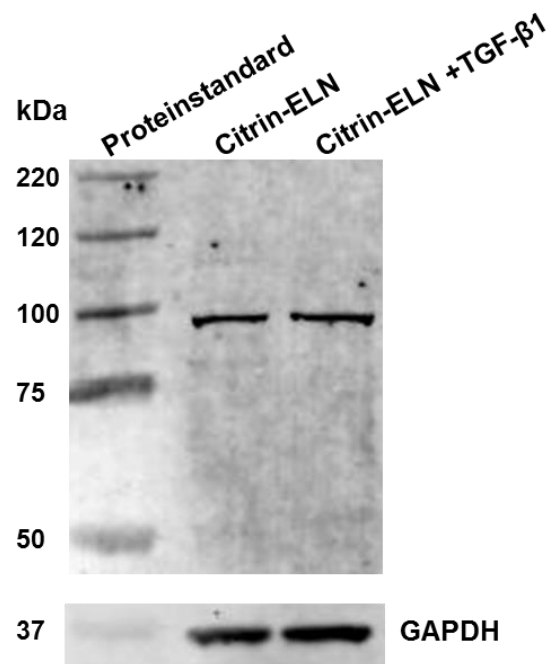


Abbildung 53 – Immundetektion von TE/Elastin in Proteinlysaten Citrin-ELN transduzierter HDFneo. 20.000 Zellen/cm² wurden in Zellkulturgefäßen ausgesät, ab dem Folgetag für drei Tage mit und ohne 10 ng/mL TGF β 1 kultiviert. Von den erhaltenen Proteinlysaten wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein pro Spur in der SDS-PAGE aufgetragen. Nach dem Westernblot wurde TE/Elastin (abcam, 1:200) und als Ladekontrolle GAPDH (Santa Cruz, 1:200) detektiert.

Endogenes humanes Tropoelastin hat nach posttranslationaler Modifikation in etwa eine Größe von mindestens 60 kDa [37]. Das Fluoreszenzprotein Citrin weist eine Größe von ungefähr 27 kDa auf. Das durch Transduktion in den HDFneo exprimierte Fusionsprotein Citrin-ELN müsste demnach im Westernblot eine Bande bei 90 kDa ergeben. Der TE/Elastin-Antikörper erkennt in den Proteinlysaten transduzierter HDFneo eine sehr deutlich Bande knapp unter 100 kDa bei etwa 90 kDa (Abbildung 53) und weist somit die zu erwartende Größe des Fusionsproteins auf. Eine Bande für das 60 kDa große endogene TE/Elastin ist nicht zu erkennen.

Um die Fähigkeit zur Faserbildung zu untersuchen, wurden aus dem Pool nicht-transduzierter und Citrin-ELN-transduzierte HDFneo außerdem $2 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in LabTek-Gefäßen ausgesät und ab dem Folgetag mit 10 ng/mL TGF- β 1 stimuliert oder als Kontrolle unbehandelt gelassen und für weitere 14 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Proben mit Methanol-Aceton fixiert, Immunmarkierungen auf TE/Elastin und Fibrillin-1 durchgeführt und entsprechende Fluoreszenzaufnahmen am CLSM angefertigt, die in Abbildung 54 dargestellt sind.

Grundsätzlich sind innerhalb einer Bedingung lokale Unterschiede in der Ausprägung der Fasernetzwerke zu erkennen. Vergleichende Betrachtungen gelten daher dem Gesamteindruck der ganzen Mosaikaufnahme. Nach 14 Tagen war unter allen vier Bedingungen ein Netzwerk aus Fibrillin-1-Fasern erkennbar, wobei (trotz lokaler Unterschiede) im Gesamteindruck keine Unterschiede bezüglich Transduktion oder TGF- β 1-Stimulation zu erkennen waren. TE/Elastin war über die Immunmarkierung in den unbehandelten untransduzierten Zellen nicht detektierbar, zeigte jedoch ein schwaches Signal in den TGF- β 1 stimulierten Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten die transduzierten Zellen sowohl mit als auch ohne TGF- β 1 Behandlung ein kräftiges TE/Elastin-Signal in der Immunmarkierung, das in Bezug auf abgelagerte Menge und Organisation des Fasernetzwerkes ähnlich erschien. Dies zeigt sehr eindeutig, dass die bloße Überexpression von Elastin in neonatalen dermalen Fibroblasten ausreichend war, um *in vitro* extrazellulär abgelagerte Elastinfasern zu generieren. Ein Signal für das Fluoreszenzprotein Citrin war nur in den transduzierten Fibroblasten sichtbar, wobei die TGF- β 1-Behandlung die abgelagerte Menge an Citrin zu erhöhen schien. Unter beiden Bedingungen aber zeigte sich Citrin als fibrillär organisierte Struktur, die kolokalisiert mit dem TE/Elastin-Netzwerk vorliegt. Auch hier bestätigt sich daher die Funktionalität des Citrin-markierten Elastins bezüglich der Fähigkeit des Einbaus in die Faser.

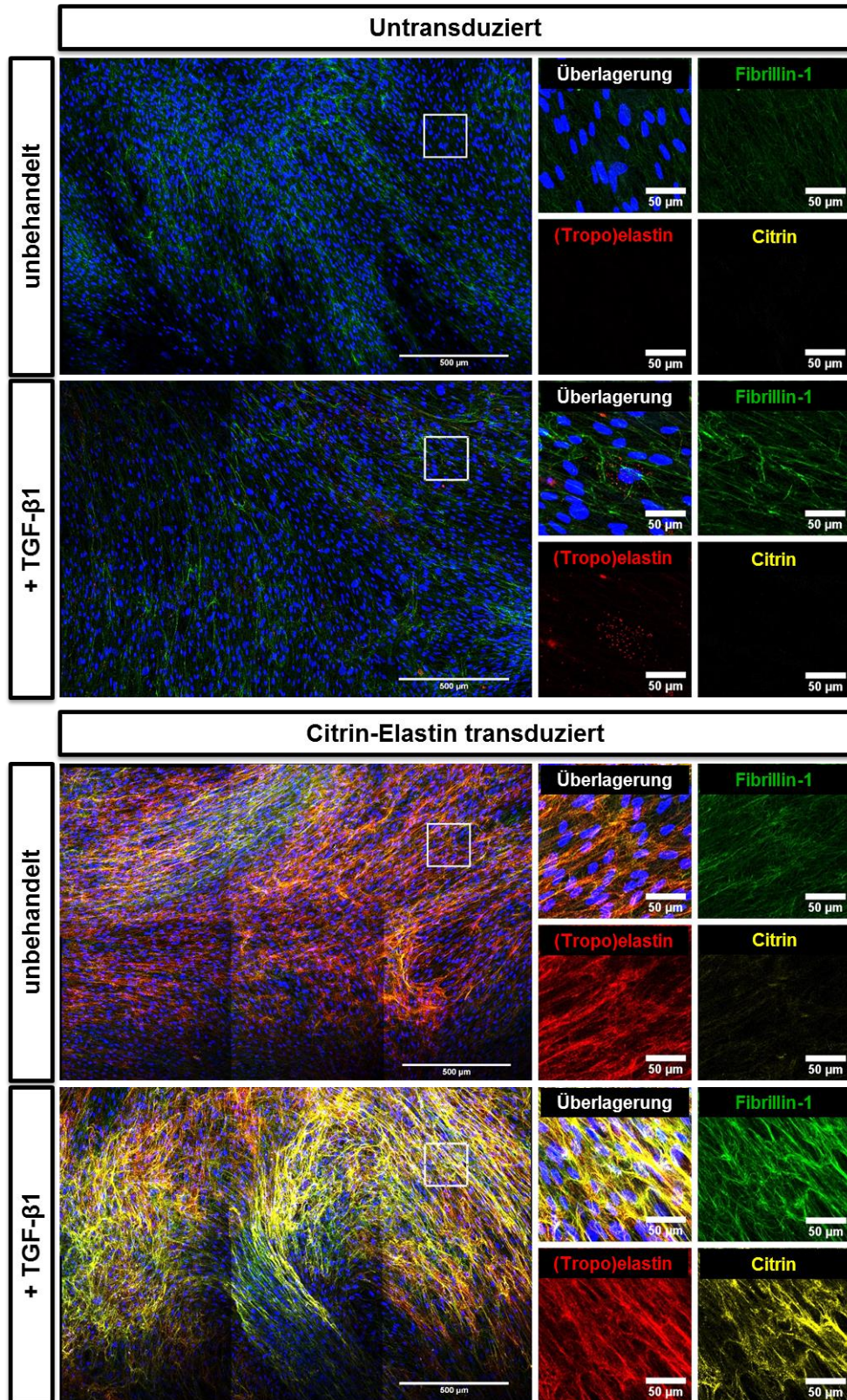


Abbildung 54 – Überexpression von fluoreszenzmarkiertem Elastin im in vitro Zellkulturmodell. Untransduzierte (obere Hälfte) und Citrin-ELN transduzierte (untere Hälfte) HDFneo wurden mit 10 ng/mL TGF-β1 stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen. Immunmarkierung mit anti-human Fibrillin-1 (grün), anti-human TE/Elastin (rot); Zellkerne markiert mit DAPI (blau); Citrin ist in Gelb dargestellt. Wiedergegeben sind repräsentative Mosaik-Bilder aus drei experimentellen Set-Ups als Maximalprojektion (großes Bild, Überlagerung aller Aufnahmekanäle). Kleine Bilder: Vergrößerte Struktur aus markiertem Bereich. Maßbalken: 500 μm bzw. 50 μm.

Die in Abbildung 54 visuell erfassbaren Unterschiede der Menge abgelagerten Proteins wurden mit Hilfe der Software ImageJ als relative Signal-Abdeckung für die Einzelkanäle quantifiziert. Die erhaltenen Werte aus drei experimentellen Ansätzen wurden pro Ansatz relativiert zu den Werten der transduzierten und TGF- β 1 behandelten Probe und sind zusammengefasst in Abbildung 55 dargestellt.

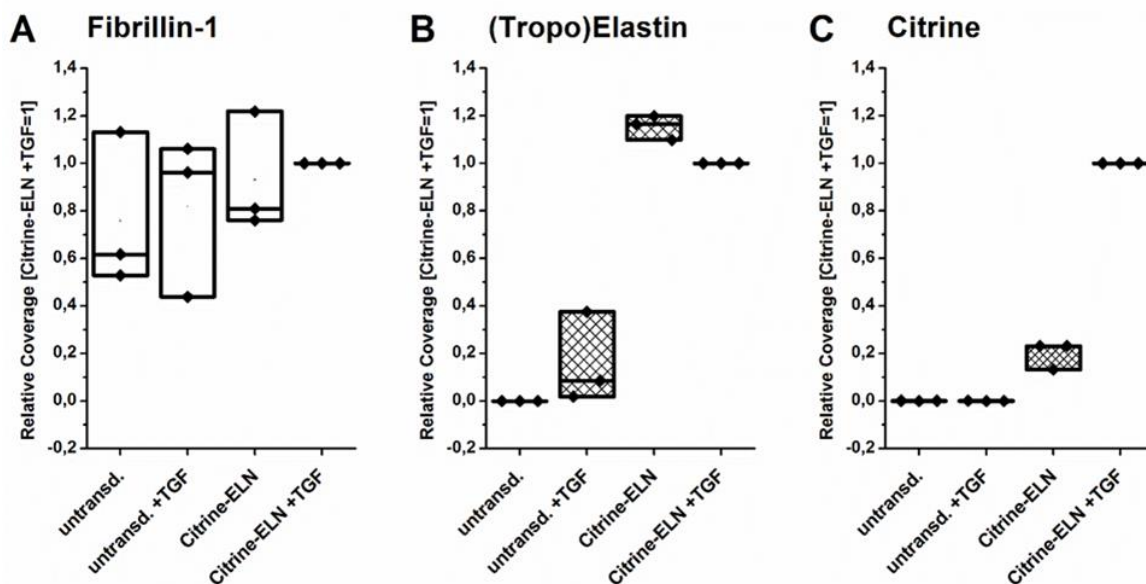


Abbildung 55 – Bildanalyse von immunmarkierten MEF-Modellen untransduzierter und Citrin-ELN transduzierter HDFneo, basierend auf den Einzelkanalbildern des gesamten Mosaiks in Abbildung 54. Mit Hilfe von ImageJ wurde ein Wert für die relative Signal-Abdeckung der Kanäle für Fibrillin-1, Tropoelastin/Elastin und Citrin ermittelt und relativiert gegen die Probe der transduzierten TGF- β 1 stimulierten Zellen. Die erhaltenen Werte aus drei Versuchsansätzen sind für Fibrillin-1 (A), Tropoelastin/Elastin (B) und Citrin (C) in Box Plots dargestellt. (ausführliche Details zur Bildanalyse, siehe 8.2.10). n=3. Mann-Whitney Test: keine Signifikanzen.

Die relative Signalabdeckung für Fibrillin-1 fluktuierte über einen breiten Bereich und erscheint unabhängig von der TGF- β 1 Behandlung oder Transduktion mit Citrin-Elastin zu sein. Allerdings war in beiden Zelltypen im Median ein Trend zu niedrigeren Werten bei fehlender Stimulation mit TGF- β 1 zu erkennen (im Median: untransduziert 0,62 relative Signalabdeckung; untransduziert +TGF: 0,96; Citrin-ELN:0,81; Citrin-ELN+TGF: 1,00). Die Trends spiegeln die Ergebnisse der Genexpressionsdaten (Abbildung 52) wieder und bestätigen, dass Fibrillin-1 als wichtige Faserkomponente trotz der Überexpression von Elastin nicht beeinflusst war, sondern erwartungsgemäß auf den TGF- β Stimulus reagierte. Eine Flächenbelegung für TE/Elastin war bei den untransduzierten Zellen mit der hier angewandten Analyse nahezu nicht detektierbar. Sie lag ohne TGF β Behandlung bei 0 und mit Behandlung bei 0,09. Die relative Flächenbelegung für TE/Elastin war

in den Citrin-ELN exprimierenden Fibroblasten im Verhältnis zu den untransduzierten Zellen dagegen bei 100 % und höher. Sie lag ohne TGF- β 1 Stimulation im Median bei 1,17 und mit TGF- β 1 bei 1. Die deutliche Überexpression von Elastin war also auch auf Proteinebene messbar, obwohl mittels Mann-Whitney Test keine Signifikanzen für die gemessenen Unterschiede festgestellt werden konnten.

9.2.7 Citrin-ELN-Überexpression in HDFneo und Fibroblasten alter Spender

Die stabile Überexpression von Citrin-Elastin in neonatalen humanen dermalen Fibroblasten hat in der Immunfluoreszenz nach 14-tägiger Kulturdauer gezeigt, dass auch ohne einen weiteren Stimulus wie TGF- β 1 eine Ablagerung von Elastin zu extrazellulären Fasern stattfindet. Da neonatale und junge Fibroblasten aber generell eine höhere Fähigkeit zur Elastogenese aufweisen als die Zellen alter Spender [36, 108–110], wurden in weiterführenden Experimenten Fibroblasten verschiedener weiblicher alter Spender (75 Jahre, Lid; 79 J., Brust; 79 Oberarm; intern bei Beiersdorf aus Haut isoliert) mit dem Citrin-ELN-Konstrukt transduziert. Die Transduktion erfolgte für die Vergleichbarkeit parallel zu einem Ansatz mit neonatalen Fibroblasten im Suspensionsansatz mit einer MOI von 4 (Citrin-ELN) bzw. ohne Virus (untransduziert). Die transduzierten Zellen wurden mehrere Tage in Selektionsmedium kultiviert und anschließend parallel mit den untransduzierten Zellen in LabTek-Gefäße gesät. Nach 14-tägiger Kulturdauer ohne und mit 10 ng/mL TGF- β 1 wurden alle Zellen fixiert und eine Immunmarkierung auf TE/Elastin und Fibrillin-1 durchgeführt. Am CLSM wurden schließlich Fluoreszenzaufnahmen als einfache Schnitte aufgenommen, wobei die Einstellungen für die neonatalen transduzierten und TGF- β 1 optimiert und für alle weiteren Aufnahmen konstant gehalten wurden. Entsprechende Aufnahmen sind in Abbildung 56 bis Abbildung 58 wiedergegeben.

Die Immunmarkierung der HDFneos stellte sich hier (siehe Abbildung 56) im Wesentlichen analog zu den vorangegangenen Experimenten dar, wie sie in Abbildung 54 veranschaulicht sind. Ein Citrin-Signal war nur in den transduzierten Zellen messbar, wobei TGF- β 1 zu einer vermehrten extrazellulären Ablagerung des Citrins führte. Das Mikrofibrillen-Gerüst (Fibrillin-1) zeigte sich als feine filamentöse gerichtete Struktur, die unabhängig von TGF- β 1-Behandlung oder Transduktion unverändert blieb. Das Signal für TE/Elastin war in den unbehandelten und untransduzierten HDFneo am schwächsten und verstärkte sich leicht durch TGF- β 1

Stimulation. Die Citrin-ELN transduzierten HDFneo hingegen bildeten auch ohne zusätzliche Stimulation ein TE/Elastin-Netzwerk, dass durch Stimulation nicht merklich verstärkt wurde.

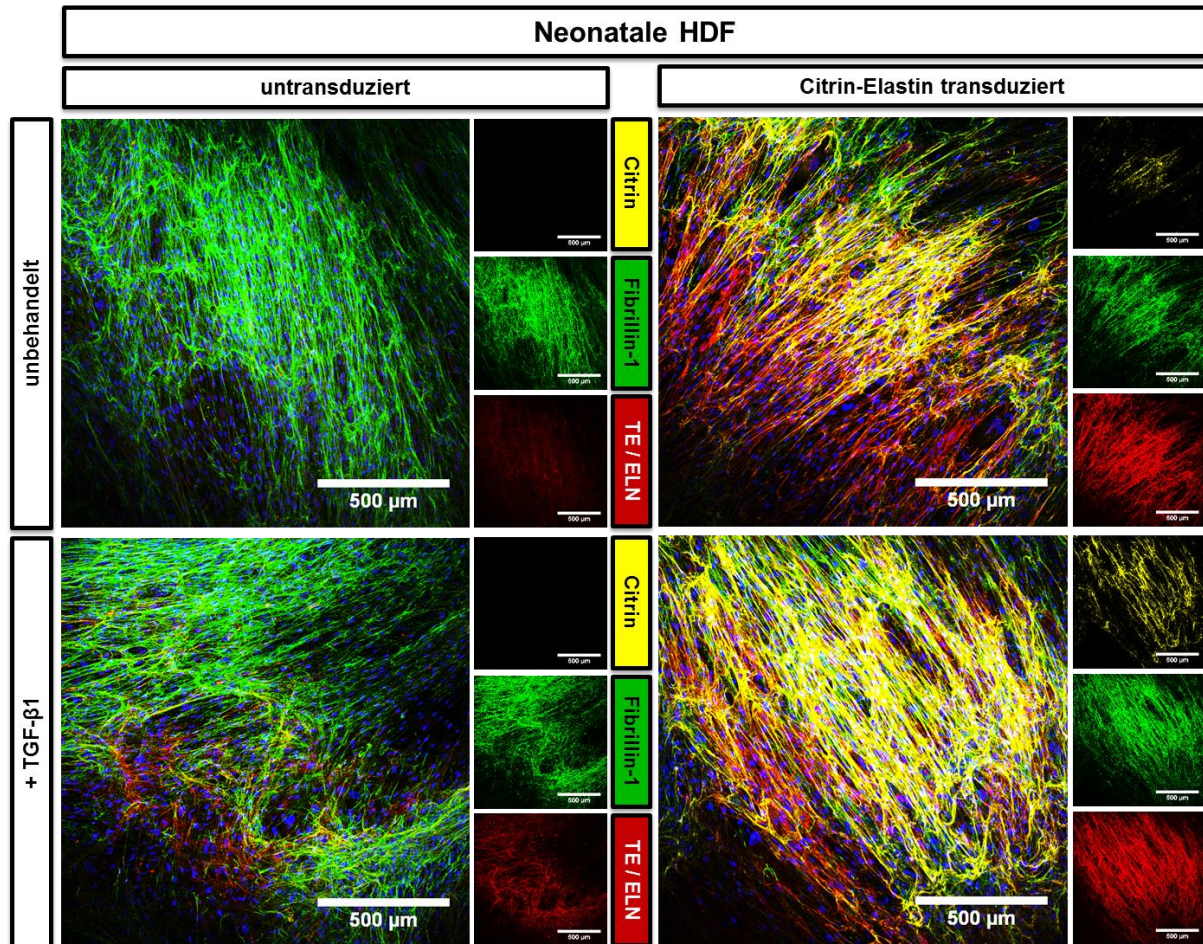


Abbildung 56 - Überexpression von fluoreszenzmarkiertem Elastin im in vitro Zellkulturmodell. Untransduzierte (linke Spalte) und Citrin-ELN transduzierte (rechte Spalte) HDFneo wurden mit 10 ng/mL TGF- β 1 stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen. Immunmarkierung mit anti-human Fibrillin-1 (grün), anti-human TE/Elastin (rot); Zellkerne markiert mit DAPI (in der Überlagerung); Citrin ist in Gelb dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei CLSM-Aufnahmen pro Bedingung. Kleine Bilder: Einzelkanäle; große Bilder: Überlagerung der entsprechenden vier Einzelkanäle. Maßbalken: 500 μ m.

Die Fluoreszenzaufnahmen der zu den HDFneos parallel transduzierten und kultivierten adulten Fibroblasten (Abbildung 57 und Abbildung 58) zeigten ein deutlich anderes Bild. Auffällig war, dass in den betrachteten Proben und Bedingungen kein oder nur ein sehr schwaches Citrin-Elastin Signal messbar war, was möglicherweise durch eine begrenzte Expression des Citrin-Elastins durch ineffiziente Transduktion verursacht wurde. Bei Betrachtung des TE/Elastin-Signals fiel zunächst auf, dass auch bei den adulten untransduzierten Fibroblasten durch Inkubation mit TGF- β 1 deutlich mehr extrazellulär abgelagerte Elastinfasern

detektiert werden konnten (obere Reihe). Die transduzierten adulten Fibroblasten wiesen nach 14-tägiger Kultivierung auch ohne weitere Stimulation ein prägnantes Netzwerk von TE/Elastin-Fasern auf, das durch TGF- β 1 keine konkrete Veränderung erfuhr. Unter allen vier verschiedenen Bedingungen waren bei beiden hier dargestellten Spendern ebenso faserige Strukturen von Fibrillin-1 vorhanden, die kolokal mit TE/Elastin vorlagen. Die Mikrofibrillen lagen hier allerdings im Vergleich zu den Proben der neonatalen Fibroblasten sehr viel weniger gerichtet vor und wirkten eher deformiert. Statt feiner gleichmäßiger Fasern fanden sich hier vielmehr verdickte und gewundene Strukturen, ohne eine eindeutige Orientierung. Das abgelagerte TE/Elastin wies ebenfalls keine homogen orientierte Morphologie auf, sondern bildete in gleicher Weise verdickte und verkrümmte Strukturen, unabhängig von TGF- β 1-Behandlung oder Transduktion.

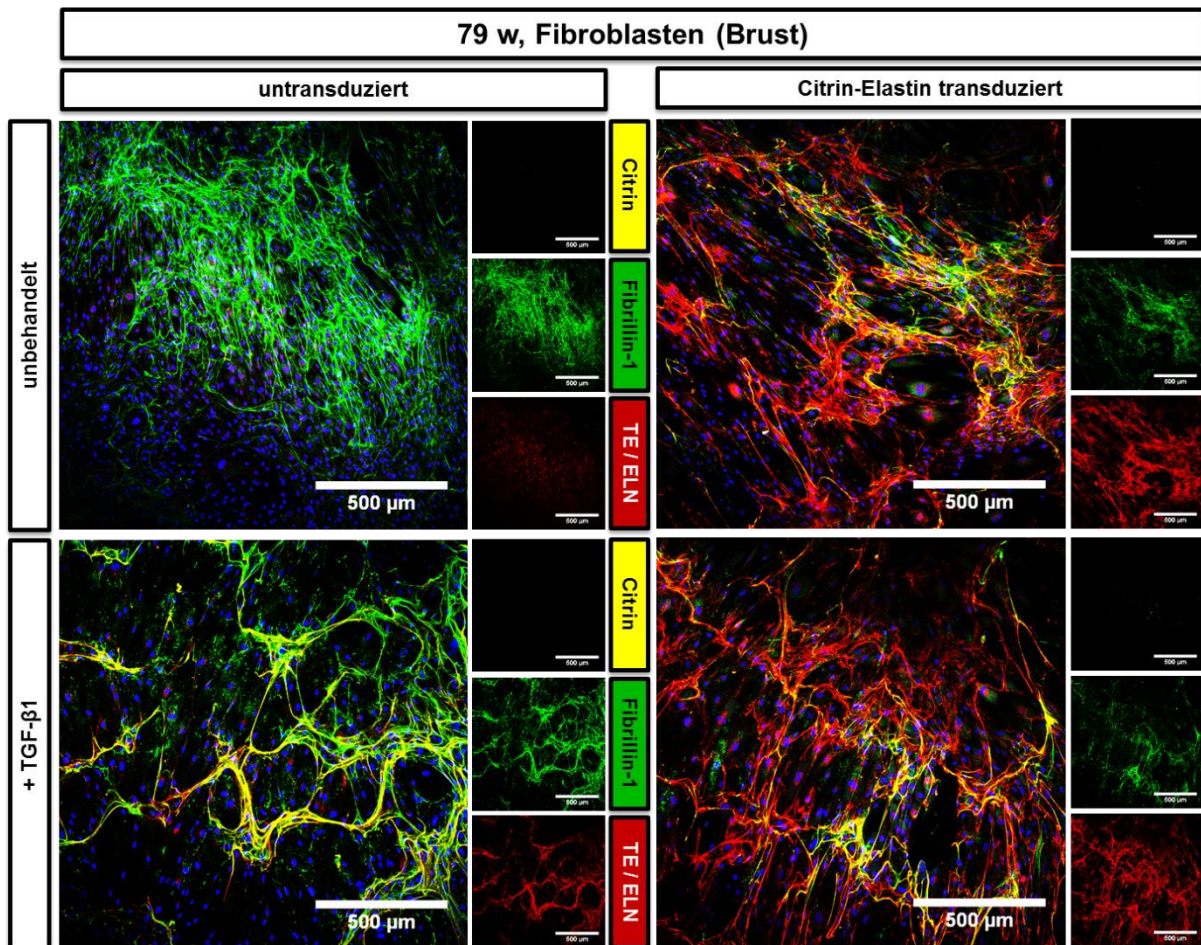


Abbildung 57 - Überexpression von fluoreszenzmarkiertem Elastin im in vitro Zellkulturmodell. Untransduzierte (linke Spalte) und Citrin-ELN transduzierte (rechte Spalte) adulte Fibroblasten (Brust, 79, weiblich) wurden mit 10 ng/mL TGF-β1 stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen. Immunmarkierung mit anti-human Fibrillin-1 (grün), anti-human Tropoelastin/Elastin (rot); Zellkerne markiert mit DAPI (in der Überlagerung); Citrin ist in Gelb dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei CLSM-Aufnahmen pro Bedingung. Kleine Bilder: Einzelkanäle; große Bilder: Überlagerung der entsprechenden vier Einzelkanäle. Maßbalken: 500 µm.

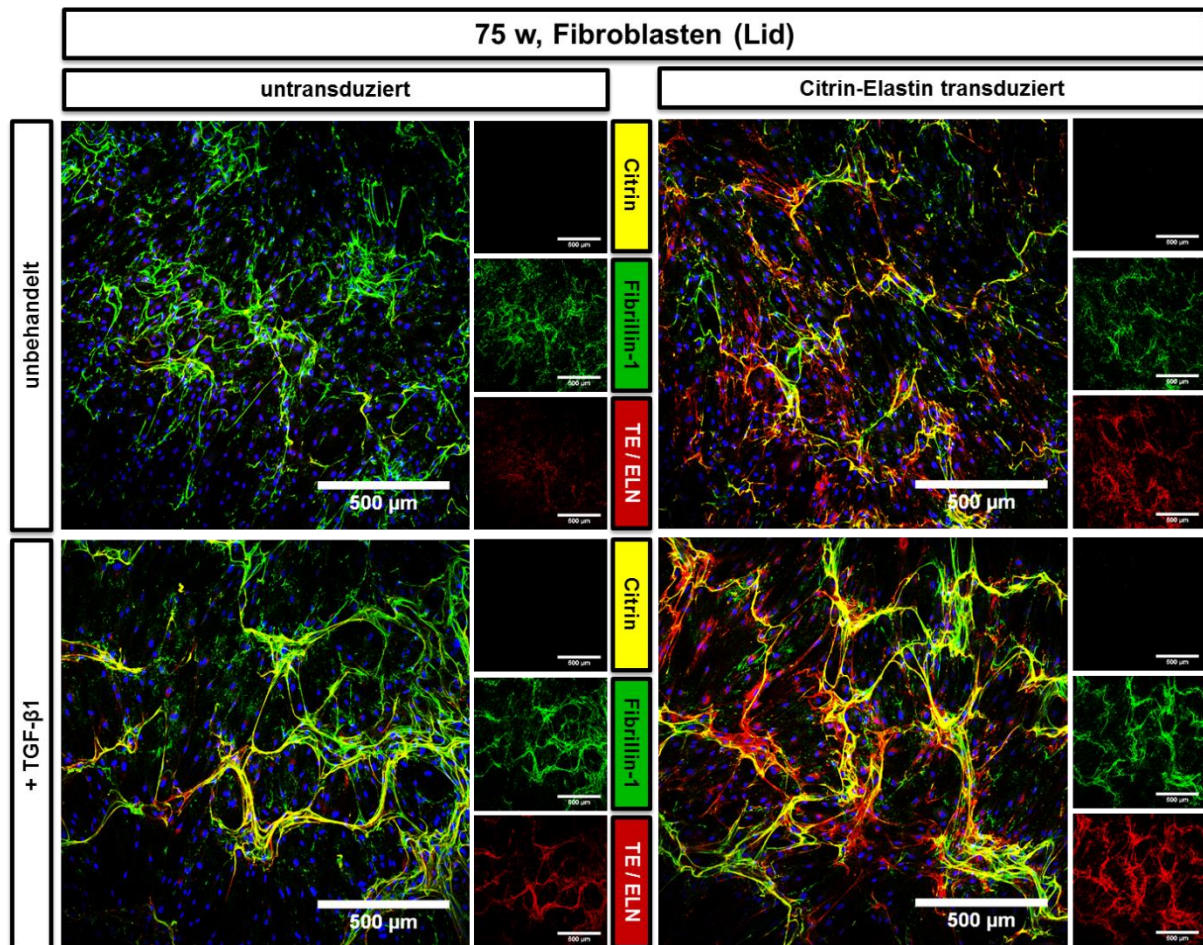


Abbildung 58 - Überexpression von fluoreszenzmarkiertem Elastin im in vitro Zellkulturmodell. Untransduzierte (linke Spalte) und Citrin-ELN transduzierte (rechte Spalte) adulte Fibroblasten (Lid, 75, weiblich) wurden mit 10 ng/mL TGF- β 1 stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt gelassen. Immunmarkierung mit anti-human Fibrillin-1 (grün), anti-human Tropoelastin/Elastin (rot); Zellkerne markiert mit DAPI (in der Überlagerung); Citrin ist in Gelb dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus drei CLSM-Aufnahmen pro Bedingung. Kleine Bilder: Einzelkanäle; große Bilder: Überlagerung der entsprechenden vier Einzelkanäle. Maßbalken: 500 μ m.

Da in den adulten Fibroblasten in der Immunfluoreszenz kein Signal für Citrin erfasst werden konnte, wurden entsprechende Genexpressionsanalysen durchgeführt, um außerdem das grundsätzliche Expressionsniveau von Fibrillin-1, Elastin und Citrin zu bestimmen. Die relativen mRNA-Expressionslevel sind in Abbildung 59 dargestellt.

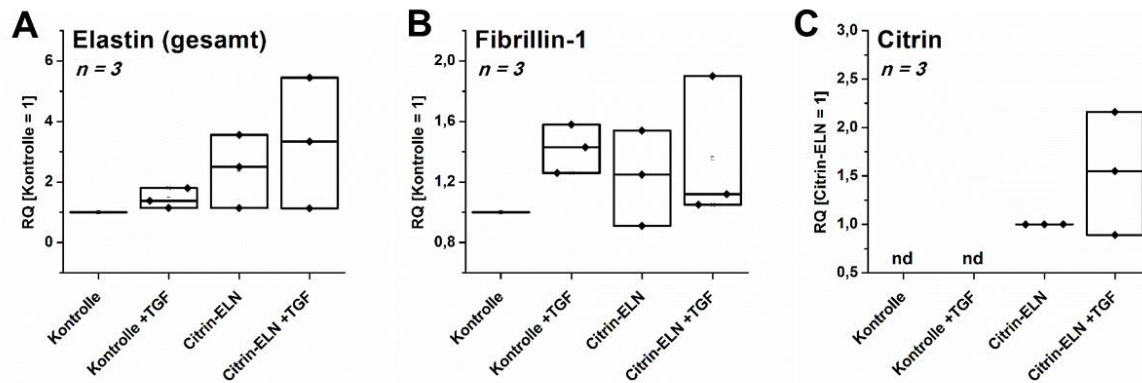


Abbildung 59 - Relative Genexpressionslevel von Elastin, Fibrillin 1 und Citrin in adulten Fibroblasten. Dafür wurden die nicht-transduzierten und transduzierten adulten Fibroblasten (75 w. Lid; 79 w Brust; 79 w Oberarm) in einer Dichte von 20.000 Zellen/cm² in einer 12 well Platte ausgesät, ab dem Folgetag mit 10 ng/mL TGF β 1 stimuliert oder zur Kontrolle unbehandelt belassen und nach drei Tagen die RNA mit 300 μ L Lyse-Puffer isoliert. Nachfolgend wurden cDNA-Synthese und TaqMan®-Real-Time-PCR durchgeführt. Expressionslevel wurden normalisiert gegen 18S rRNA und sind dargestellt als Abweichung (RQ) relativ zur untransduzierten Kontrolle bzw. Citrin-ELN ohne TGF- β 1-Stimulation. Ergebnisse sind gezeigt als Median aus den drei Spendern.

Grundsätzlich war für alle hier analysierten Gene eine recht große Schwankungsbreite messbar, so dass bei Zusammenfassung der Werte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen zu finden waren. Dafür war vermutlich insbesondere die Variabilität zwischen den Spendern und auch Arealen, aus denen die Fibroblasten isoliert worden sind, verantwortlich. Nichtsdestotrotz ließen sich die gleichen Trends ablesen, wie sie auch schon in den neonatalen Fibroblasten gemessen wurden (siehe Abbildung 52). Auch in den adulten untransduzierten Fibroblasten wurde die Expression von Elastin durch TGF- β 1 induziert. Die Transduktion mit Citrin-ELN induzierte eine deutliche Überexpression von Elastin, die durch Stimulation mit TGF- β 1 nicht wesentlich gesteigert wurde. Diese Trends fanden sich auch auf Proteinebene in den Immunfluoreszenzmarkierungen wieder. Die Expression von Fibrillin-1 in den adulten Fibroblasten wurde sowohl durch TGF- β 1 als auch durch Transduktion mit Citrin-ELN nur unwesentlich beeinflusst, was sich auf Proteinebene auch aus den Fluoreszenzbildern in Abbildung 57 und Abbildung 58 ergab. Obwohl Citrin als Protein in den Fluoreszenzaufnahmen nahezu nicht messbar war, war es auf mRNA-Ebene in den transduzierten Zellen sehr deutlich zu detektieren. Die gleiche Sonde konnte in den untransduzierten Fibroblasten erwartungsgemäß keine Transkripte detektieren.

9.2.8 Etablierung der GSD-Mikroskopie

Mit Hilfe der hochauflösenden GSD-Mikroskopie wurde die Feinstruktur des Citrin-markierten Fasernetzwerks in HDFneo untersucht.

In ersten, die Technik etablierenden, Experimenten wurden untransduzierte HDFneo-Zellen auf runden Deckgläschen ausgesät, unter Standard-Bedingungen kultiviert, mit Methanol-Aceton fixiert, immunmarkiert und auf einem Muldenobjektträger eingebettet (siehe 8.2.3). Um einen ersten Eindruck der GSD-Mikroskopie im Vergleich zur CLSM-Mikroskopie zu erhalten, wurden hier feine faserige Strukturen innerhalb der Zelle mit einem alpha-Tubulin Antikörper (abcam, #ab7291, Verdünnung 1:1000) markiert. Die am GSD-Mikroskop erhaltenen Aufnahmen sind in Abbildung 60 dargestellt.

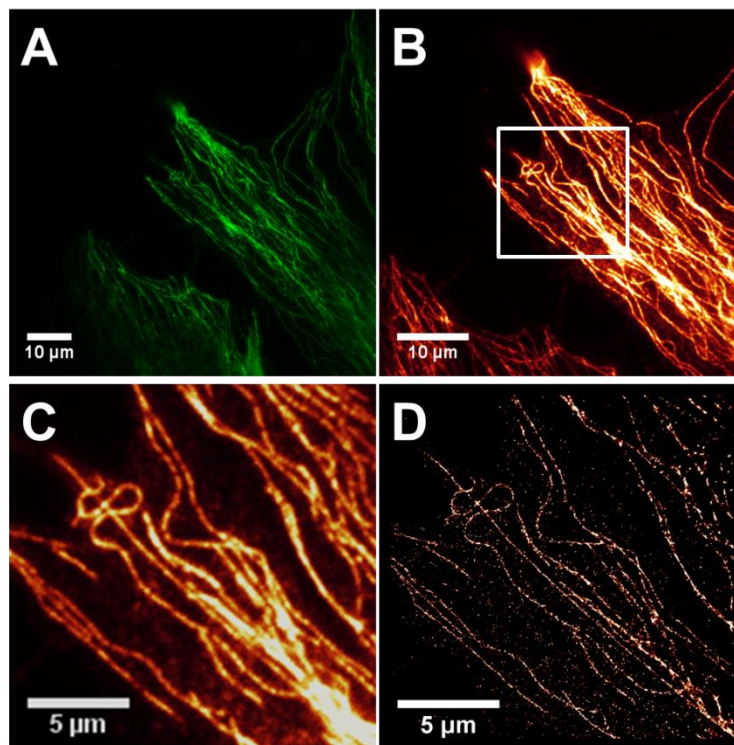


Abbildung 60 – Auf Deckgläsern gewachsene HDFneo-Zellen (mit alpha-Tubulin-Antikörper markiert) im GSDIM-Mikroskop: A Fluoreszenzaufnahme des interessierenden Bereichs. B Aufnahme des vorherigen Ausschnitts mit Laseranregung. C *Region of Interest* (ROI) aus Bild B. D GSD Eventlist des ROI. Weitere Details siehe Text. Maßbalken: 10 µm (A, B) bzw. 5 µm (C, D).

Um zunächst einen interessierenden Bereich auszuwählen, kann die Probe mit Hilfe einer Fluoreszenzlampe angeregt und durch das Okular betrachtet werden (Abbildung 60, Teil A). In einem nächsten Schritt wird auf Anregung mit Laserlicht umgeschaltet und erneut ein Bild aufgenommen, wobei darauf zu achten ist, dass sich die für die GSD-Aufnahme interessierende Region innerhalb des markierten

Bereichs (*Region of Interest* (ROI) in Abbildung 60, Teil B) befindet. Der Gesamtausschnitt und der ROI-Bereich (Abbildung 60, Teil C), der bei der späteren GSD-Aufnahme abgebildet wird, können in separaten Bildern aufgenommen werden. Für die GSD-Aufnahme müssen nun zunächst die Fluorophore in den dunklen Zustand verschoben werden. Dazu wird die Probe mit 100% Laserleistung angeregt, bis sich fast alle Moleküle im Dunkelzustand befinden und das Blinken einsetzt, wobei das aktuelle Bild live kontrolliert werden kann. Durch Umschalten auf den *Acquisition*-Modus wird die Aufnahme gestartet. Dabei werden über die Zeit einige Tausend Aufnahmen gemacht, in denen die Software die einzelnen Blinks erkennt und lokalisiert. Aus diesen *Events* erstellt das Programm eine Event-Liste, woraus schließlich das finale Bild berechnet wird (Abbildung 60, Teil D).

Um zu überprüfen, ob eine für GSD-Aufnahme präparierte Probe auch gut für vergleichende Aufnahmen am CLSM verwendet werden kann, wurde genau dieselbe Probe nachträglich am CLSM abgebildet und ist in Abbildung 61 dargestellt.

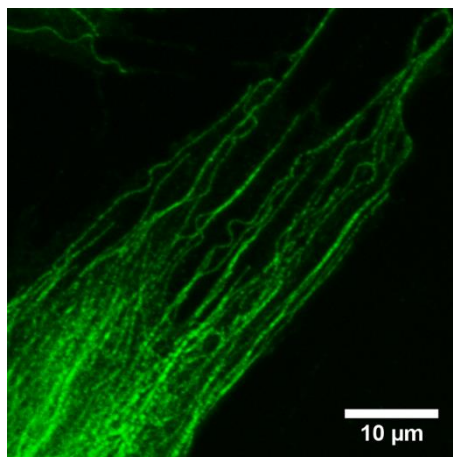


Abbildung 61– CLSM-Aufnahme einer für GSD präparierten Probe: Dieselbe Probe wie in Abbildung 60, abgebildet am CLSM. Grün: alpha-Tubulin. Maßbalken: 10 µm.

Vergleicht man diese Aufnahme mit Abbildung 60, so ist kein Verlust der Aufnahmequalität zu erkennen. Eine für GSD-präparierte Probe ist also für vergleichende Aufnahmen an einem konventionellen Lichtmikroskop geeignet.

9.2.9 GSD Mikroskopie der Citrin-ELN-Faser

Um die Ultrastruktur des Citrin-Elastin-Fasernetzwerkes im *in vitro* Zellkulturmodell zu untersuchen, wurden Citrin-ELN-exprimierende neonatale Fibroblasten mit TGF- β 1 kultiviert und unfixiert eingesetzt für eine Immunmarkierung auf Fibrillin-1

(siehe 8.2.2). Zunächst wurden vergleichende Aufnahmen am CLSM-Mikroskop angefertigt und anschließend die gleiche Probe am GSD-Mikroskop betrachtet.

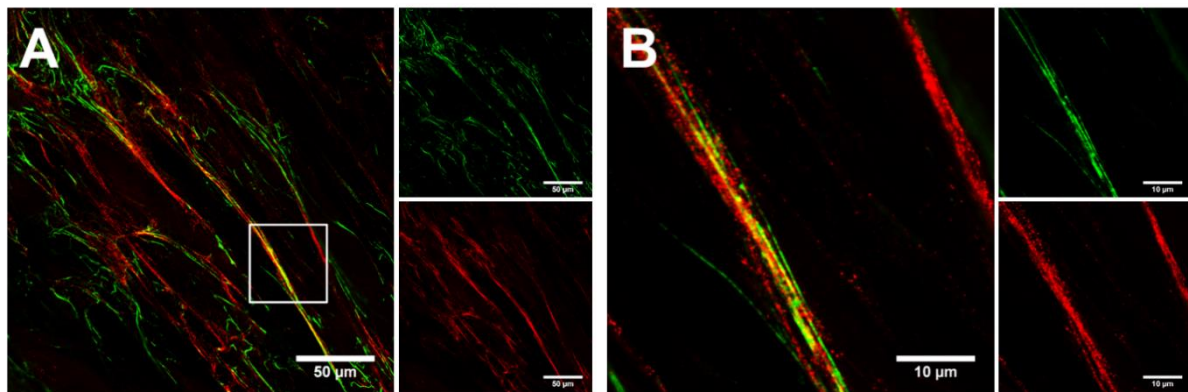


Abbildung 62 – CLSM-Aufnahmen unfixierter und immunmarkierter Citrin-Elastin-transduzierter HDFneo. Die Zellen wurden 12 Tage mit 10 ng/mL TGF- β 1 stimuliert, unfixiert eine Immunmarkierung auf Fibrillin-1 durchgeführt und in Anti-Bleich-DMEM am CLSM (Leica TSC SP5) mit einem 63x-Wasser-Immersions-Objektiv abgebildet. Die Antikörper-Markierung von Fibrillin-1 ist in Grün, das Citrin-Signal in Rot dargestellt. A: 1x Zoom; B: 5x Zoom-Aufnahme der in A markierten Position. Maßbalken in A 50 μ m; in B: 10 μ m.

Abbildung 62 zeigt ein CLSM-Bild von Citrin-ELN-exprimierenden HDFneo, die unfixiert mit einem Antikörper gegen Fibrillin-1 markiert wurden. Auch in diesen unfixierten Zellen lagen die Fibrillin-1-Fasern kolokal mit den Citrin-Fasern vor. In der Vergrößerung von Bereichen bzw. Strukturen des mikrofibrillären Netzwerks, die stark mit Citrin beladen waren (Teil B in Abbildung 62), zeigte sich, dass die Feinstruktur der Fasern sich als Fibrillin-1-Faser darstellte, die mit globulären Citrin-Elastin Strukturen beladen zu sein scheint.

Analoge Strukturen waren auch in den GSD-Aufnahmen sichtbar (Abbildung 63). Citrin-Elastin erschien als globuläre Struktur, das das Netzwerk der Mikrofibrillen säumt. Im Gegensatz zu den CLSM-Aufnahmen in Abbildung 62 stellte sich nicht nur die Citrin-Elastin-, sondern auch die Fibrillin-1-Faser nicht als durchgängige Struktur dar. Die hochauflösende GSD-Mikroskopie offenbarte für beide Proteine eine perlschnurartige Struktur.

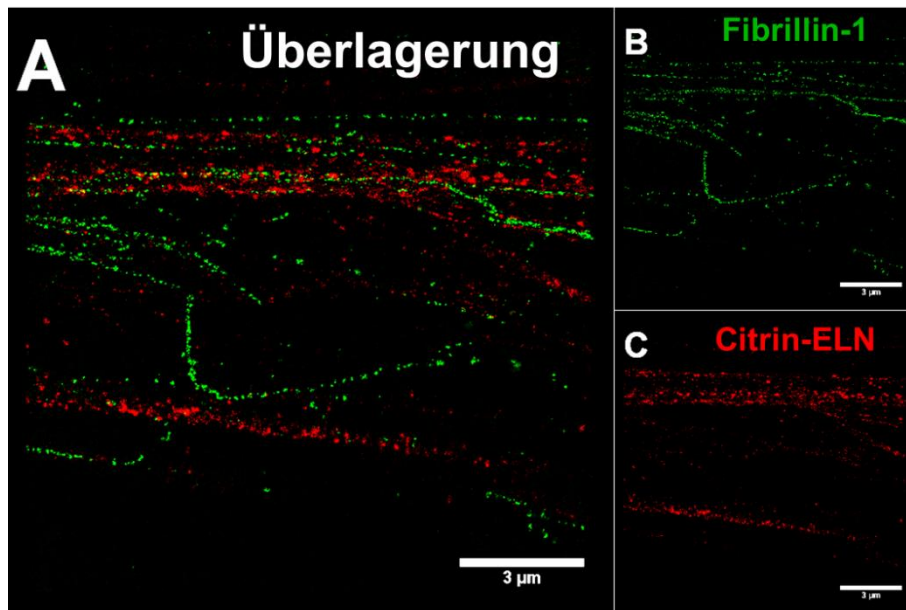


Abbildung 63 – GSD-Aufnahme unfixierter und immunmarkierter Citrin-Elastin transduzierter HDFneo. Transduzierte Zellen wurden 7 Tage mit 10 ng/mL TGF- β 1 inkubiert und unfixiert eine Immunmarkierung auf Fibrillin-1 durchgeführt. Die Aufnahme erfolgte in GluOx/MEA-Puffer mit dem GSD-Mikroskop (Leica SR GSD), ausgestattet mit einem 100x Öl-Immersion-Objektiv. Antikörpermarkierung für Fibrillin-1 ist in Grün (B), das Citrin-Signal in Rot (C) dargestellt. Bildfrequenz der Kamera: 200 Hz (B); 100 Hz (C). Laserintensität und -Wellenlängen: 16,6 kW/cm² und 642 nm (B); 5,2 kW/cm² und 488 nm. Anzahl der aufsummierten Frames: 20.000 (B) und 16.329 (C). A Überlagerung der Einzelkanäle. Maßbalken: 3 μ m.

10 Diskussion

10.1 Rolle von TLR 3 in der Epidermis

10.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es konnte gezeigt werden, dass TLR 3 in humaner Haut nahezu exklusiv in den basalen undifferenzierten Keratinozyten exprimiert wird, was durch in vitro Daten aus Zellkulturmodellen bestätigt wurde. Dabei ist der Verlust der proliferativen Fähigkeit der Keratinozyten nicht ursächlich für die reprimierte TLR 3 Expression und umgekehrt.

Das TLR 3-Expressionsniveau war in Haut eines alten Kollektivs signifikant niedriger im Vergleich zu einem jungen Kollektiv, was sich auch in einer tendenziellen Abnahme der UV-Sensibilität mit steigendem Alter widerspiegelte. Insbesondere zeigte die Bestimmung individueller TLR 3-Mengen eine starke Korrelation mit der individuellen MED.

Mit Hilfe eines siRNA-vermittelten Knockdowns wurde ein funktionales in vitro Zellkulturmodell etabliert, das innerhalb eines Zeitraums von 3-6 Tagen mit Hilfe des künstliche TLR 3-Liganden Poly(I:C) Untersuchungen zu TLR 3-abhängig regulierten Prozessen erlaubt. Dieses Modell konnte in Genexpressionsanalysen und Lipidanfärbungen eine literaturseitig beschriebene Funktion von TLR 3 im Lipidstoffwechsel der Epidermis nicht bestätigen. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass die Differenzierungsmarker Keratine 1 und 10, Notch und sein Outputgen Hes durch Aktivierung von TLR 3 reprimiert werden. Es kann spekuliert werden, dass TLR 3 über die Aktivierung von IRF 3 mit dem *Notch-Signaling* interferiert und den basalen proliferativen Status von Keratinozyten erhält. Dies wirkt (mit Einschränkungen) auch der Ca-aktivierten Differenzierung entgegen, wobei der aktuelle Differenzierungsstatus zum Zeitpunkt der TLR 3-Aktivierung eine Rolle zu spielen scheint.

Die Microarray-Analyse hat bestätigt, dass TLR 3 (abgesehen von den zu erwartenden inflammatorischen Prozessen) eine Reihe weiterer biologischer Funktionen beeinflusst. Hier findet sich eine Aktivierung des Lipidstoffwechsels wieder, die aber mit den vorher gewählten Experimenten nicht bestätigt werden

konnte. Die Aktivierung von Zellviabilität/-überleben und Inhibierung von Apoptose unterstützen die Theorie, dass TLR 3 zum Erhalt des basalen Status der Keratinozyten beitragen kann. Die Validierung ausgewählter Gene des Arrays zeigt darüber hinaus, dass TLR 3 möglicherweise über die Induktion von *tight junction* Proteinen einen Beitrag zur Ausbildung der Hautbarriere leisten kann.

10.1.2 TLR 3-Expressionsmuster in Haut und Keratinozyten

Zur Lokalisation von TLR 3 in der Haut und insbesondere in der Epidermis wurden TLR 3-Antikörper verschiedener Anbieter an Kryohautschnitten getestet, die unterschiedliche Lokalisationen von TLR 3 in der Haut anzeigten. Der Antikörper von Santa Cruz wurde aufgrund des nicht-zellassozierte Signals direkt für die weitere Verwendung ausgeschlossen, da TLR 3 ein membranständiger intrazellulärer Rezeptor ist [15, 22] und somit nur im Zellkontext vorliegen kann. Die Antikörper der Firmen R&D und Imgenex zeigten ein eindeutiges Signal in der Epidermis, d.h. in den epidermalen Keratinozyten. Das mit dem R&D-Antikörper erhaltene Signal in der Dermis ist vermutlich auf im Gewebe residierende Immunzellen (Makrophagen, dendritische Zellen) oder Fibroblasten zurückzuführen, von denen bekannt ist, dass sie TLRs exprimieren [14].

Das in vitro Differenzierungsmodell der Keratinozyten hat gezeigt, dass insbesondere undifferenzierte Keratinozyten TLR 3 exprimieren und dass das Expressionsniveau von TLR 3 im Lauf der Differenzierung auf nahezu null heruntergeht. Dies unterstützt das Ergebnis der Immunmarkierung mit dem Antikörper von R&D, der ein verstärktes bzw. nahezu exklusives Signal in der basalen Epidermis zeigte. Ein ähnliches Ergebnis zeigen auch Literaturdaten, die mit einem Antikörper der Firma Promokine erhalten wurden [111] (siehe Abbildung 64). Das dort beschriebene Muster der exklusiven Expression von TLR 3 in den basalen Keratinozyten korreliert mit den hier erhaltenen Ergebnissen. Daher wurde der R&D Systems Antikörper als tauglich für spezifische Immunmarkierungen erachtet und in weiteren Experimenten zur Markierung von TLR 3 auf Kryohautschnitten eingesetzt.

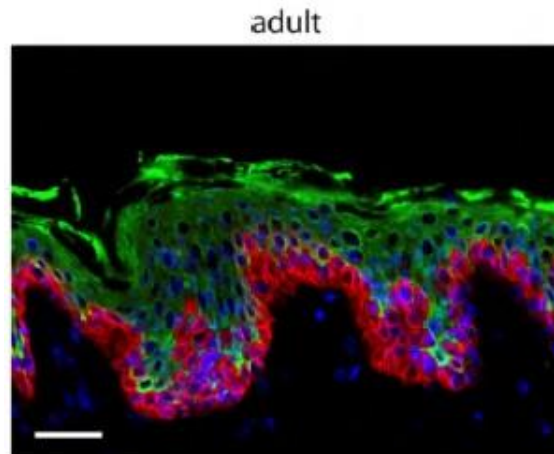


Abbildung 64 - Immunmarkierung von TLR 3 am Kryohautschnitt eines adulten Spenders. Dargestellt sind TLR 3 (rot), Zellkerne (blau) und Keratin 10 (grün). Maßbalken: 40 μm . Entnommen aus [111].

10.1.3 Proliferation beeinflusst nicht die TLR 3-Expression und vice versa

Aus den vorangegangenen Überlegungen stellte sich die Frage, ob die starke Abnahme der TLR 3-Expression von basalen hin zu suprabasalen Keratinozyten eine Begleiterscheinung der reduzierten Proliferation darstellt. xCelligence-Messung, BrdU-Assay und Zellzahlbestimmung bestätigen, dass die Keratinozyten im gewählten Versuchsaufbau mit Vollmedium am stärksten proliferieren und mit den Hungermedien (mit Basalmedium verdünntes Vollmedium) entsprechend langsamer wachsen. Die Genexpressionsanalysen aus parallelen Proben ergab, dass die TLR 3 Expression in Keratinozyten durch Kultivierung mit Hungermedien im Vergleich zu Vollmedium tendenziell eher induziert wird, jedoch nur in geringem Maße. Die RQ-Werte schwanken je nach Versuchsansatz zwischen 0,83 und 1,52.

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass eine geringere Proliferationsrate der Keratinozyten keine Reprimierung der TLR 3-Expression verursacht. Insbesondere die nahezu exklusive Expression von TLR 3 in basalen Keratinozyten der Epidermis ist daher nicht durch den Verlust der Proliferationsfähigkeit, die im Zuge der Differenzierung hin zum *Stratum Corneum* auftritt [112–114], zu erklären.

Es wurde daher der umgekehrte Weg untersucht, d.h. ob sich ein Knockdown von TLR 3 ohne eine weitere Stimulation direkt auf die Proliferationsfähigkeit der Keratinozyten auswirkt. Der siRNA-vermittelte Knockdown von TLR 3 im 12-*well* Format war sehr effizient (im Median auf etwa 5%) realisierbar. BrDU-Assay und

Zellzahlbestimmung in den gleichen Experimenten zeigten minimale Tendenzen hin zu einer verlangsamten Proliferation in den TLR 3-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (*scrambled*). Allerdings war dieser Effekt bei nahezu vollständigem Knockdown von TLR 3 nur sehr gering, so dass ein wesentlicher direkter Einfluss von TLR 3 auf die Zellproliferation ausgeschlossen werden konnte.

Beide Untersuchungsansätze zeigten insgesamt, dass die Proliferation nicht die TLR 3-Expression in Keratinozyten beeinflusst und dass umgekehrt ein Knockdown von TLR 3 sich auch nicht auf die Proliferation auswirkt.

In anderen Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen TLRs und Proliferation gezeigt werden. Die Proliferation von VSMCs, deren abnormales Wachstum eine frühe Komponente der Atherosklerose darstellt, wird TLR 4-abhängig durch *Chlamydia pneumoniae* bzw. dessen hsp60-Protein induziert [115]. Für Pankreaskrebszelllinien wurde ein konstitutiv hohes Expressionsniveau von TLR 3 in Kombination mit Wnt5a gefunden [116]. Dieselbe Studie zeigte außerdem, dass durch Inkubation der Zellen mit dem TLR 3-Inhibitor Phenylmethimazol (C10) oder durch siRNA-vermittelten Knockdown von TLR 3 die Proliferationsrate dieser Zellen signifikant erniedrigt wird, was in diesem Zusammenhang C10 und die Inhibition von TLR 3 als potenzielle Therapie zur Unterdrückung von Zellinvasion herausstellt [116].

10.1.4 Niedrigere TLR 3-Level in Haut alter Spender

Die Immunmarkierung von TLR 3 in Proben junger und alter Spender zeigten keinen Unterschied bezüglich der basalen Lokalisation von TLR 3 in der Haut. Dies bestätigt in der Literatur beschriebene Ergebnisse, die eine basale Lokalisation von TLR 3 in der Epidermis unabhängig vom Spenderalter beschreiben [111]. Allerdings ergab die semiquantitative Auswertung des TLR 3-Signals in den Proben alter Haut ein signifikant schwächeres Signal als in den Proben junger Haut. Da alle Markierungs- und Aufnahmeparameter im Probenset konstant gehalten wurden, kann geschlussfolgert werden, dass das TLR 3-Proteinlevel in Haut alter Probanden signifikant niedriger ist als in Haut junger Probanden. Diese Beobachtung ist konform mit dem Befund, dass TLR 3 in Gesamthautproben adulter Spender signifikant erniedrigt vorliegt im Vergleich zu embryonaler oder fötaler Haut [111]. Spezifische Untersuchungen der Epidermis ergaben ebenfalls ein in adulten Zellen verringertes

TLR 3-Expressionsniveau in Relation zu Epidermis-Proben aus Säuglingen oder Kindern [111].

TLR 3 wird in den letzten Jahren zunehmend eine speziellere Funktion in der Haut zugeschrieben: neben Detektion von UV-Schaden [25] und Unterstützung der Wundheilung [30] auch eine potenzielle Induktion des Lipidstoffwechsels [26], mit dem insbesondere die Barrierefunktion der Haut verbunden ist [29]. Für gealterte Haut ist eine verschlechterte Reparaturleistung nach UV-Schaden [117, 118], eine verlangsamte Wundheilung nach Verletzung [9, 11, 119] und eine negativ beeinträchtigte Barrierefunktion der Haut, insbesondere durch reduzierte Lipidlevel, [12] beschrieben. Die hier gemessenen niedrigeren TLR 3-Level in Haut alter Spender wirft die Frage auf, ob möglicherweise die in der Altershaut zu beobachtenden Phänotypen auf eine reduzierte Expression von TLR 3 zurückzuführen sind.

10.1.5 TLR 3 und UV-Sensibilität

Eigene Untersuchungen an Kryohautschnitten hatten ergeben, dass TLR 3 im Alter reduziert vorliegt. Da TLR 3 in den Keratinozyten der Epidermis der maßgebliche Auslöser eines durch UV-Strahlung bedingten Sonnenbrandes ist [25], wurde überprüft, ob sich dieser ex vivo gemessene Phänotyp auch in vivo bei älteren Probanden in einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung widerspiegelt.

Die Auswertung bei der Beiersdorf AG erhobener MED-Werte (im Rahmen von Lichtschutzfaktorbestimmungen von Sonnenschutzprodukten) hinsichtlich des Alters der Probandinnen ließ einen leichten Trend hin zu höheren MED-Werten mit steigendem Alter erkennen. Dies entspricht einer sinkenden Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung und korreliert mit dem Absinken des TLR 3-Levels. Bei den hier vorliegenden MED-Werten standen allerdings keine Hautproben der jeweiligen Probandinnen zur Verfügung, so dass eine direkte Korrelation von individuellem TLR 3-Level mit der gemessenen MED (auch unabhängig vom Alter) hier nicht möglich war.

Aus einer weiteren unabhängigen Studie standen jedoch Hautproben als Kryoschnitte zur Verfügung, zu dessen Spendern auch die MED bekannt war. Die TLR 3-Immunmarkierung und –Quantifizierung aus den am CLSM aufgenommenen

Bildern zeigt, dass ein niedriger TLR 3-Level mit einer hohen MED einhergeht. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass TLR 3 in vivo einen maßgeblichen Einfluss auf die UV-Sensibilität hat und zeigt insbesondere, dass unterschiedliche Level von TLR 3, die ex vivo gemessen wurden, sich in entsprechenden Ausprägungen in einem in vivo Parameter niederschlagen.

Im gleichen Probenstet wurde zusätzlich das Alter der Spender miteinbezogen. Im untersuchten Probenkollektiv von 7 Spendern im Alter von 27-46 Jahren lässt sich keine Abhängigkeit zwischen dem Alter und dem TLR 3-Level bzw. MED-Wert feststellen, wobei hier nur ein sehr schmales Spektrum von 19 Jahren abgedeckt wurde. Die reduzierten TLR 3-Level in gealterter Haut wurden in einem Kollektiv von Spendern ab 58 Jahren und älter gefunden.

In der Literatur sind eine Vielzahl von Studien beschrieben, die sich mit Parametern zur Bestimmung und insbesondere Vorhersage der MED (und damit der Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlung) auseinander setzen. Fitzpatrick führte vor einigen Jahrzehnten eine Einteilung in Hauttypen ein, die auf einem definierten Katalog von Fragen an den Probanden bezüglich seiner Bräunungs- bzw. Sonnenbrandneigung basierte [97, 98]. Studien zeigten, dass diese Einteilung in Hauttypen durchaus mit der gemessenen MED eines Probanden korreliert [102, 120], wobei immer große Schwankungen der individuellen MED-Werte innerhalb eines Hauttyps auftreten [102, 103]. Eine objektive Bestimmung der Hautfarbe durch spektrometrische Messungen [99] erlaubt eine Einteilung in Phototypen, die eine akkuratere Vorhersage der UV-Empfindlichkeit ermöglicht [101]. Ein Zusammenhang von MED-Werten mit dem Alter der Probanden wird in der Literatur verneint [102, 121–123], und auch in der vorliegenden Studie konnte nur ein schwacher Zusammenhang zwischen einer steigenden MED mit steigendem Alter hergestellt werden. Sehr prägnant dagegen ist der starke Zusammenhang zwischen dem individuellen TLR 3-Level und der Sensitivität gegenüber UV-Strahlung. Im Zusammenspiel der Faktoren, die die Sensibilität gegenüber UV-Strahlung und damit den MED-Wert eines Individuums bestimmen, könnte also TLR 3 eine entscheidende Rolle zukommen. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass TLR 3 in der Epidermis der maßgebliche Sensor für UV-Schaden und damit Auslöser der inflammatorischen Antwort ist, die als Sonnenbrand wahrgenommen wird [25].

Für weiterführende Studien könnte ein Set-up aufschlussreich sein, in dem die MED eines Probanden gemessen wird, parallel aus epidermalen Proben die TLR 3-Menge bestimmt wird (z.B. über einen Immunblot) und in das spezifische TLR 3-Antagonisten [124] und UV-Bestrahlung miteinbezogen werden. Durch Behandlung von Haut mit TLR 3-Antagonisten vor und/oder während UV-Bestrahlung mit der probandenspezifischen MED ist entsprechend den hier vorgestellten Ergebnissen eine deutliche Reduktion des Sonnenbrandes im Vergleich zu einem unbehandelten Areal zu erwarten. Dies könnte in vivo den Zusammenhang zwischen TLR 3-Menge, TLR 3-*Signaling* und UV-Sensibilität aufschlüsseln.

10.1.6 Charakterisierung eines in vitro Zellkulturmodells zu epidermalem TLR 3

Mit Hilfe eines Zellkulturmodells sollte die spezielle Funktion von TLR 3 in Keratinozyten der Epidermis näher untersucht werden. Insbesondere legte die fast exklusive Expression von TLR 3 in den basalen Keratinozyten die Idee nahe, dass TLR 3 auch im Kontext der Differenzierung eine Funktion haben könnte.

Mit Hilfe des künstlichen TLR 3-Liganden Poly(I:C) konnte an neonatalen Keratinozyten gezeigt werden, dass NHEKneo in vitro zum einen TLR 3 grundsätzlich exprimieren, und zum anderen mit Poly(I:C) stimulierbar sind. Auf diesen Stimulus hin wird die Genexpression von IL-6 und TNF α konzentrationsabhängig stark induziert, was für eine Funktionalität des Rezeptors in diesen Zellen spricht. Dies bestätigt Literaturdaten, die zeigen, dass epidermale Keratinozyten einen funktionalen TLR 3 Rezeptor exprimieren [18, 23]. Zwar wurde in den hier gezeigten Daten auch TLR 3 selbst durch Poly(I:C) induziert, jedoch blieb dieser Wert auch bei sehr hoher Poly(I:C)-Konzentration niedrig. Die Induktion von IL-6 und TNF α ist also auf eine stärkere Stimulation des Rezeptors selbst und nicht durch die erhöhte Menge an TLR 3 zurückzuführen, was eine Funktionalität von TLR 3 in Keratinozyten stützt. Ein BioPlex-Assay konnte außerdem zeigen, dass Poly(I:C) in NHEKneo auch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen ins Medium auslöst, wobei bereits eine geringe Konzentration von 1 $\mu\text{g/mL}$ Poly(I:C) ausreichte, um IL-6 auf Proteinebene zu induzieren.

Für weiterführende Experimente wurde ein transientser siRNA vermittelter Knockdown von TLR 3 in NHEKneo etabliert, der in einem Zeitraum von etwa 3 Tagen effizient die relative Expression von TLR 3 reprimierte. Eine Stimulation von TLR 3-

Knockdown-Zellen innerhalb dieses Zeitraums führte zwar zu einer schwachen Induktion von IL-6, die jedoch signifikant niedriger ausfiel als in der *scrambled* Kontrolle. Damit kann gezeigt werden, dass die Induktion von IL-6 mit Poly(I:C) in Keratinozyten über die Aktivierung von TLR 3 verläuft und dass der hier etablierte Knockdown funktional ist, da die Reaktion auf Poly(I:C) durch TLR 3-Knockdown signifikant abgeschwächt wird. Allerdings ist trotz Reprimierung von TLR 3 noch eine Induktion von IL-6 messbar. Neben TLR 3 exprimieren Keratinozyten noch weitere Rezeptoren für dsRNA, die ebenfalls eine inflammatorische Antwort auslösen können: die Protein Kinase R (PKR) und die RNA Helikasen RIG I (*retinoic acid inducible-gene 1*) und MDA 5 (*melanoma differentiation-associated protein 5*) [23, 125]. Dies kann erklären, warum der Knockdown von TLR 3 alleine nicht zu einer kompletten Unterbindung der proinflammatorischen Antwort in Keratinozyten führt, so dass durch Poly(I:C) ausgelöste Effekte nicht ohne weiteres auf TLR 3 zurückgeführt werden können, sondern immer kritisch auf ihre Abhängigkeit von TLR 3 hin geprüft werden sollten.

10.1.7 Konkrete Rolle von TLR 3 im Lipidstoffwechsel

Experimente von Borkowski et al. [126] haben gezeigt, dass TLR 3 in bestimmten Bereichen des Lipidstoffwechsels der Epidermis eine Rolle spielt und damit einen Beitrag zur Reparatur der Hautbarriere nach UV-Schaden leisten kann. Sie konnten zeigen, dass TLR 3-abhängig nicht nur die Expression einzelner Lipidstoffwechsel-assoziiierter Gene induziert wurde, sondern dass Keratinozyten auch in der Lage sind, unter Poly(I:C) Stimulation TLR 3-abhängig intrazellulär Lipide zu akkumulieren. Hier wurden einzelne dieser Gene herausgegriffen und im vorgestellten in vitro Modell untersucht: Transglutaminase-1 (TGM1) ist ein entscheidendes vernetzendes Enzym bei der Ausbildung des *cornified envelope* in der Epidermis [6, 127]; ABCA12 (*ATP-binding cassette, subfamily A, member 12*) ist ein Protein-Transporter, der an der Ausschleusung von Lipiden als *lamellar bodies* in den Extrazellular-Raum beteiligt ist [27, 128]; Sphingomyelin Phosphodiesterase 1 (SMPD1) konvertiert enzymatisch extrazelluläre Sphingomyeline in Ceramide, die rund die Hälfte der Lipidmasse im Stratum Corneum ausmachen [28, 29]. Somit tragen diese drei Gene in verschiedenen Prozessen der Stratifizierung zur Ausbildung der epidermalen Hautbarriere bei. Die Genexpressionsanalyse zeigte im in vitro Modell keine

signifikante TLR 3-abhängige Induktion. Eine Bedeutung von TLR 3 im Kontext der Hautbarriere kann aus diesen Ergebnisse nicht bestätigt werden.

Mit Hilfe von zwei verschiedenen Färbemethoden (AdipoRed Assay und Oil Red O) wurde dennoch die Akkumulation von Lipiden in Keratinozyten untersucht, da denkbar ist, dass Poly(I:C) über TLR 3-unabhängige Sensoren dennoch die Lipidsynthese beeinflusst. Dabei stellte sich heraus, dass insbesondere die Oil Red O-Färbung für die Anfärbung intrazellulärer Lipide geeignet ist und zumindest in differenzierten Adipozyten auch sehr kleine Strukturen für die Detektion im Mikroskop visualisieren kann. Publiziert ist von Borkowski et al., dass eine Konzentration von 10 µg/mL Poly(I:C) über 72 Stunden bei differenzierenden Keratinozyten ausreichend ist, um die Akkumulation intrazellulärer Lipide zu stimulieren und über ORO nachzuweisen (siehe Abbildung 65 und [26]).

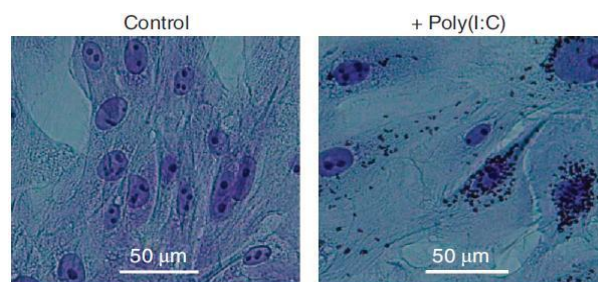


Abbildung 65 – ORO-Färbung Poly(I:C) stimulierter Keratinozyten, aus [26].

In den hier durchgeführten Experimenten wurde parallel zur Stimulation mit Poly(I:C) durch Zugabe verschiedener Konzentrationen Calcium zum Standardmedium bzw. durch das Calcium-haltige rFAD-Medium die Differenzierung angeregt. Unter diesen Bedingungen konnten in NHEKneo nach Stimulation mit 10 µg/mL Poly(I:C) hier allerdings keine intrazellulären Lipide über die ORO-Färbung nachgewiesen werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass die generierten Lipid-Mengen möglicherweise sehr gering sind bzw. die Lipid-haltigen Organellen epidermaler Keratinozyten zu klein sind, um sie im Lichtmikroskop zu detektieren. Für die lipidhaltigen Lamellarkörperchen wird eine Größe von etwa 300 nm angenommen [129], so dass diese lichtmikroskopisch möglicherweise nur schwer auflösbar sind.

Zusammenfassend mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen kann festgehalten werden, dass ein Effekt von Poly(I:C) bezüglich einer Steigerung der Lipidbiosynthese in Keratinozyten nicht bestätigt werden kann. Die Aktivierung von TLR 3 trägt demnach nicht zum Lipidstoffwechsel der Haut bei.

10.1.8 Konkrete Rolle von TLR 3 in der epidermalen Differenzierung

Die nahezu exklusive Expression von TLR 3 in undifferenzierten Keratinozyten bzw. der Basalschicht führte zu der Frage, ob TLR 3 im Prozess der epidermalen Differenzierung eine Funktion übernimmt. Zur Überprüfung dieser Idee wurde zum einen die Expression der Strukturproteine Keratin 1 und 10 herangezogen, die ein Marker für die Differenzierung von Keratinozyten sind [6]. Ein weiterer Marker und auch Regulator der Differenzierung in Keratinozyten ist der Rezeptor Notch, der insbesondere in suprabasalen Keratinozyten exprimiert wird [130] und dessen erhöhte Aktivität einen Austritt aus dem Zellzyklus und den Eintritt in die Differenzierung bedeutet [131]. Die Aktivierung des Notch-Signalweges führt zur Expression des Transkriptionsfaktors HES1, der einen transkriptionellen Repressor darstellt und durch die Regulation entsprechender gewebspezifischer Zielgene Zellzyklus und Differenzierung reguliert [132].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gewählten Differenzierungsmarker durch Stimulation mit Poly(I:C) TLR 3-abhängig signifikant reprimiert werden. Da Keratin 1 und 10 Marker für den Eintritt der Keratinozyten in die Differenzierung sind [6], interferiert demnach in Keratinozyten die Aktivierung von TLR 3 mit Poly(I:C) mit dem Eintritt in die Differenzierung. Die Aktivierung von TLR 3 scheint der Differenzierung entgegen zu wirken und den basalen Status der Keratinozyten zu erhalten. Die hier vorgestellten Daten zeigen auch, dass die Expression des Rezeptors Notch TLR 3-abhängig durch Poly(I:C) reprimiert wird. Auch dieses Ergebnis deutet auf eine der Differenzierung entgegen wirkende Funktion von TLR 3 in Keratinozyten hin.

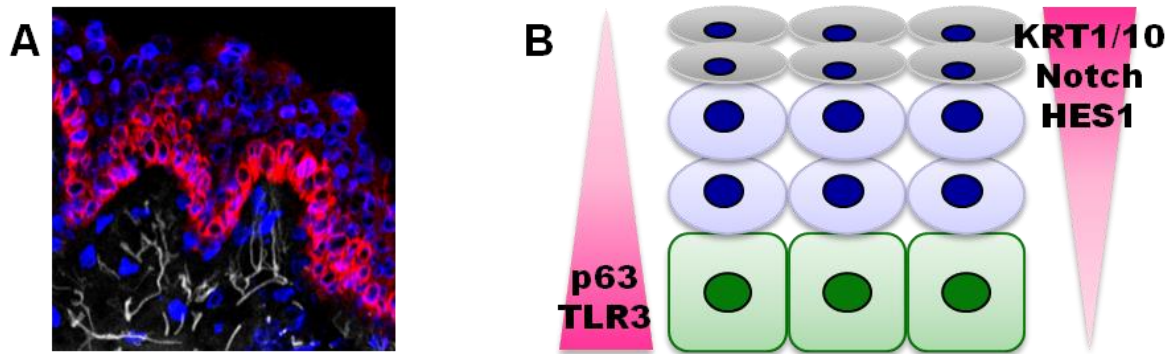


Abbildung 66 – TLR 3 im Kryohautschnitt / schematische Darstellung der Epidermis. **A** Exemplarische Fluoreszenzaufnahme eines Kryohautschnitts mit Immunfluoreszenzmarkierung von TLR 3 (rot). Dargestellt sind außerdem die Autofluoreszenz (weiß) und die Zellkerne (blau). **B** Schematische Darstellung des Expressionsmusters bestimmter Proteine (p63, TLR 3, Keratin 1 und 10, Notch und HES1) in der Epidermis. Dargestellt sind die verschiedenen Schichten der Keratinozyten (grün: basal).

Der Rezeptor Notch, der insbesondere in suprabasalen Keratinozyten exprimiert wird, ist ein wichtiger Regulator der Differenzierung in Keratinozyten (siehe auch B in Abbildung 66). Dessen Signaltransduktion hemmt über die Unterdrückung des Transkriptionsfaktors p63 das Wachstum der Zellen, und die Expression von Differenzierungsmarkern wie Keratin 1 wird induziert [131]. Hier konnte gezeigt werden, dass durch Behandlung mit Poly(I:C) in Keratinozyten sowohl die Expression von Notch als auch HES1 (einem der *Outputgene* von Notch) TLR 3-abhängig reprimiert wird. Es ist also denkbar, dass durch eine Herunterregulation von Notch oder eine Interferenz mit dessen *Signaling* die Keratine 1 und 10 reprimiert werden und so insgesamt über Aktivierung von TLR 3 ein Erhalt des proliferativen Status der Keratinozyten unterstützt wird.

Es gibt Hinweise darauf, dass mit dem Alter die epidermale Zellerneuerung bzw. die mitotische Aktivität in basalen Keratinozyten sinkt, verbunden mit einer geringeren Proliferationsrate der Zellen in gealterter Haut [133]. Ebenso wird auch eine Abnahme der Stammzellzahl mit Alterung in Verbindung gesetzt [134, 135]. Neuere Daten mit Mausmodellen zeigen hingegen keine Unterschiede bezüglich epidermaler Stammzellen (EpiSCs) im Vergleich von gealterter mit junger Haut [136]. Andere Studien zeigen darüber hinaus, dass die Stammzellzahl gleich bleibt, aber dafür in gealterter Epidermis die Zahl der TA-Zellen (*transit amplifying*) zunimmt, vermutlich um die längere Verweildauer der TA-Zellen in diesem Status zu kompensieren [137]. Ob daher also ein Beitrag von TLR 3 im Sinne eines Erhalts des proliferativen Status basaler Keratinozyten ein erstrebenswertes Ziel in *anti-aging* Strategien ist, müssten

weitere tieferegehende Studien (z.B. mit Hautmodellen gealterter Keratinozyten) zeigen.

Über welche Wege TLR 3 auf Notch und die Differenzierung Einfluss nimmt, kann hier nur vermutet werden. Nguyen et al. haben gezeigt, dass die durch Notch-Aktivierung eingeleitete Differenzierung und Unterdrückung von p63 die Heruntermodulation bestimmter Faktoren, unter anderem IRF7 und 3, erfordert [138]. Da das TLR 3-*Signaling* wiederum die Aktivierung von IRF3 zur Folge hat, kann spekuliert werden, dass TLR 3 über die Aktivierung von IRF3 die Notch-abhängigen Differenzierungsprozesse unterdrückt und damit den Erhalt des proliferativen Status in Keratinozyten fördert (siehe auch schematische Darstellung in Abbildung 67). Diese Hypothese widerspricht nicht der Aussage vorangegangener Experimente, dass Proliferation und TLR 3 sich gegenseitig nicht beeinflussen. Dort wurde lediglich eine verlangsamte Proliferation induziert bzw. TLR 3 reprimiert, ohne dass ein weiterer Stimulus angelegt wurde. In dem hier vorgestellten Modell spielt die Aktivierung von IRF3 allerdings eine wichtige Rolle, die letztlich nur bei Aktivierung des TLR 3-Signalwegs auftritt und daher ohne zusätzliche Stimulation durch einen TLR 3-Liganden wie Poly(I:C) nicht relevant ist.

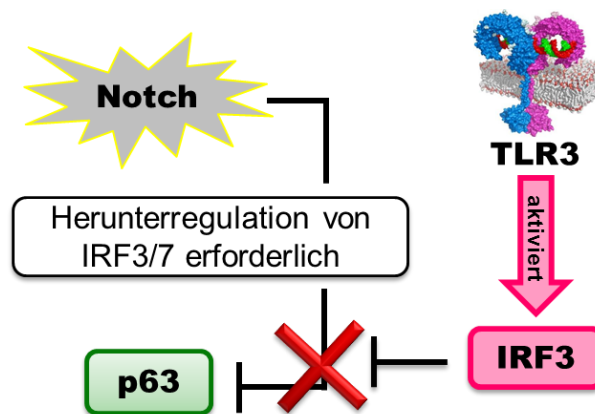


Abbildung 67 – Darstellung der im Text formulierten Hypothese zur Interferenz von TLR 3 mit Notch. Die Repression von p63 durch Notch erfordert die Heruntermodulation von IRF3/7. Da TLR 3 IRF 3 aktiviert, könnte dies der Repression von p63 und damit der Differenzierung der Keratinozyten entgegenwirken.

Calcium-induzierte Differenzierung

Durch Zugabe von erhöhten Konzentrationen Calcium kann im Zellkulturmodell die Differenzierung von Keratinozyten induziert werden [105]. Dies wurde genutzt, um zu überprüfen, ob die Aktivierung von TLR 3 durch Poly(I:C) einer durch Calcium eingeleiteten Differenzierung entgegenwirken kann. Sollte TLR 3 tatsächlich in die Ca-induzierte Differenzierung eingreifen können, so ist zu erwarten, dass Ca in der *scrambled* Kontrolle die Differenzierungsmarker induziert und die Aktivierung von TLR 3 durch gleichzeitige Stimulation mit Poly(I:C) diese Induktion wieder hemmt oder unterdrückt. Im TLR 3 Knockdown ist dann zwar auch eine Induktion der Differenzierungsmarker durch Calcium zu erwarten, allerdings sollte bei einem TLR 3-abhängigen Effekt auf die Differenzierung die Zugabe von Poly(I:C) keinen weiteren Einfluss haben und die Differenzierungsmarker trotzdem auf erhöhtem Level exprimiert werden.

Die hier vorgestellten Genexpressionsdaten lassen keine eindeutige Aussage zum Einfluss von TLR 3 auf die Calcium-induzierte Differenzierung zu. In der Tendenz kann Poly(I:C) der Induktion der ausgewählten Differenzierungsmarker Keratin 1, Keratin 10, HES1 und Notch zwar entgegenwirken, allerdings auch im TLR 3-Knockdown, so dass diese Tendenzen nicht eindeutig der Aktivierung von TLR 3 zugeschrieben werden können.

10.1.9 TLR 3, Konfluenz und Differenzierung in Keratinozyten

Da für die Induktion der Differenzierung in Keratinozyten das Maß der Konfluenz entscheidend ist (siehe auch 8.1.5), sind möglicherweise der genaue Zeitpunkt bzw. die Taktung von siRNA-vermitteltem Knockdown, Erreichen der Konfluenz, Start der Stimulation mit Poly(I:C) und Zugabe von Calcium ein entscheidender Faktor für den Ausgang der Experimente und die beobachtbaren Effekte. Die Genexpressionsanalysen der Differenzierungsmarker in unterschiedlich dicht ausgesäten und Poly(I:C)-behandelten Keratinozyten zeigten, dass eine Tendenz zur differenziellen Regulation der gewählten Marker im Sinne einer Reprimierung in der *scrambled* Kontrolle nur in den weniger dicht ausgesäten Zellen zu beobachten war. Demnach ist eine Interferenz zwischen TLR 3-Aktivierung durch Poly(I:C) und Differenzierung in Keratinozyten nur dann möglich, wenn die Keratinozyten eine

bestimmte Zelldichte bzw. einen bestimmten Punkt im Prozess der Differenzierung noch nicht überschritten haben.

Dies korreliert mit kürzlich vorgestellten Ergebnissen, in denen Johnson et al. beschreiben, dass UVB-Strahlung in Keratinozyten zu einer Repression der Differenzierungs-assoziierten Gene Keratin 1, Keratin 10, sowie Desmoglein 1 (Dsg1) und Desmocollin 1 (Dsc1) führt [139]. Eine explizite Betonung liegt in diesem Zusammenhang auf dem Befund, dass die UVB-Strahlung vor dem Wechsel auf Calciumhaltigem Medium appliziert wurde, also vor dem Einleiten der Differenzierung. Davon ausgehend, dass TLR 3 der wichtigste Sensor für Schäden durch UVB-Strahlung ist [25], können Parallelen zu den hier vorgestellten Experimenten gezogen werden. Um einen Effekt auf die untersuchten Differenzierungsmarker beobachten zu können, muss Poly(I:C) als Aktivator von TLR 3 vor dem Beginn der Differenzierung, d.h. vor Erreichen einer bestimmten Konfluenz zugegeben werden. Ist aber schon ein bestimmtes Stadium der Differenzierung durch Konfluenz oder Calcium-Shift erreicht, ist der Effekt von Poly(I:C) oder UVB-Strahlung nicht mehr zu beobachten.

10.1.10 Whole Human Genome Microarray und Validierung ausgewählter Gene

Mit Hilfe eines *Whole Human Genome Microarrays* von Poly(I:C) behandelten Keratinozyten sollte ein Eindruck gewonnen werden, welche Gruppen von Genen und damit biologischen Funktionen TLR 3-abhängig reguliert werden. Die Analyse ergab, dass insbesondere jene Prozesse besonders stark aktiviert sind (angezeigt durch einen hohen *activation z-score*), die im Kontext inflammatorischer Reaktionen stehen. Dazu gehören insbesondere die Invasion und Migration von Zellen, aber auch chemotaktische Prozesse. Dies zeigt, dass Keratinozyten in der Rekrutierung von Immunzellen in entzündlichen Reaktionen der Haut eine wichtige Rolle zukommt. Ebenfalls positiv aktiviert sind Funktionen, die in den Bereich des Lipidstoffwechsels und der „Biochemie kleiner Moleküle“ fallen. Dies unterstützt die in der Literatur beschriebene Funktion von TLR 3 in der Ausbildung der Hautbarriere durch die Induktion Lipidstoffwechsel-assoziiierter Gene [24]. Die Ermittlung der relativen Genexpression im Rahmen dieser Arbeit ausgewählter Gene konnte diese Funktion von TLR 3 allerdings nicht belegen (siehe 9.1.7). Eine detaillierte Analyse der im Array als differenziell reguliert ermittelten Gene, die in den Bereich Lipidstoffwechsel fallen, könnte möglicherweise Aufschluss darüber geben, ob andere Gene als die in

den hier vorgestellten Versuchen ABCA12, SMPD1 und TGM1 einen Beitrag zur Ausbildung der Hautbarriere leisten.

Außerdem zeigte die Analyse des Arrays eine Aktivierung von Zellviabilität und -überleben und eine Inhibierung von Apoptose. Dies deutet, ähnlich wie die in 10.1.8 diskutierten Daten, auf eine Funktion von TLR 3 im Sinne des Erhalts des proliferativen basalen Status von Keratinozyten. Jüngere Daten in der Literatur zeigen, dass TLR-*Signaling* mit der Regulation von Zellproliferation und -überleben zusammenhängt: integriert in Immunantwort und Reparatur von Gewebe erscheint die Expansion bestimmter Zellen sinnvoll [24]. Je nach TLR, Adapterproteinen und beteiligter Transkriptionsfaktoren kann die Aktivierung des TLR-*Signalings* Signale für Zellproliferation und -überleben oder anti- oder pro-apoptotische Prozesse liefern, wobei die Mechanismen, wie diese Signale in den unterschiedlichen Zelltypen integriert werden, eine große Wichtigkeit haben [24]. Hasan et al. [140] konnten zeigen, dass die Spezifität von TLR-Liganden auf Fibroblasten-Proliferation und DC-Lebensdauer einen differenzierten Effekt hat und endogenes Typ 1 Interferon als Schalter fungiert, der den funktionalen Ausgang des *Signalings* festlegt. Sie konnten insbesondere zeigen, dass TLR 3 und 4 über den Adapter TRIF den Zellzykluseintritt induzieren. Target des Signalwegs ist der Zellzyklusinhibitor p27, der ultimativ degradiert und damit der Eintritt in den Zellzyklus ermöglicht wird [140]. Ob in epidermalen Keratinozyten die Aktivierung von TLR 3 über einen vergleichbaren Mechanismus zu Zellproliferation und -überleben beiträgt, müssen zukünftige Studien zeigen.

Für die Validierung des *Whole Human Genome Arrays* wurden jeweils vier Gene ausgewählt, die eine TLR 3-abhängige Induktion bzw. Reprimierung zeigten. Die Richtung der differentiellen Regulation konnte in der qRT-PCR bestätigt werden, so dass die Ergebnisse des Microarrays als valide eingestuft werden können.

Die starke Induktion von MMP9 und IL36G unterstreicht die erwartungsgemäße Funktion von epidermale TLR 3 in der inflammatorischen Antwort. MMP9 spaltet dabei als extrazelluläres Enzym nicht nur Proteine der ECM, und erleichtert somit die Einwanderung von Zellen in das Gewebe [141], sondern ist darüber hinaus (wie andere MMPs auch) an der Modulation der Immunantwort über proteolytische Modifikation von bioaktiven Mediatoren beteiligt [142]. MMP9 moduliert dabei z.B. durch *Shedding* von Syndecan-1 und -4 [143] den Chemokingradienten im Gewebe

oder inaktiviert Interferon- β durch proteolytische Spaltung [144]. IL-36 γ ist ein proinflammatorisches Zytokin [145], das in Keratinozyten nach Poly(I:C)-Stimulation sehr stark sekretiert wird und möglicherweise zu der Gruppe der sogenannten Alarmine gehört, die umgebenden Zellen vor der Invasion eines Pathogens „warnen“ [146], und das mit der Pathogenese psoriatischer Haut verknüpft ist [147].

Die Induktion der *tight junction* Komponenten Claudin-1 und TJP2 unterstützt darüber hinaus die Hypothese, dass die Aktivierung von TLR 3 einen wichtigen Beitrag zur Ausbildung der Hautbarriere leistet. Für Claudin-1 konnte in Keratinozyten gezeigt werden, dass es zur Barriereausbildung gegen verschiedene Ionen und Moleküle beiträgt, wenngleich es für die Barriere gegen Wasser entbehrlich ist [148]. Das *tight junction* Protein ZO-2 (*Zona Occludens 2*, codiert durch das Gen TJP2) spielt dagegen eine wichtige Rolle im Wasserhaushalt, da eine Repression von TJP2 in Mauhaut zu einer deutlichen Erhöhung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) führt [149]. ZO-2 ist außerdem eine entscheidende Komponente in einem Multiproteinkomplex mit JAM-A (*Junctional Adhesion Molecule-A*) und trägt damit essenziell zur JAM-A vermittelten Barrierefunktion bei, wie in Darmschleimhautzellen (IEC, *intestinal epithelial cells*) gezeigt wurde [150].

Im Microarray und in der Validierung konnte außerdem die TLR 3-abhängige Reprimierung von Keratin 10 bestätigt werden. Es wurde darüber hinaus auch eine Reprimierung von Keratin 4 gemessen. In der normalen epidermalen Differenzierung von Keratinozyten spielt Keratin 4 allerdings keine Rolle, wohingegen es in HaCaT-Zellen als Differenzierungsmarker gilt [151]. Ferner ist eine Induktion von Keratin 4 nach topischer Gabe von Retinolsäure auf gesunder Haut [152] oder erkrankter Haut [153] beschrieben. In der Validierung wurde außerdem eine TLR 3-abhängige Reprimierung des Desmosom-Proteins Desmoglein 1 (Dsg1) gefunden. Dies ergänzt Literaturdaten, die eine Reprimierung dieses Proteins nach UVB-Strahlung beschreiben, was außerdem begleitet ist, durch ein geringeres Expressionsniveau der Keratine 1 und 10. [139]. UVB-Bestrahlung und der siRNA-vermittelte Knockdown von Dsg1 wirken sich darüber hinaus nicht nur in einer Repression der Keratine 1 und 10 aus, sondern führen auch zu einer veränderten epidermalen Architektur [139]. Weitere Studien belegen, dass Dsg1 nicht nur Strukturprotein ist, sondern auch eine regulatorische Aufgabe in Keratinozyten-Homöostase und –

Differenzierung hat [154]. TLR 3 könnte daher als UV-Schadenssensor auch über diesen Weg in die Differenzierung der epidermalen Keratinozyten eingreifen.

Inwiefern die hier beschriebenen Einflüsse von TLR 3 auf die Differenzierung, Proliferation und Zellüberleben im Zusammenspiel einen günstigen oder negativen Effekt auf die Hautbarriere haben, muss Gegenstand künftiger Studien sein.

10.2 Elastogenese im dermalen Fibroblasten

10.2.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Über Immunfluoreszenzmarkierungen an in frühen Stadien der Elastogenese fixierten Fibroblasten konnte auch unter Verwendung von speziellen Transportinhibitoren der intrazelluläre Transportweg von TE/Elastin nur bedingt nachvollzogen werden, wobei TE kolokalisiert mit dem Golgi vorgefunden wurde. Es konnte darüber hinaus bestätigt werden, dass dem intrazellulären pH-Wert bei der Sekretion von TE/Elastin in HDFneo eine potenzielle Rolle zukommt.

An HDFneo wurde ein Modell zur Expression von fluoreszenzmarkiertem Elastin etabliert. Mit Hilfe der Elektroporation wurde zunächst ein HA/His/c-Myc-Elastin exprimiert, um die Funktionalität der für humanes Elastin gewählten Gensequenz eindeutig zu bestätigen. Unter Verwendung eines lentiviralen Expressionssystems wurde erstmals ein Zellkulturmodell etabliert und charakterisiert, das humanes fluoreszenzmarkiertes Elastin im Kontext humaner Zellen verwendet.

Die stabile Expression von Citrin-TE über den hier untersuchten Zeitraum von 14 Tagen zeigt eindrucksvoll, dass in neonatalen und adulten Fibroblasten die alleinige Überexpression von Elastin ohne eine weitere Stimulation durch TGF- β 1 ausreichend ist, um eine extrazelluläre Ablagerung von Elastinfasern zu erreichen. Dabei scheint die Form der Faser stark vom vorliegenden Mikrofibrillen-Gerüst abzuhängen, so dass eine Steigerung der Elastinproduktion nur dann sinnvoll erscheint, wenn das extrazelluläre Grundgerüst intakt ist.

Die Verwendung des Fluoreszenzproteins Citrin erlaubte eine ultrastrukturelle Analyse mit der GSD-Mikroskopie. Sie zeigte nicht den aus der Elektronenmikroskopie bekannten Kern amorphen Elastins, der außen von Mikrofibrillen gesäumt ist, sondern sowohl für Elastin als auch für Fibrillin-1 eine

perlschnurartige Struktur, die sich mit ultrastrukturellen Analysen der Mikrofibrillen deckt.

10.2.2 Immunmarkierungen von intrazellulärem Tropoelastin

Zur Nachverfolgung der TE-Sekretionsroute wurden Immunfluoreszenzmarkierungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach TGF- β -Stimulation und in Kontrollkulturen von HDFneo angefertigt. 48 Stunden nach Stimulationsstart tritt eine Akkumulation von TE/Elastin im Golgi-Apparat auf. Das zunehmende Fluoreszenzsignal lässt vermuten, dass auch die TE/Elastin-Menge innerhalb des Zeitraumes von 48 Stunden zunimmt. Aus diesen Experimenten kann an dieser Stelle formuliert werden, dass TE in HDFneo-Zellen auf dem Weg an die Zelloberfläche im Golgi-Apparat auftritt. Eine Kolokalisation mit dem ER, das Teil der klassischen Proteinsekretion ist, konnte hier nicht gefunden werden. Da sekretorische Proteine generell in das ER hinein translatiert werden, bevor sie den weiteren Weg über den Golgi-Apparat nehmen, wäre ein Auftreten von TE im ER vor der Anhäufung im Golgi nach 48 Stunden zu vermuten gewesen, zumal die TE mRNA ein entsprechendes Signalpeptid besitzt [37]. Für TE ist zudem postuliert, dass es vornehmlich einer ER-abgeleiteten Sekretionsroute an die Zelloberfläche folgt, wobei es dabei dann vermutlich das Golgi-Kompartiment „umgeht“ [45, 155]. Dafür verantwortlich gemacht wird insbesondere das EBP [156], das innerhalb von etwa 40-60 min von der Zelloberfläche ins Innere der Zelle und wieder zurück an die Zelloberfläche gelangt und während dieses Recycling-Prozesses TE aufnimmt und in den Extrazellularraum entlässt [45]. Davis und Mecham haben allerdings in Immunfluoreszenzmarkierungen an bovinen Chondroblasten gezeigt, dass TE eindeutig eine Sekretionsroute über den Golgi nimmt [50]. Die hier gezeigte Kolokalisation von TE mit dem Golgi-Apparat bestätigt diese Annahme. Für die nicht gelungene Detektion von TE im ER kann es verschiedene Gründe geben. Zum einen ist TE vielleicht zu diffus oder zu gering konzentriert im ER verteilt, so dass in der Immunfluoreszenz kein eindeutiges Signal erhalten wurde. Möglicherweise tritt TE aber auch zu früheren als den hier erfassten Zeitpunkten konzentrierter im ER auf und ist daher hier schon zu weit im Sekretionsweg fortgeschritten. Allerdings werden für die Sekretionszeit von Tropoelastin in elastogenen Zellen auch ohne weitere Stimulatoren Zeiten von etwa 30 min angegeben [88, 155], so dass insbesondere nach zwei Tagen Kultur mit TGF- β 1 die Ausschüttung von TE aktiv sein sollte. Letztlich wirkt die Stimulation mit TGF-

$\beta 1$ konstant auf die Zellen ein, so dass ab dem Zeitpunkt der Zugabe selbst nach einer gewissen Anlaufphase der Proteinsynthese eigentlich zu jedem Zeitpunkt TE im ER zu detektieren sein sollte. Es ist zwar beschrieben, dass proliferative Zellen deutlich weniger TE sekretieren als konfluente ruhende Zellen [157], allerdings wurden die Zellen hier in hoher Dichte ausgesät und mindestens 72 h vor der Analyse kultiviert, so dass sie Konfluenz erreicht hatten. Dieser Aspekt für ein zu geringes intrazelluläres Vorkommen von TE kann daher ausgeschlossen werden.

Aufgrund von Vorversuchen wurde die Hypothese aufgestellt, dass TE zu relativ frühen Zeitpunkten innerhalb der Zelle lediglich umverteilt wird, ohne dass eine nennenswert größere Menge TE vorliegt. Eine Immunblotanalyse zeigt, dass bereits nach 48 h Behandlung mit TGF- $\beta 1$ eine deutlich stärkere Bande auftritt, die TE/Elastin zuzuordnen ist. Im gleichen Zeitraum wird das Fluoreszenzsignal für TE/Elastin in den entsprechenden Immunmarkierungen (siehe 9.2.2) stärker. Daher kann die aufgestellte Hypothese der Umverteilung hier verneint werden. Auch schon zu frühen Zeitpunkten nach Start der TGF- $\beta 1$ -Stimulation der Fibroblasten weisen diese eine erhöhte TE/Elastinmenge auf. Diese Ergebnisse ergänzen frühere Daten humaner dermaler Fibroblasten, die ein erhöhtes TE/Elastin-Level auf Proteinebene 7 Tage [109] bzw. 11 Tage [69] nach TGF- $\beta 1$ Stimulation zeigen.

Da TE möglicherweise zu diffus in der Zelle verteilt vorlag, um es über Immunmarkierungen intrazellulär zu lokalisieren, wurden Transportinhibitoren eingesetzt für die von Davis und Mecham ein inhibitorischer Effekt auf die TE-Sekretion in bovinen Chondroblasten beschrieben ist [50]. Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen grundsätzlich die literaturseitig beschriebenen morphologischen Effekte der Inhibitoren auf die Zellorganellen: Brefeldin A reduziert den Golgi-Apparat zu einem kleinen Punkt, wobei ein großes ER-Golgi-Fusionsorganell entsteht [65]; Monensin lässt den Golgi-Apparat fragmentiert erscheinen [66]; Bafilomycin A1 hingegen bewirkt keine Veränderungen der Organell-Morphologie [67]. Es wäre daher auch zu erwarten, dass sie einen deutlichen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung des sekretorischen TE ausüben. Eine klare Akkumulation von TE in diskreten Organellen durch die verwendeten Inhibitoren, wie Davis und Mecham [50] sie für bovine Chondroblasten aus Immunfluoreszenzmarkierungen beschreiben, konnte in diesen Experimenten an humanen dermalen Fibroblasten nicht festgestellt werden. Auch der Zusatz des Protease-Inhibitors ALLN, der einen proteolytischen

Abbau akkumulierenden TEs verhindert [88], konnte die Organell-Zuordnung nicht ermöglichen. Vergleichende Studien mit elektronenmikroskopischen Analysen mit Hilfe von Nanogold-Markierung des intrazellulären TE und ER / Golgi (ähnlich zu Hinek et al., 1995 [45]) könnten über die Sekretionsroute von TE in humanen dermalen Fibroblasten weiteren Aufschluss geben.

Die Inkubation mit Inhibitoren führte dennoch zu einer Veränderung des TE/Elastinsignals. Insbesondere Bafilomycin A1, ein Inhibitor, der spezifisch die H⁺-ATPase des V-Typs hemmt [67], ist in diesem Zusammenhang herauszuheben. Es scheint, dass durch Beeinflussung des pH-Wertes die intrazelluläre Verteilung des Elastins verändert wird. Dies korreliert mit der Identifikation von Funktionsverlustmutationen in der $\alpha 2$ Untereinheit einer H⁺-ATPase [62] in ARCL2 Patienten, in deren Fibroblasten Defekte in der Sekretion von TE beobachtet werden konnten. Vrhovski et al. beschreiben, dass mit steigendem pH-Wert die Koazervationstemperatur von Tropoelastin sinkt [158]. Im pH-Bereich zwischen 5,4 und 8,4 sinkt die Koazervationstemperatur von 42°C auf 36°C. Mit anderen Worten: im sauren pH-Bereich (unter pH 6) koazerviert Tropoelastin bei 37°C nicht, bei neutralem pH-Wert von etwa 7,4 hingegen schon. Die Ansäuerung der am Proteintransport beteiligten Organellen könnte also in HDFneo bei physiologischen Temperaturen eine frühzeitige Assemblierung von Tropoelastin noch unterhalb der Zelloberfläche verhindern. Erst das Erreichen des extrazellulären Raumes, wo ein neutraler pH-Wert herrscht, ermöglicht demnach Tropoelastin die Koazervation und die damit verbundene Faserbildung.

Die hier herausgestellten Ergebnisse aus den Immunfluoreszenzanalysen zu intrazellulärem TE müssen in weiteren Experimenten noch durch andere Methoden ergänzt werden. Da kein endogener Standard mitvermessen wird, ist die IFA in Kombination mit mikroskopischen Bildern eine semiquantitative Herangehensweise, die insbesondere von einer Färbungs- und Aufnahmecharge zu einer anderen variieren kann. Vergleiche verschiedener Bedingungen wurden daher hier nur innerhalb eines Versuchsansatzes durchgeführt. Eine sinnvolle Ergänzung zur Mikroskopie stellt subzelluläre Fraktionierung dar. Dabei werden Zellen schonend aufgebrochen und Zellorganellen durch differenzielle oder Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt [159]. Die dabei entstehenden Fraktionen werden anschließend weiter analysiert, so dass Proteine bestimmten Organellen zugeordnet

werden können [160]. Die Bestimmung der Mengen von Zielprotein und einem Markerprotein (z.B. im Immunblot) innerhalb einer Fraktion erlaubt darüber hinaus eine Quantifizierung innerhalb des Organells. Ein solcher Versuchsansatz könnte die Sekretionsroute von TE im dermalen Fibroblasten weitergehend aufschlüsseln.

10.2.3 Transduktion von HDFneo mit Citrin-Elastin zeigt funktionales Fasermmodell

Da angestrebt wurde, die Elastogenese im *Live Cell* Modus verfolgen zu können, wurde die Expression von fluoreszenzmarkiertem Elastin in HDFneo untersucht.

Durch Einsatz eines GFP-Kontroll-Plasmids konnte gezeigt werden, dass die Elektroporation zum Einbringen der Plasmid-DNA in HDFneo die für diese Zellen effizientere und verträglichere Methode war und damit der Lipofektion vorzuziehen ist. Generell zeigt sich, dass primäre Zellen (wie die hier verwendeten HDFneo) deutlich ineffizienter transfizierbar sind als Zelllinien, die aus Tumorgewebe stammen, was vermutlich mit ihren besonderen Eigenschaften wie der unendlichen Teilbarkeit einhergeht [161]. Für Zelllinien konnte eine bis zu 100-mal bessere Transfizierbarkeit demonstriert werden [161]. Für primäre dermale Fibroblasten konnte allerdings auch schon in der Literatur gezeigt werden, dass Elektroporation insbesondere aufgrund von Effizienz, aber auch aufgrund nur kleinerer Mengen benötigter DNA, anderen Transfektionsmethoden vorzuziehen ist [161].

Die Expression des durch Elektroporation eingebrachten EGFP-ELN konnte mikroskopisch nur in Teilbereichen nachgewiesen werden. Lediglich in vereinzeltten Bereichen konnte eine EGFP-Fluoreszenz detektiert werden, was auf eine sehr geringe Transfektionseffizienz hindeutet. Mit Hilfe der Neon™ Elektroporation können Plasmide mit einer Größe von 4000-7000 bp routinemäßig in Zellen eingebracht werden und auch Größen mit bis zu 20.000 bp sollten unproblematisch sein [91]. Das hier verwendete EGFP-ELN Plasmid hat eine Größe von rund 8700 bp. Es liegt damit allerdings an der oberen Grenze des empfohlenen Bereichs, so dass möglicherweise die schlechte Transfizierbarkeit der HDFneo als primäre Zellen das Einbringen der Fremd-DNA in die HDFneo zusätzlich erschwert [161]. Die restliche Fluoreszenz ist eher auf eine Autofluoreszenz der Zellen und einiger ihrer Bestandteile zurück zu führen, deren Emission mit der des GFPs überlagert [162]. Diese Fluoreszenz zeigt sich in kleinen vesikuläre Strukturen um den Zellkern herum und stammt vermutlich größtenteils von NADH in Mitochondrien oder von lysosomalen Abbauprodukten

[163]. Trotz der geringen Transfektionseffizienz von EGFP-ELN ergab die Immunblotanalyse in den transfizierten Zellen eine dem Fusionsprotein zuzuordnenden Bande bei ca. 90 kDa. Dass diese Bande in den Lysaten von transfizierten und zusätzlich mit TGF- β 1 stimulierten Zellen fehlt, ist vermutlich auf die verstärkte Expression des endogenen Elastins zurückzuführen. Da das durch Transfektion eingebrachte EGFP-ELN aufgrund des im Plasmid enthaltenen CMV-Promotors konstitutiv exprimiert wird [164] und dieser Regulation nicht unterliegt, bleibt die absolute Menge des *getaggten* TE/Elastins trotz Behandlung konstant. Für humane dermale Fibroblasten unter TGF- β 1 Stimulation ist eine starke Steigerung des TE/Elastin-Proteinlevels beschrieben [69, 109]. Bei Verwendung von gleichen Proteinmengen für die SDS-PAGE ist bei sehr geringer Transfektionseffizienz der Anteil von EGFP-ELN im Vergleich zu dem durch Stimulation stark exprimierten endogenen Elastin sehr klein und daher auf dem Immunblot vermutlich nicht mehr detektierbar.

Da vermutet wurde, dass das EGFP-ELN-Plasmid eventuell zu groß für eine effiziente Transduktion in HDFneo ist, wurde die Elektroporation ebenfalls mit dem etwas kleineren HA/His/Myc-Elastin durchgeführt. Sowohl in den transfizierten Zellen als auch in den Kontrollzellen ist nach 14-tägiger Behandlung mit TGF- β 1 in der Immunmarkierung eine deutliche Bildung von Elastinfasern zu erkennen. Dies bestätigt die Beobachtung, dass HDFneos durch TGF- β 1 *in vitro* ein prägnantes Fasernetzwerk ausbilden [69]. In den Kontrollzellen ist entsprechend den Erwartungen kein Signal für das HA-Tag erhalten worden, d.h. der Antikörper gegen das HA-Tag bindet spezifisch. In den transfizierten Zellen konnte das HA-Tag über die Antikörpermarkierung in faserartigen Strukturen detektiert werden. Da dieses Signal aber nur an vereinzelt Stellen zu finden ist, exprimieren vermutlich auch hier nur wenige Fibroblasten das HA-markierte Elastin, so dass auch hier von einer sehr geringen Transfektionseffizienz ausgegangen werden muss. Da das verwendete Plasmid mit einer Größe von rund 8000 bp immer noch recht groß ist, erscheint eine Transfektion der primären HDFneo mit Plasmiden dieser Größe grundsätzlich schwierig. Ein weiterer Grund für die nur sehr lokale Detektion von HA-Elastin könnte die nur transiente Expression des gewünschten Proteins sein, da keine weitere Selektion auf positive Zellen erfolgte. Dadurch geht die eingebrachte Fremd-DNA nach wenigen Tagen im Lauf der Zellteilungen verloren und das Zielprotein wird nicht weiter exprimiert [165, 166].

Nichtsdestotrotz lag hier das Signal für das HA-Tag, an den Stellen, wo es detektiert wurde, nahezu vollständig kolokalisiert mit dem Signal der Elastinfasern vor, wie aus der Überlagerung der Einzelsignale zu sehen ist. Die Nukleotidsequenz für Elastin wurde gewählt nach einer Elastin-Sequenz aus humanen Fibroblasten [86] und ist ergänzt durch sechs zusätzliche Aminosäuren des Exons 24A [87]. Auf Grund der Kolokalisation des HA-Tags mit dem TE/Elastin-Signal kann die ursprünglich gewählte Elastin-Sequenz als funktional eingestuft werden, d.h. getaggetes TE wird von den HDFneo im in vitro Modell in die Elastinfasern eingelagert. Inwiefern das *getaggte* Elastin insbesondere durch Desmosin- und Isodesmosin-Crosslinks auch Eigenschaften reifer elastischer Fasern annimmt [32, 74], könnte durch Analyse des Desmosin/Isodesmosin-Gehaltes [69, 167] oder Bestimmung der elastinspezifischen Autofluoreszenz [69, 168] untersucht werden.

Da das physikalische Einbringen von Plasmiden in HDFneo nur bedingt erfolgreich war, wurde auf die biologische Methode der lentiviralen Transduktion zurückgegriffen, um ein Citrin-markiertes Elastin in HDFneo zu exprimieren. Diese Methode hat außerdem den Vorteil einer stabilen Transduktion [165, 169], so dass bei mehrtägiger Kulturdauer das Zielprotein dauerhaft exprimiert wird. Citrin-TE konnte in transduzierten Zellen schon zu frühen Zeitpunkten detektiert werden. Nach 14-tägiger Kulturdauer unter TGF- β 1-Stimulation wies die Aufnahme des Citrins- und des TE/Elastin-Signals am CLSM eine eindeutige Kolokalisation beider Signale auf. Damit konnte klar nachgewiesen werden, dass das synthetische Citrin-Elastin im Zellkulturmodell bei gleichzeitiger Stimulation mit TGF- β 1 in die Elastinfaser eingebaut wurde. Dies ist das erste Modell, das die Expression von fluoreszenzmarkiertem humanem Elastin im Kontext humaner dermaler Zellen zeigt und zudem eine wirkliche Faserbildung über 14 Tage Kulturdauer beschreibt. Kozel et al. nutzen Lungenfibroblasten aus Ratten zur transienten Expression von bovinem TE mit dem Fluoreszenzprotein Timer, um frühe Stadien der Elastogenese zu beschreiben [41]. Die Ausbildung eines Elastinnetzwerkes über eine längere Kulturdauer ist nicht gezeigt. Andere Forschungsgruppen nutzten dagegen die Transfektion mit TE-Konstrukten, um zu zeigen, dass sich die Überexpression von Elastin positiv auf den Krankheitsverlauf nach einem Bauchortenaneurysma [70] oder nach einem Myokardinfarkt [170, 171] auswirkt. Ein organisiertes Netzwerk gebildeter elastischer Fasern der jeweiligen Konstrukte ist aber auch hier nicht gezeigt.

Anzumerken ist, dass für die Aufnahme des Antikörper-TE/Elastinsignals in den transduzierten Zellen die Laserleistung im Vergleich zur Kontrolle deutlich reduziert wurde, um die Aufnahme nicht zu überstrahlen. Dies bedeutet, dass dort vermutlich insgesamt mehr Elastin vorlag. Somit kann rückgeschlossen werden, dass das Citrin-Elastin zusätzlich zum endogenen Elastin exprimiert wurde und ebenfalls durch den Antikörper erkannt wurde. Da Citrin-Elastin unter Kontrolle eines CMV-Promoters konstitutiv exprimiert wird, unterliegt es erwartungsgemäß nicht der Regulation durch TGF- β 1 [164].

Die Genexpressionsanalysen mit einem Pool stabil transfizierter HDFneo zeigten, dass Elastin auch in Passage zwei nach Transduktion deutlich überexprimiert wird, wobei diese Induktion stärker ist als die 24-stündige Inkubation der untransduzierten Fibroblasten mit TGF- β 1. Die beobachtbare Induktion von Elastin durch TGF- β 1-Zugabe in den Citrin-ELN exprimierenden Zellen ist nicht signifikant und kann der Induktion des endogenen Elastins zugeschrieben werden [69, 109].

Um zu überprüfen, ob weitere Faserkomponenten durch die Überexpression von Elastin beeinflusst werden, wurde exemplarisch Fibrillin-1 als wesentlicher Bestandteil der elastischen Faser [32, 74, 158, 172] heraus gegriffen und das jeweilige Expressionsniveau bestimmt. Die Transduktion von Fibroblasten mit Citrin-ELN hat auf die relative Genexpression von Fibrillin-1 keinen Einfluss. Dass beide Zelltypen gleichermaßen auf die Stimulation durch TGF- β 1 reagieren, stellt heraus, dass auch die transduzierten Zellen trotz der Überexpression von Elastin in der Lage sind auf diesen exogenen Stimulus zu reagieren. Eine literaturseitig beschriebene Induktion von Fibrillin-1 in Hautfibroblasten durch TGF- β 1 [69, 173] konnte hier also unabhängig von der Transduktion bestätigt werden. Ergänzend zur Detektion des Citrins auf mRNA-Ebene in den transduzierten Zellen, zeigte der Immunblot eine Bande bei 90 kDa, die das fusionierte Protein aus Citrin und TE/Elastin repräsentiert. Sowohl der Blot als auch die qRT-PCR bestätigen, dass die Expression von Citrin-TE nicht der Regulation durch TGF- β 1 unterliegt. Im Blot ist eine zusätzliche Bande bei 60 kDa für das endogene *ungetaggte* TE/Elastin zu erwarten. Dass diese fehlt, könnte auf einen sehr geringen Anteil von endogenem TE/Elastin an der Gesamtproteinmenge zurückzuführen sein.

Das MEF-Modell der Citrin-TE exprimierenden Zellen wurde auf Proteinebene mit Hilfe von IFAs weitergehend analysiert. Dabei war insbesondere von Interesse, inwieweit

die alleinige Überexpression von Elastin auch ohne weiteren Stimulus durch TGF- β 1 eine Faserbildung zeigen würde. Die semiquantitative Auswertung auf Proteinebene zeigte grundsätzlich in den Tendenzen ein analoges Ergebnis zur Genexpression, allerdings mit sehr viel größeren Auslenkungen. Auf mRNA Ebene lagen zum Beispiel die Elastin-Level für transduzierte und nicht transduzierte Zellen dichter beieinander. Allerdings wurde da nur ein Zeitraum von 24 h TGF- β 1 Stimulation betrachtet, wobei die qRT-PCR-Analyse auch nur den *steady state* der aktuellen mRNA-Menge misst [174]. In der Immunmarkierung wird hingegen alles Protein detektiert, was innerhalb der 14-tägigen Kulturdauer extrazellulär abgelagert wurde, wodurch sich trotz in der Genexpression geringerer Unterschiede eine sehr viel größere Differenz auf Proteinebene ausbilden kann. Mit den transduzierten TGF- β 1 behandelten Zellen als Referenz ist TE/Elastin daher in den untransduzierten Zellen nahezu nicht detektierbar, wohingegen in den transduzierten Zellen ein prägnantes Netzwerk erhalten wurde. Ein Effekt von TGF- β 1 war nach der zweiwöchigen Kulturdauer im Gegensatz zur Genexpressionsanalyse hier nicht mehr detektierbar. Die durch Überexpression nach Transduktion abgelagerte Menge TE/Elastin scheint die endogene Elastin-Expression deutlich zu überlagern. Dies bestätigt das Ergebnis des Westernblots, in dem nur das Fusionsprotein, nicht aber das endogene TE/Elastin detektiert werden konnte.

Die Immunfluoreszenzanalyse und die semiquantitative Bildauswertung der transduzierten HDFneo zeigen insbesondere, dass die Überexpression von Elastin in diesem *in vitro* Modell ausreichend ist, um ein Elastinfaser-Netzwerk auszubilden, ohne dass weitere Faserkomponenten induziert werden. Neben dem Tropoelastin-Monomer werden in der Literatur eine Reihe weiterer Komponenten beschrieben, die für die erfolgreiche Elastogenese von Bedeutung sind [31, 32, 74]. Für die Sekretion des TE-Monomers in den extrazellulären Raum wird die Notwendigkeit des 67 kDa großen EBPs postuliert, das TE intrazellulär bindet und als eine Art *Shuttle* TE bis zur Zelloberfläche transportiert [44, 45]. Fibulin-5 ist ein Glykoprotein, das an der Grenzfläche zwischen elastischer Faser, Zelle und Mikrofibrillen zu finden ist und als „Organisator“ kritisch für die Elastogenese ist [175–178], wie insbesondere der Cutis Laxa Phänotyp in Fibulin-5 Knockout-Mäusen zeigt [175]. Das Enzym LOXL katalysiert in der Reifung der elastischen Faser die Ausbildung von Elastin-Crosslinks [179] und kann ein limitierender Faktor der Elastogenese sein [179, 180]. In dem hier vorgestellten Modell reicht aber die Überexpression von Elastin aus, um ein

Netzwerk elastischer Fasern zu generieren. Zumindest in den verwendeten dermalen neonatalen Fibroblasten scheint es demnach keine weiteren die Elastogenese limitierenden Faktoren zu geben. Ob sich die Überexpression von Elastin auf die erwähnten Komponenten der Elastogenese tatsächlich nicht auswirkt, müssten entsprechende Gen- und Proteinanalysen (ergänzend zur hier durchgeführten Analyse von Fibrillin-1) beweisen.

Citrin war in der Immunfluoreszenz ebenso wie auf mRNA-Ebene in untransduzierten Zellen erwartungsgemäß nicht messbar. Für die Citrin-Elastin transduzierten Fibroblasten war die relative Flächenbelegung von Citrin mit TGF- β 1 Behandlung etwa viermal höher als ohne Stimulation. Genexpressionsanalyse und Immunblot hatten gezeigt, dass die Expression des Fusionsproteins in dem untersuchten Zeitraum von 24 h bzw. 3 Tagen unabhängig von TGF- β 1 ist. In der Immunfluoreszenz zeigte sich nun, dass Citrin durch 14-tägige Inkubation der Fibroblasten mit TGF- β 1 etwa 5-fach stärker abgelagert wurde. Es wurde gezeigt, dass zwar die Überexpression von Elastin allein zu der Ausbildung fibrillärer Elastinfasern führt, aber die verstärkte Deposition von Citrin-Elastin deutet an, dass TGF- β 1, abgesehen von Fibrillin-1, weitere Komponenten der Elastogenese stimuliert. Im in vitro Modell induziert TGF- β 1 in HDFneo neben TE und Fibrillin-1 auch Fibulin-5 und LOX [69]. Ein Immunblot mit Proben aus unterschiedlich langer TGF- β 1 Stimulation könnte in densitometrischer Analyse zeigen, ob sich über die lange Kulturdauer von 14 Tagen tatsächlich ein Unterschied in der Menge abgelagerten Citrin-TE/Elastins entwickelt, der durch Genexpressionsanalyse und Immunblot zu frühen Zeitpunkten nicht detektiert werden konnte.

10.2.4 Überexpression von Citrin-ELN in adulten Fibroblasten

Da neonatale und Fibroblasten junger Spender generell eine höhere Fähigkeit der Elastinfaserbildung besitzen als Fibroblasten alter Spender [36, 108–110], wurden in einem parallelen Ansatz neonatale und adulte Fibroblasten transduziert, um deren Elastinfaserbildung durch Überexpression von fluoreszenzmarkiertem Elastin zu vergleichen.

Die Immunmarkierung der HDFneo aus dem parallelen Ansatz mit den adulten Fibroblasten zeigte die gleichen Strukturen, wie sie in den vorangegangenen

Experimenten mit HDFneo zu beobachten waren und schon im vorangegangenen Abschnitt diskutiert wurden.

Die untransduzierten adulten Fibroblasten zeigten unter Stimulation mit TGF- β 1 eine Induktion der Elastin- und der Fibrillin-1-mRNA und in der Immunfluoreszenz eine stärkere Ausbildung elastischer Fasern. Dies bestätigt, dass auch adulte primäre Zellen durch TGF- β 1 in vitro zur Elastogenese angeregt werden können [69].

In den transduzierten adulten Fibroblasten war insbesondere auffällig, dass kein oder nur ein sehr schwaches Citrin Fluoreszenzsignal messbar war. Obwohl Citrin als Protein in den Fluoreszenzaufnahmen nahezu nicht zu detektieren war, konnte es auf mRNA-Ebene in den transduzierten Zellen nachgewiesen werden, wohingegen die gleiche Sonde in den untransduzierten Fibroblasten erwartungsgemäß keine Transkripte detektieren konnte. Dies zeigt, dass die Transduktion auch in den adulten Fibroblasten erfolgreich verlaufen ist. Unterstützt wird dieses Ergebnis dadurch, dass die transduzierten adulten Fibroblasten nach 14-tägiger Kultivierung auch ohne weitere Stimulation eine deutliche Induktion der Elastin mRNA und ein prägnantes Netzwerk von Elastinfasern aufwiesen, das durch TGF- β 1 keine konkrete Veränderung erfuhr. Das fehlende Citrin-Fluoreszenzsignal kann also nicht auf eine fehlgeschlagene Transduktion zurückzuführen sein.

Das Fusionsprotein scheint in den adulten Fibroblasten einer Modifikation ausgesetzt zu sein, die zum Verlust der Fluoreszenz führt, so dass Citrin nach 14-tägiger Kultivierungsdauer in der CLSM-Aufnahme nicht detektiert werden kann. Denkbar wäre eine Modifikation auf mRNA-Ebene, die zu einer Trennung des für Citrin- von dem für Elastin-codierenden Abschnitt führt, so dass zwei getrennte Proteine entstehen. Dies würde erklären, warum die Sonde in der qRT-PCR Citrin-mRNA detektiert, aber kein Citrin in die Faser eingelagert wird. Ein Primerpaar, das in der qRT-PCR über die Linkersequenz zwischen Elastin und Citrin hinausgeht, könnte diesen Aspekt aufklären. Eine proteolytische Spaltung des Fusionsproteins, z.B. durch Abspaltung des Citrins, könnte dieses Phänomen ebenfalls hervorrufen. Warum eine Modifikation allerdings in den adulten, nicht aber den neonatalen Fibroblasten auftreten sollte, kann an dieser Stelle nicht beantwortet werden.

Für Fibroblasten alter Spender sind in der Literatur verschiedene Aspekte einer gestörten Elastogenesefähigkeit gezeigt. Zum einen eine verringerte Menge an TE

selbst [36, 108], zum anderen eine verringerte Elastin mRNA Stabilität, die zu einer stark verringerten TE-Proteinmenge führt [109]. Fibulin-5, ein wichtiger Organisator der Elastogenese [177], liegt im Alter stark reduziert vor [178] oder ist in ex vivo Hautbiopsien nahezu nicht zu detektieren [181]. Auch die Expression des *Crosslink*-Enzyms LOXL ist reprimiert und stellt ein potenzielles Target zur Wiederherstellung der Elastogenese in adulter Haut dar [180]. Nichtsdestotrotz ist die Überexpression von Elastin hier ausreichend, um ein Fasernetzwerk in adulten Fibroblasten alter Spender zu generieren, wobei die Expression von Fibrillin-1, als Beispiel anderer Faserkomponenten, hier ebenfalls nicht beeinträchtigt ist. Eine umfassende Analyse weiterer an der Elastogenese beteiligter Moleküle sollte zur Bestätigung dieses Ergebnisses ergänzend durchgeführt werden.

Die adulten Fibroblasten zeigten ebenso faserige Strukturen von Fibrillin-1, die kolokalisiert mit TE/Elastin vorlagen. Diese lagen im Vergleich zu den Proben der neonatalen Fibroblasten sehr viel weniger gerichtet vor und wirkten deformiert. Statt feiner gleichmäßiger Fasern fanden sich hier vielmehr verdickte und gewundene Strukturen, ohne eine eindeutige Orientierung. Für die Fibrillogenese und Ablagerung von Fibrillin-1 ist das extrazelluläre Glykoprotein Fibronectin der entscheidende Faktor [182]. In gealterter Haut von Mäusen konnte eine gestörte Fibronectin-Ablagerung gezeigt werden [183]. Daher könnte das hier beobachtete veränderte Fibrillin-1-Gerüst in einer altersbedingten Fehlbildung der Fibronectinstrukturen begründet sein. Das abgelagerte TE/Elastin wies ebenfalls keine homogen orientierte Morphologie auf, sondern bildete in gleicherweise verdickte und verkrümmte Strukturen, unabhängig von TGF- β 1-Behandlung oder Transduktion. Diese von den HDFneo abweichende Fasermorphologie spiegelt möglicherweise auch die altersbedingten Veränderungen in LOXL [180] beziehungsweise Fibulin-5 [181] wieder.

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass zwar die Induktion von Elastin für die Elastinfaser-Bildung eine notwendige Voraussetzung ist, dass aber für die Struktur und Morphologie des Fasernetzwerkes insbesondere das mikrofibrilläre Grundgerüst und ggf. weitere hier nicht untersuchte Komponenten entscheidend sind. Eine Stimulation der Elastogenese scheint damit nur dann sinnvoll, wenn die extrazelluläre Matrix intakt ist, d.h. ein gesundes Grundgerüst zur Ablagerung des Tropoelastins

bildet, und wenn alle weiteren Komponenten zur koordinierten Faserbildung und –reifung vorhanden sind.

10.2.5 Ultrastruktur der in vitro gebildeten elastischen Faser

Mit Hilfe der hochauflösenden GSD-Mikroskopie wurde im Vergleich mit CLSM-Aufnahmen die Ultrastruktur der in vitro gebildeten Citrin-Elastinfaser analysiert. In CLSM-Aufnahmen zeigte die Vergrößerung von Bereichen bzw. Strukturen des mikrofibrillären Netzwerks, die stark mit Citrin beladen waren, dass die Feinstruktur der Fasern sich als Fibrillin-1-Faser darstellte, die mit globulären Citrin-Elastin Strukturen beladen zu sein scheint, und weniger ein amorpher Kern von Elastin ist, der von einer äußeren Schicht Mikrofibrillen umgeben ist [31, 32, 75, 158], wie es häufig aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen der elastischen Faser [71–77] beschrieben wird.

Ähnliche Fasermorphologien, wie sie im CLSM zu detektieren waren, finden sich auch in den GSD-Aufnahmen wieder. Citrin-Elastin erscheint als globuläre Struktur, das das Netzwerk der Mikrofibrillen säumt. Diese Art der strukturellen Organisation ist als Teil eines Modells zur Bildung elastischer Fasern in Studien zur Interaktion von Fibrillin-1 mit Tropoelastin bereits beschrieben worden [158], wonach bestimmte Bindestellen auf dem Mikrofibrillen-Grundgerüst als Anker für die Tropoelastin-Ablagerung dienen.

Darüber hinaus erscheinen die Mikrofibrillen selber perlenartig in den GSD-Aufnahmen. Dies könnte der hohen Auflösung der Aufnahmemethode bei gleichzeitiger unzureichender Bedeckung der Struktur mit Primärantikörper in der Immunmarkierung geschuldet sein. Allerdings legen detaillierte strukturelle Analysen Fibrillin-reicher Mikrofibrillen nahe, dass ungespannte Mikrofibrillen eine Periodizität von etwa 56 nm besitzen, die sich auch in den Bindestellen des monoklonalen anti-Fibrillin-1-Antikörpers 11C1.3 niederschlägt [73]. Da hier der gleiche Antikörper zur Detektion von Fibrillin-1 eingesetzt wurde, könnte die perlenartige Struktur, die in den GSD-Aufnahmen für Fibrillin-1 beobachtbar ist, eben diese Periodizität wiedergeben, da sich die Auflösung in der GSD-Mikroskopie typischerweise für organische Farbstoffe (wie der des Sekundärantikörpers) zwischen 20-30 nm bewegt [83].

Die GSD-Mikroskopie erweist sich daher also als leistungsfähige Methode, um die Substruktur von extrazellulären Faserproteinen zu untersuchen. Zur abschließenden

Bewertung ist allerdings ein direkter Vergleich der GSD-Mikroskopie mit der klassischen Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) nötig. Als hilfreich dabei könnten sich zukünftig Fluoreszenzproteine wie das miniSOG erweisen [184]. Dies sind modifizierte Fluoreszenzproteine, die als *Tag* eines Zielproteins in der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden können, aber nach Fixierung und spezieller Behandlung einen elektronendichten Niederschlag bilden, der eine TEM Analyse der exakt gleichen Probe ermöglicht.

11 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern wichtige Erkenntnisse im Rahmen wissenschaftlicher und kosmetischer Fragestellungen.

Es konnten eindeutige Hinweise gewonnen werden, dass TLR 3 in den Keratinozyten der humanen Epidermis eine über die Rolle als Immunrezeptor hinausgehende Funktion einnimmt. Ein Aspekt der hier vorgestellten Daten ist eine potenzielle Interferenz der TLR 3-Aktivierung mit der Differenzierung der epidermalen Keratinozyten im Sinne eines Erhalts des basalen Status. Über welche Signalwege diese Wechselwirkung *downstream* von TLR 3 verläuft, muss in weiteren Experimenten untersucht werden, beispielsweise über Knockdown-Experimente potenziell beteiligter Signalmoleküle. Welche Auswirkungen die Aktivierung von TLR 3 bzw. dessen Knockdown auf die Ausbildung der Hautbarriere hat, sollte im 3D-Hautmodell untersucht werden. Hier könnte analysiert werden, ob sich durch Knockdown oder Aktivierung des Rezeptors die Dicke der Epidermis verändert. Dies könnte weiterführende Erkenntnisse liefern, ob sich der Erhalt des basalen Status insbesondere in gealterter Haut günstig auf die Hautbarriere auswirkt. Besonders relevant ist die Erkenntnis, dass der *ex vivo* gemessene TLR 3-Level stark mit der *in vivo* bestimmten Sensibilität gegenüber UV-Strahlung korreliert. Dies unterstreicht die Bedeutung von TLR 3 als Sensor für UV-Schaden und damit maßgeblichem Trigger von Sonnenbrand und konnte hier als ergänzender die MED eines Individuums bestimmender Faktor herausgearbeitet werden. Die Erforschung der *downstream*-liegenden Signalkaskaden kann klären, ob ein Einleiten oder Erhalt nötiger Reparaturprozesse nach Schädigung auch ohne die unerwünschte Rötung der Entzündung möglich ist. Für kosmetische Produkte im Bereich des Sonnenschutzes und der Regeneration UV-gestresster Haut wäre dies ein äußerst relevanter Aspekt.

In der Dermis ist das Gerüst elastischer Fasern von besonderem kosmetischem Interesse. Hier konnte erstmals ein Zellkulturmodell etabliert und charakterisiert werden, das ein fluoreszentes funktionales Netzwerk humaner elastischer Fasern zeigt. Dabei hat die alleinige Überexpression von Elastin nicht nur in neonatalen sondern auch in adulten Fibroblasten ausgereicht, um elastische Fasern auszubilden. Dabei scheint das extrazelluläre Mikrofibrillengerüst (ggf. im Zusammenspiel mit weiteren Komponenten) der entscheidende Faktor zu sein. Die Aussaat Citrin-Elastin-überexprimierender adulter Fibroblasten auf ein intaktes (durch

neonatale Zellen gebildetes) Mikrofibrillengerüst könnte dazu weitere wichtige Erkenntnisse liefern. Das fluoreszente Netzwerk könnte bei Untersuchungen zu degradierten Netzwerken auch zur Unterscheidung alter und neuer elastischer Fasern dienen. Ein enzymatisch degradiertes Netzwerk neonataler nicht-fluoreszierender elastischer Fasern könnte als Gerüst für neue fluoreszierende Fasern dienen und so die Auswirkungen der Faserschädigung für die Ausbildung neuer Fasern verdeutlichen. Das vorgestellte Modell kann darüber hinaus im *Live Cell Imaging* eingesetzt werden, um die Kinetik von Faserbildung und/oder Degradation in Echtzeit verfolgen zu können, oder aber für weitere ultrastrukturelle Untersuchungen dienen und somit tiefere Erkenntnisse zum Ablauf der humanen dermalen Elastogenese liefern.

Die hier erhobenen Daten zur Rolle von TLR 3 in der Epidermis und das vorgestellte Modell des fluoreszenten Netzwerks elastischer dermalen Fasern liefern damit relevante Befunde und neue Aspekte für wissenschaftliche Fragestellungen und kosmetische Anwendungen.

12 Literaturverzeichnis

- [1] Sontheimer, R. D. Skin Is Not the Largest Organ. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 581–582 (2014).
- [2] Hwa, C., Bauer, E. A. & Cohen, D. E. Skin biology. *Dermatol. Ther.* **24**, 464–70 (2011).
- [3] Kanitakis, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur. J. Dermatol.* **12**, 390–9; quiz 400–1 (2002).
- [4] Iizuka, H. Epidermal turnover time. *J. Dermatol. Sci.* **8**, 215–217 (1994).
- [5] Lindwall, G. *et al.* Heavy water labeling of keratin as a non-invasive biomarker of skin turnover in vivo in rodents and humans. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 841–8 (2006).
- [6] Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 328–40 (2005).
- [7] Uitto, J. Understanding Premature Skin Aging. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1463–1465 (1997).
- [8] Naylor, E. C., Watson, R. E. B. & Sherratt, M. J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* **69**, 249–256 (2011).
- [9] Baumann, L. Skin ageing and its treatment. *J. Pathol.* **211**, 241–51 (2007).
- [10] Kligman, A. M. Perspectives and Problems in Cutaneous Gerontology. *J. Invest. Dermatol.* **73**, 39–46 (1979).
- [11] Orentreich, N. & Selmanowitz, V. J. Section of biological and medical sciences: levels of biological functions with aging. *Trans. N. Y. Acad. Sci.* **31**, 992–1012 (1969).
- [12] Ghadially, R. *et al.* The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J. Clin. Invest.* **95**, 2281–90 (1995).
- [13] Moriwaki, S. & Takahashi, Y. Photoaging and DNA repair. *J. Dermatol. Sci.* **50**, 169–76 (2008).
- [14] Miller, L. S. & Modlin, R. L. Toll-like receptors in the skin. *Semin. Immunopathol.* **29**, 15–26 (2007).
- [15] Kawai, T. & Akira, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* **11**, 373–84 (2010).
- [16] Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Semin. Immunol.* **19**, 24–32 (2007).
- [17] Uchi, H. *et al.* Cytokines and chemokines in the epidermis. *J. Dermatol. Sci.* **24**, S29–S38 (2000).
- [18] Lebre, M. C. *et al.* Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 331–41 (2007).
- [19] Jacobs, B. L. & Langland, J. O. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* **219**, 339–49 (1996).

- [20] Alexopoulou, L. *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732–738 (2001).
- [21] Endosomal Toll-like receptor (TLR) signaling pathways. at <https://mutagenetix.utsouthwestern.edu/phenotypic/phenotypic_rec.cfm?pk=707>
- [22] Blasius, A. L. & Beutler, B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305–15 (2010).
- [23] Kalali, B. N. *et al.* Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling. *J. Immunol.* **181**, 2694–704 (2008).
- [24] Li, X., Jiang, S. & Tapping, R. I. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* **49**, 1–9 (2010).
- [25] Bernard, J. J. *et al.* Ultraviolet radiation damages self noncoding RNA and is detected by TLR3. *Nat. Med.* **18**, 1286–90 (2012).
- [26] Borkowski, A. W. *et al.* Activation of TLR3 in keratinocytes increases expression of genes involved in formation of the epidermis, lipid accumulation, and epidermal organelles. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2031–40 (2013).
- [27] Akiyama, M. The roles of ABCA12 in epidermal lipid barrier formation and keratinocyte differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 435–40 (2014).
- [28] Jensen, J. M. *et al.* Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J. Clin. Invest.* **104**, 1761–70 (1999).
- [29] Feingold, K. R. & Elias, P. M. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 280–94 (2014).
- [30] Lin, Q. *et al.* Toll-like receptor 3 ligand polyinosinic:polycytidylic acid promotes wound healing in human and murine skin. *J. Invest. Dermatol.* **132**, 2085–92 (2012).
- [31] Kielty, C. M. Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev. Mol. Med.* **8**, 1–23 (2006).
- [32] Wagenseil, J. E. & Mecham, R. P. New insights into elastic fiber assembly. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* **81**, 229–40 (2007).
- [33] Votteler, M. *et al.* Elastogenesis at the onset of human cardiac valve development. *Development* **140**, 2345–2353 (2013).
- [34] Kelleher, C. M., McLean, S. E. & Mecham, R. P. Vascular extracellular matrix and aortic development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **62**, 153–88 (2004).
- [35] Sherratt, M. J. Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age (Dordr.)* **31**, 305–25 (2009).
- [36] Boraldi, F. *et al.* Comparison of ex vivo and in vitro human fibroblast ageing models. *Mech. Ageing Dev.* **131**, 625–35 (2010).
- [37] Wise, S. G. & Weiss, A. S. Tropoelastin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 494–7 (2009).

- [38] Kozel, B. A. *et al.* Domains in tropoelastin that mediate elastin deposition in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* **278**, 18491–8 (2003).
- [39] Bax, D. V *et al.* Cell adhesion to tropoelastin is mediated via the C-terminal GRKRK motif and integrin alphaVbeta3. *J Biol Chem* **284**, 28616–28623 (2009).
- [40] Lee, P. *et al.* A novel cell adhesion region in tropoelastin mediates attachment to integrin α V β 5. *J. Biol. Chem.* **289**, 1467–77 (2014).
- [41] Kozel, B. A. *et al.* Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *J. Cell. Physiol.* **207**, 87–96 (2006).
- [42] Rodgers, U. R. & Weiss, A. S. Integrin alpha v beta 3 binds a unique non-RGD site near the C-terminus of human tropoelastin. *Biochimie* **86**, 173–8 (2004).
- [43] Broekelmann, T. J. *et al.* Tropoelastin interacts with cell-surface glycosaminoglycans via its COOH-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 40939–47 (2005).
- [44] Murphy, B. A. *et al.* The hyperthermia-enhanced association between tropoelastin and its 67-kDa chaperone results in better deposition of elastic fibers. *J. Biol. Chem.* **285**, 40282–93 (2010).
- [45] Hinek, A., Keeley, F. W. & Callahans, J. Recycling of the 67-kDa Elastin Binding Protein in Arterial Myocytes Is Imperative for Secretion of Tropoelastin. *Exp. Cell Res.* **220**, 312–324 (1995).
- [46] Hinek, A. *et al.* Impaired elastic-fiber assembly by fibroblasts from patients with either Morquio B disease or infantile GM1-gangliosidosis is linked to deficiency in the 67-kD spliced variant of beta-galactosidase. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 23–36 (2000).
- [47] Partridge, S. M. *et al.* Biosynthesis of the desmosine and isodesmosine cross-bridges in elastin. *Biochem. J.* **93**, 30C–33C (1964).
- [48] Alberts, B. *et al.* *Molecular Biology of the Cell.* (Garland Science, 2002).
- [49] Grosso, L. E. & Mecham, R. P. In vitro processing of tropoelastin: Investigation of a possible transport function associated with the carboxy-terminal domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **153**, 545–551 (1988).
- [50] Davis, E. C. & Mecham, R. P. Intracellular Trafficking of Tropoelastin. *Matrix Biol.* **17**, 245–254 (1998).
- [51] Clarke, A. W. *et al.* Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry* **45**, 9989–96 (2006).
- [52] Hinek, a & Rabinovitch, M. 67-kD elastin-binding protein is a protective ‘companion’ of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J. Cell Biol.* **126**, 563–74 (1994).
- [53] Davis, E. C. *et al.* Identification of tropoelastin as a ligand for the 65-kD FK506-binding protein, FKBP65, in the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **140**, 295–303 (1998).
- [54] Hinek, A. *et al.* Lysosomal sialidase (neuraminidase-1) is targeted to the cell surface in a multiprotein complex that facilitates elastic fiber assembly. *J. Biol. Chem.* **281**, 3698–710 (2006).

- [55] Hahn, C. N. *et al.* Generalized CNS disease and massive G(M1)-ganglioside accumulation in mice defective in lysosomal acid β -galactosidase. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 205–211 (1997).
- [56] Patterson, C. E. *et al.* Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3925–35 (2000).
- [57] Cheung, K. L. Y., Bates, M. & Ananthanarayanan, V. S. Effect of FKBP65, a putative elastin chaperone, on the coacervation of tropoelastin in vitro. *Biochem. Cell Biol.* **88**, 917–25 (2010).
- [58] Miao, M. *et al.* Elastin binding protein and FKBP65 modulate in vitro self-assembly of human tropoelastin. *Biochemistry* **52**, 7731–41 (2013).
- [59] Gan, S. D. & Runger, T. M. Dermal fibroblasts internalize elastin to lysosomes via the elastin-binding protein of the elastin-laminin receptor. *J. Dermatol. Sci.* **61**, 60–2 (2011).
- [60] Codriansky, K. A. *et al.* Intracellular degradation of elastin by cathepsin k in skin fibroblasts - A possible role in photoaging. *Photochem. Photobiol.* **85**, 1356–1363 (2009).
- [61] Mohamed, M. *et al.* Metabolic cutis laxa syndromes. *J. Inherit. Metab. Dis.* **34**, 907–16 (2011).
- [62] Huchtagowder, V. *et al.* Loss-of-function mutations in ATP6V0A2 impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2149–65 (2009).
- [63] Hinek, A. & Wilson, S. E. Impaired elastogenesis in Hurler disease: dermatan sulfate accumulation linked to deficiency in elastin-binding protein and elastic fiber assembly. *Am. J. Pathol.* **156**, 925–938 (2000).
- [64] Klausner, R. D., Donaldson, J. G. & Lippincott-Schwartz, J. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell Biol.* **116**, 1071–80 (1992).
- [65] Lippincott-Schwartz, J. *et al.* Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER. *Cell* **56**, 801–13 (1989).
- [66] Tartakoff, A. M. Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. *Cell* **32**, 1026–1028 (1983).
- [67] Johnson, L. S. *et al.* Endosome acidification and receptor trafficking: bafilomycin A1 slows receptor externalization by a mechanism involving the receptor's internalization motif. *Mol. Biol. Cell* **4**, 1251–66 (1993).
- [68] Bowman, E. J., Siebers, A. & Altendorf, K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 7972–6 (1988).
- [69] Sommer, N. *et al.* A tissue-engineered human dermal construct utilizing fibroblasts and transforming growth factor β 1 to promote elastogenesis. *Biotechnol. J.* **8**, 317–26 (2013).
- [70] Xiong, J. *et al.* Elastic fibers reconstructed using adenovirus-mediated expression of tropoelastin and tested in the elastase model of abdominal aortic

- aneurysm in rats. *J. Vasc. Surg.* **48**, 965–73 (2008).
- [71] Gheduzzi, D. *et al.* Heparan sulphate interacts with tropoelastin, with some tropoelastin peptides and is present in human dermis elastic fibers. *Matrix Biol.* **24**, 15–25 (2005).
- [72] Baldock, C. *et al.* The supramolecular organization of fibrillin-rich microfibrils. *J. Cell Biol.* **152**, 1045–56 (2001).
- [73] Kielty, C. M. *et al.* Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **357**, 207–17 (2002).
- [74] Kielty, C. M., Sherratt, M. J. & Shuttleworth, C. A. Elastic fibres. *J. Cell Sci.* **115**, 2817–28 (2002).
- [75] Pasquali-Ronchetti, I. & Baccarani-Contri, M. Elastic fiber during development and aging. *Microsc. Res. Tech.* **38**, 428–435 (1997).
- [76] Tsuji, T. The surface structural alterations of elastic fibers and elastotic material in solar elastosis: a scanning electron microscopic study. *J. Cutan. Pathol.* **11**, 300–308 (1984).
- [77] Greenlee, T. K., Ross, R. & Hartman, J. L. The fine structure of elastic fibers. *J. Cell Biol.* **30**, 59–71 (1966).
- [78] Huang, B., Babcock, H. & Zhuang, X. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* **143**, 1047–1058 (2010).
- [79] Schermelleh, L., Heintzmann, R. & Leonhardt, H. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* **190**, 165–75 (2010).
- [80] Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Arch. für Mikroskopische Anat.* **9**, 413–418 (1873).
- [81] Fölling, J. *et al.* Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat. Methods* **5**, 943–5 (2008).
- [82] Hell, S. W. & Kroug, M. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* **60**, 495–497 (1995).
- [83] Dempsey, G. T. *et al.* Evaluation of fluorophores for optimal performance in localization-based super-resolution imaging. *Nat. Methods* **8**, 1027–36 (2011).
- [84] Jensen, N. A. *et al.* Coordinate-targeted and coordinate-stochastic super-resolution microscopy with the reversibly switchable fluorescent protein Dreiklang. *Chemphyschem* **15**, 756–62 (2014).
- [85] Ushiki, T. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch. Histol. Cytol.* **65**, 109–26 (2002).
- [86] Zhang, M. C. *et al.* Cutis laxa arising from frameshift mutations in exon 30 of the elastin gene (ELN). *J. Biol. Chem.* **274**, 981–986 (1999).
- [87] Fazio, M. J. *et al.* Cloning of full-length elastin cDNAs from a human skin fibroblast recombinant cDNA library: further elucidation of alternative splicing utilizing exon-specific oligonucleotides. *J. Invest. Dermatol.* **91**, 458–64 (1988).
- [88] Davis, E. C. & Mecham, R. P. Selective Degradation of Accumulated Secretory

- Proteins in the Endoplasmic Reticulum. *J. Biol. Chem.* **271**, 3787–3794 (1996).
- [89] Poumay, Y. & Pittelkow, M. R. Cell Density and Culture Factors Regulate Keratinocyte Commitment to Differentiation and Expression of Suprabasal K1/K10 Keratins. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 271–276 (1995).
- [90] Weaver, J. C. & Chizmadzhev, Y. A. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry Bioenerg.* **41**, 135–160 (1996).
- [91] Neon® Transfection System. at https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/neon_device_man.pdf
- [92] Lipofectamine® 2000 Reagent. at https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Lipofectamine_2000_Reagent_protocol.pdf
- [93] Pfaffl, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* **1**, 92–95 (2004).
- [94] Fleige, S. & Pfaffl, M. W. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol. Aspects Med.* **27**, 126–39 (2006).
- [95] Smyth, G. K. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.* **3**, Article3 (2004).
- [96] Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **57**, 289–300 (1995).
- [97] Fitzpatrick, T. B. Soleil et peau [Sun and skin]. *J. Médecine Esthétique* **2**, 33–34 (1975).
- [98] Fitzpatrick, T. B. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch. Dermatol.* **124**, 869 (1988).
- [99] Pershing, L. K. *et al.* Reflectance spectrophotometer: the dermatologists' sphygmomanometer for skin phototyping? *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1633–40 (2008).
- [100] Parrish, J. A., Jaenicke, K. F. & Anderson, R. R. Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem. Photobiol.* **36**, 187–91 (1982).
- [101] Eilers, S. *et al.* Accuracy of self-report in assessing Fitzpatrick skin phototypes I through VI. *JAMA Dermatol.* **149**, 1289–94 (2013).
- [102] Azizi, E. *et al.* Skin type, hair color, and freckles are predictors of decreased minimal erythema ultraviolet radiation dose. *J. Am. Acad. Dermatol.* **19**, 32–8 (1988).
- [103] Stern, R. S. & Momtaz, K. Skin typing for assessment of skin cancer risk and acute response to UV-B and oral methoxsalen photochemotherapy. *Arch. Dermatol.* **120**, 869–73 (1984).
- [104] Smuda, C. Freiburger Ethik Kommission International, Votum Nr. 010/2183, Beiersdorf AG, Hamburg.
- [105] Hennings, H. *et al.* Calcium regulation of growth and differentiation of mouse

- epidermal cells in culture. *Cell* **19**, 245–54 (1980).
- [106] Griesbeck, O. *et al.* Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J. Biol. Chem.* **276**, 29188–94 (2001).
- [107] Hein, B., Willig, K. I. & Hell, S. W. Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 14271–6 (2008).
- [108] Sefhel, G. C. & Davidson, J. M. Elastin Production in Human Skin Fibroblast Cultures and Its Decline with Age. *J. Invest. Dermatol.* **86**, 279–285 (1986).
- [109] Hagmeister, U. *et al.* Poly(A) tail shortening correlates with mRNA repression in tropoelastin regulation. *J. Dermatol. Sci.* **67**, 44–50 (2012).
- [110] Ritz-Timme, S., Laumeier, I. & Collins, M. J. Aspartic acid racemization: Evidence for marked longevity of elastin in human skin. *Br. J. Dermatol.* **149**, 951–959 (2003).
- [111] Iram, N. *et al.* Age-related changes in expression and function of Toll-like receptors in human skin. *Development* **139**, 4210–9 (2012).
- [112] Blanpain, C. & Fuchs, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 207–17 (2009).
- [113] Blanpain, C., Horsley, V. & Fuchs, E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell* **128**, 445–58 (2007).
- [114] Blanpain, C. & Fuchs, E. Epidermal stem cells of the skin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 339–73 (2006).
- [115] Sasu, S. *et al.* Chlamydia pneumoniae and chlamydial heat shock protein 60 stimulate proliferation of human vascular smooth muscle cells via toll-like receptor 4 and p44/p42 mitogen-activated protein kinase activation. *Circ. Res.* **89**, 244–50 (2001).
- [116] Schwartz, A. L. *et al.* Phenylmethimazole decreases Toll-like receptor 3 and noncanonical Wnt5a expression in pancreatic cancer and melanoma together with tumor cell growth and migration. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4114–22 (2009).
- [117] Moriwaki, S.-I. *et al.* The effect of donor age on the processing of UV-damaged DNA by cultured human cells: Reduced DNA repair capacity and increased DNA mutability. *Mutat. Res.* **364**, 117–23 (1996).
- [118] Takahashi, Y. *et al.* Decreased gene expression responsible for post-ultraviolet DNA repair synthesis in aging: a possible mechanism of age-related reduction in DNA repair capacity. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 435–42 (2005).
- [119] Sgonc, R. & Gruber, J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review. *Gerontology* **59**, 159–64 (2013).
- [120] Baron, E. D., Stern, R. S. & Taylor, C. R. Correlating Skin Type and Minimum Erythema Dose. *Arch. Dermatol.* **135**, 1278–1279 (1999).
- [121] Wagner, J. K. *et al.* Skin Responses to Ultraviolet Radiation: Effects of Constitutive Pigmentation, Sex, and Ancestry. *Pigment Cell Res.* **15**, 385–390 (2002).

- [122] Lee, J. H. & Kim, T. Y. Relationship between constitutive skin color and ultraviolet light sensitivity in Koreans. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **15**, 231–235 (1999).
- [123] Sayre, R. M. *et al.* Skin type, minimal erythema dose (MED), and sunlight acclimatization. *J. Am. Acad. Dermatol.* **5**, 439–43 (1981).
- [124] Cheng, K., Wang, X. & Yin, H. Small-molecule inhibitors of the TLR3/dsRNA complex. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3764–7 (2011).
- [125] Yu, M. & Levine, S. J. Toll-like receptor, RIG-I-like receptors and the NLRP3 inflammasome: key modulators of innate immune responses to double-stranded RNA viruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* **22**, 63–72 (2011).
- [126] Borkowski, A. W. *et al.* Toll-Like Receptor 3 Activation Is Required for Normal Skin Barrier Repair Following UV Damage. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 569–578 (2015).
- [127] Matsuki, M. *et al.* Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1044–9 (1998).
- [128] Lefèvre, C. *et al.* Mutations in the transporter ABCA12 are associated with lamellar ichthyosis type 2. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2369–78 (2003).
- [129] Feingold, K. R. Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid Res.* **48**, 2531–46 (2007).
- [130] Dotto, G. P. Crosstalk of Notch with p53 and p63 in cancer growth control. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 587–595 (2009).
- [131] Rangarajan, A. *et al.* Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J.* **20**, 3427–3436 (2001).
- [132] Iso, T., Kedes, L. & Hamamori, Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **194**, 237–55 (2003).
- [133] Engelke, M. *et al.* Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. *Br. J. Dermatol.* **137**, 219–25 (1997).
- [134] Weinberg, R. *The Biology of Cancer.* (Garland Science, 2006).
- [135] Gundermann, S. & Stark, H. *Stem Cell Aging: Mechanisms, Consequences, Rejuvenation.* (Springer Vienna, 2015). doi:10.1007/978-3-7091-1232-8
- [136] Stern, M. M. & Bickenbach, J. R. Epidermal stem cells are resistant to cellular aging. *Aging Cell* **6**, 439–52 (2007).
- [137] Charruyer, A. *et al.* Transit-amplifying cell frequency and cell cycle kinetics are altered in aged epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **129**, 2574–83 (2009).
- [138] Nguyen, B.-C. *et al.* Cross-regulation between Notch and p63 in keratinocyte commitment to differentiation. *Genes Dev.* **20**, 1028–42 (2006).
- [139] Johnson, J. L. *et al.* The desmosomal protein desmoglein 1 aids recovery of epidermal differentiation after acute UV light exposure. *J. Invest. Dermatol.* **134**, 2154–62 (2014).
- [140] Hasan, U. a *et al.* Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is

- antagonized by type I IFNs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 8047–52 (2007).
- [141] Yabluchanskiy, A. *et al.* Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. **28**, 391–403 (2013).
- [142] Rodríguez, D., Morrison, C. J. & Overall, C. M. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 39–54 (2010).
- [143] Brule, S. *et al.* The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology* **16**, 488–501 (2006).
- [144] Nelissen, I. *et al.* Gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 cleaves interferon-beta and is a target for immunotherapy. *Brain* **126**, 1371–81 (2003).
- [145] Ramadas, R. A. *et al.* Interleukin-1 family member 9 stimulates chemokine production and neutrophil influx in mouse lungs. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **44**, 134–45 (2011).
- [146] Lian, L.-H. *et al.* The double-stranded RNA analogue polyinosinic-polycytidylic acid induces keratinocyte pyroptosis and release of IL-36 γ . *J. Invest. Dermatol.* **132**, 1346–53 (2012).
- [147] Keermann, M. *et al.* Transcriptional landscape of psoriasis identifies the involvement of IL36 and IL36RN. *BMC Genomics* **16**, 322 (2015).
- [148] Kirschner, N. *et al.* Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 1161–9 (2013).
- [149] Roy, S. *et al.* Mixed-species biofilm compromises wound healing by disrupting epidermal barrier function. *J. Pathol.* **233**, 331–43 (2014).
- [150] Monteiro, A. C. *et al.* JAM-A associates with ZO-2, afadin, and PDZ-GEF1 to activate Rap2c and regulate epithelial barrier function. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2849–60 (2013).
- [151] Breitkreutz, D. *et al.* Differential modulation of epidermal keratinization in immortalized (HaCaT) and tumorigenic human skin keratinocytes (HaCaT-ras) by retinoic acid and extracellular Ca²⁺. *Differentiation*. **54**, 201–17 (1993).
- [152] Virtanen, M., Törmä, H. & Vahlquist, A. Keratin 4 upregulation by retinoic acid in vivo: a sensitive marker for retinoid bioactivity in human epidermis. *J. Invest. Dermatol.* **114**, 487–93 (2000).
- [153] Steijlen, P. M. *et al.* Topical treatment of ichthyoses and Darier's disease with 13-cis-retinoic acid. A clinical and immunohistochemical study. *Arch. Dermatol. Res.* **285**, 221–6 (1993).
- [154] Green, K. J. & Simpson, C. L. Desmosomes: new perspectives on a classic. *J. Invest. Dermatol.* **127**, 2499–515 (2007).
- [155] Saunders, N. a & Grant, M. E. The secretion of tropoelastin by chick-embryo artery cells. *Biochem. J.* **230**, 217–25 (1985).
- [156] Hinek, a *et al.* Impaired elastin fiber assembly related to reduced 67-kD elastin-binding protein in fetal lamb ductus arteriosus and in cultured aortic smooth muscle cells treated with chondroitin sulfate. *J. Clin. Invest.* **88**, 2083–

- 94 (1991).
- [157] Mecham, R. P. *et al.* Elastin synthesis by ligamentum nuchae fibroblasts: effects of culture conditions and extracellular matrix on elastin production. *J. Cell Biol.* **90**, 332–8 (1981).
- [158] Rock, M. J. *et al.* Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link. *J. Biol. Chem.* **279**, 23748–58 (2004).
- [159] Huber, L. A., Pfaller, K. & Vietor, I. Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ. Res.* **92**, 962–8 (2003).
- [160] Foster, L. J. *et al.* A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* **125**, 187–99 (2006).
- [161] Fountain, J. W., Lockwood, W. K. & Collins, F. S. Transfection of primary human skin fibroblasts by electroporation. *Gene* **68**, 167–172 (1988).
- [162] Billinton, N. & Knight, A. W. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal. Biochem.* **291**, 175–97 (2001).
- [163] Andersson, H. *et al.* Autofluorescence of living cells. *J. Microsc.* **191**, 1–7 (1998).
- [164] Qin, J. Y. *et al.* Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS One* **5**, e10611 (2010).
- [165] Kim, T. K. & Eberwine, J. H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 3173–3178 (2010).
- [166] Recillas-Targa, F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. *Mol. Biotechnol.* **34**, 337–54 (2006).
- [167] Brinckmann, J. *et al.* Enhanced fibrillin-2 expression is a general feature of wound healing and sclerosis: potential alteration of cell attachment and storage of TGF-beta. *Lab. Invest.* **90**, 739–52 (2010).
- [168] Deyl, Z. *et al.* Studies on the chemical nature of elastin fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* **625**, 248–54 (1980).
- [169] Naldini, L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263–7 (1996).
- [170] Li, S.-H. *et al.* Elastin overexpression by cell-based gene therapy preserves matrix and prevents cardiac dilation. *J. Cell. Mol. Med.* **16**, 2429–39 (2012).
- [171] Mizuno, T. *et al.* Elastin stabilizes an infarct and preserves ventricular function. *Circulation* **112**, 181–8 (2005).
- [172] Mecham, R. P. & Davis, E. C. in *Extracellular matrix assembly and structure* (eds. Yurchenco, P. D., Birk, D. E. & Mecham, R. P.) 281–314 (Academic Press, 1994). doi:10.1016/B978-0-12-775170-2.50014-7
- [173] Kissin, E. Y. *et al.* Transforming growth factor beta induces fibroblast fibrillin-1 matrix formation. *Arthritis Rheum.* **46**, 3000–3009 (2002).
- [174] Bustin, S. a. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 23–39 (2002).

- [175] Yanagisawa, H. *et al.* Fibulin-5 is an elastin-binding protein essential for elastic fibre development in vivo. *Nature* **415**, 168–171 (2002).
- [176] Choi, J. *et al.* Analysis of dermal elastic fibers in the absence of fibulin-5 reveals potential roles for fibulin-5 in elastic fiber assembly. *Matrix Biol.* **28**, 211–20 (2009).
- [177] Nakamura, T. *et al.* Fibulin-5/DANCE is essential for elastogenesis in vivo. *Nature* **415**, 171–5 (2002).
- [178] Hirai, M. *et al.* Fibulin-5/DANCE has an elastogenic organizer activity that is abrogated by proteolytic cleavage in vivo. *J. Cell Biol.* **176**, 1061–71 (2007).
- [179] Liu, X. *et al.* Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat. Genet.* **36**, 178–82 (2004).
- [180] Cenizo, V. *et al.* LOXL as a target to increase the elastin content in adult skin: a dill extract induces the LOXL gene expression. *Exp. Dermatol.* **15**, 574–81 (2006).
- [181] Kadoya, K. *et al.* Fibulin-5 deposition in human skin: decrease with ageing and ultraviolet B exposure and increase in solar elastosis. *Br. J. Dermatol.* **153**, 607–12 (2005).
- [182] Sabatier, L. *et al.* Fibrillin assembly requires fibronectin. *Mol. Biol. Cell* **20**, 846–58 (2009).
- [183] Ashcroft, G. S., Horan, M. A. & Ferguson, M. W. Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model. *J. Invest. Dermatol.* **108**, 430–7 (1997).
- [184] Shu, X. *et al.* A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms. *PLoS Biol.* **9**, e1001041 (2011).

13 Lebenslauf

MEIKE HALM, GEB. LEUGER

14 Danksagung

Ein herzliches DANKE geht an alle Menschen, die mich bis hierher begleitet haben und dabei auf die verschiedensten Weisen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Katja Schenke-Layland für die Betreuung der Arbeit und die damit verbundenen wissenschaftlichen Anregungen, die Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Bei Prof Dr. Gerd Klein bedanke ich mich für die Übernahme des Koreferates.

Prof. Dr. Klaus-Peter Wittern, Frau Dr. May Shana'a, Herrn Dr. Horst Wenck, Herrn Dr. Stefan Gallinat und Herrn Sören Jaspers danke ich für die Möglichkeit meine Arbeit bei der Beiersdorf AG in Hamburg anzufertigen.

Ein besonderer Dank geht dabei an meine Betreuer bei der Beiersdorf AG: Dr. Frank Fischer danke ich für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, für die Diskussionen, den Optimismus und für die Geduld. Dr. Janosch Hildebrand danke ich für die unterstützende Betreuung insbesondere in zell- und molekularbiologischen Fragen.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern der Forschung der Beiersdorf AG sehr herzlich DANKE sagen, für freundliche und unbürokratische Hilfestellungen in technischen, wissenschaftlichen, bürokratischen oder Material-Fragen, und für eine tolle Arbeitsatmosphäre.

Danke an das Team von Prof. Dr. Stefan Hell am MPI in Göttingen für die unkomplizierte Unterstützung in allen GSD-Belangen.

Danke an die Jungs der Biophysik, dass ich als Testperson für die verschiedensten Dinge häufiger auch mal einen Blick über meine Laborbank hinaus werfen durfte.

Insbesondere gilt mein Dank meinen Laborteams „StruFo“ und „MicLab“ und allen Doktoranden. Danke für die freundliche Aufnahme, für Diskussionen, für lustige Zeiten innerhalb und außerhalb des Labors, für Beistand in wissenschaftlichen und persönlichen Belangen. Danke, dass ich nicht nur Kollegen, sondern auch Freunde gefunden habe.

Ich möchte mich bei allen meinen Freunden bedanken, die (obwohl inzwischen bundesweit verstreut) immer für mich da sind und nicht böse sind, wenn man mal mehrere Wochen nichts voneinander hört...

Ich danke meiner gesamten Familie und Schwiegerfamilie für immerwährende Unterstützung und Liebe, in der Vergangenheit und auch bei allem was die Zukunft bringt. DANKE an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben, wo sie nur konnten ☺ und den Weg bis hierhin damit überhaupt erst ermöglicht haben.

Mein größter Dank geht an meinen Mann David, der immer für mich da war und ist und insbesondere in stressigen Phasen meine Launen aushält, mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen holt, mich wenn nötig in Ruhe lässt, mich aufmuntert, wenn ich es am dringendsten brauche und einfach allen Sinn und Unsinn des Lebens mit mir gemeinsam aushält.

DANKE

15 Anhang

15.1 Sequenz des Citrin-markierten Elastins für Gensynthese-Auftrag

Die Sequenz für den Linker und das Fluoreszenz-Tag wurde in Rücksprache mit dem MPI in Göttingen ausgewählt.

Tropoelastin inklusive **Start ATG**

Linker

Citrin inklusive **Start ATG**

ATGCGGGTCTGACGGCGGGCCCCGCGGCCCGGAGTCTCCTGCTCCTGCTGTCCATCCTCCACCC
 CTCTCGGCCTGGAGGGGTCCCTGGGGCCATTCTGGTGGAGTTCCTGGAGGAGTCTTTTATCCAGGGG
 CTGGTCTCGGAGCCCTTGGAGGAGGAGCGCTGGGGCCTGGAGGCAAACCTCTTAAGCCAGTTCCCGGA
 GGGCTTGCGGGTGCTGGCCTTGGGGCAGGGCTCGGCGCCTTCCCCGCAGTTACCTTTCCGGGGGCTCT
 GGTGCCTGGTGGAGTGGCTGACGCTGCTGCAGCCTATAAAGCTGCTAAGGCTGGCGCTGGGCTTGGTG
 GTGTCCAGGAGTTGGTGGCTTAGGAGTGTCTGCAGGTGCGGTGGTTCCTCAGCCTGGAGCCGGAGTG
 AAGCCTGGGAAAGTGCCGGGTGTGGGGCTGCCAGGTGTATACCCAGGTGGCGTGCTCCAGGAGCTCG
 GTTCCCCGGTGTGGGGGTGCTCCCTGGAGTTCCTACTGGAGCAGGAGTTAAGCCCAAGGCTCCAGGTG
 TAGGTGGAGCTTTTGTGGAATCCAGGAGTTGGACCCTTTGGGGGACCGCAACCTGGAGTCCACTG
 GGGTATCCCATCAAGGCCCCCAAGCTGCCTGGTGGCTATGGACTGCCCTACACCACAGGGAACTGCC
 CTATGGCTATGGGCCCGGAGGAGTGGCTGGTGCAGCGGGCAAGGCTGGTTACCCAACAGGGACAGGGG
 TTGGCCCCAGGCAGCAGCAGCAGCGGCAGCTAAAGCAGCAGCAAAGTTCGGTGTGGAGCAGCCGGA
 GTCCTCCCTGGTGTGGAGGGGCTGGTGTTCCTGGCGTGCCTGGGGCAATTCTGGAATTGGAGGCAT
 CGCAGGCGTTGGGACTCCAGCTGCAGCTGCAGCTGCAGCAGCAGCCGCTAAGGCAGCCAAGTATGGAG
 CTGCTGCAGGCTTAGTGCCTGGTGGGCCAGGCTTTGGCCCCGGGAGTAGTTGGTGTCCAGGAGCTGGC
 GTTCCAGGTGTTGGTGTCCAGGAGCTGGGATTCCAGTTGTCCAGGTGCTGGGATCCAGGTGCTGC
 GGTTCCAGGGGTTGTGTACCAGAAGCAGCTGCTAAGGCAGCTGCAAAGGCAGCCAATAACGGGGCCA
 GGCCCCGAGTCGGAGTTGGAGGCATTCTACTTACGGGGTTGGAGCTGGGGGCTTTCCCGGCTTTGGT
 GTCGGAGTCGGAGGTATCCCTGGAGTCGCAGGTGTCCCTAGTGTCCGAGGTGTTCCCGGAGTCGGAGG
 TGTCCCGGAGTTGGCATTTCCTCCGAAGCTCAGGCAGCAGCTGCCGCCAAGGCTGCCAAGTACGCTC
 TTCTCAATCTTGCAGGGTTAGTTCTGGTGTGCGCGTGGCTCCTGGAGTTGGCGTGGCTCCTGGTGTG
 GGTGTGGCTCCTGGAGTTGGCTTGGCTCCTGGAGTTGGCGTGGCTCCTGGAGTTGGTGTGGCTCCTGG
 CGTTGGCGTGGCTCCCGCATTGGCCCTGGTGGAGTTGCAGCTGCAGCAAATCCGCTGCCAAGGTGG
 CTGCCAAAGCCCAGCTCCGAGCTGCAGCTGGGCTTGGTGTGGCATCCCTGGACTTGGAGTTGGTGTG
 GCGTCCCTGGACTTGGAGTTGGTGTGGTGTTCCTGGACTTGGAGTTGGTGTGGTGTTCCTGGCTT
 CGGGGCAGTACCTGGAGCCCTGGCTGCCGCTAAAGCAGCCAAATATGGAGCAGCAGTGCCTGGGGTCC
 TTGGAGGGCTCGGGGCTCTCGGTGGAGTAGGCATCCAGGCGGTGTGGTGGGAGCCGGACCCGCCGCC
 GCCGCTGCCGCAGCCAAAGCTGCTGCCAAAGCCGCCAGTTTGGCCTAGTGGGAGCCGCTGGGCTCGG
 AGGACTCGGAGTCGGAGGGCTTGGAGTTCCAGGTGTTGGGGCCTTGGAGGTATACCTCCAGCTGCAG
 CCGCTAAAGCAGCTAAATACGGAGTGGCAGCAAGACCTGGCTTCGGATTGTCTCCATTTTCCAGGT
 GGGGCTGCCTGGGGAAAGCTTGTGGCCGGAAGAGAAAAGGTGGAAGCGGTGGAAGC**ATGGT**GAGCAA
 GGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACA
 AGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC
 ACCACCGCAAGCTGCCCGTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCCTGATGTGCTT
 CGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCC
 AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC

GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA
CAAGCTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCA
AGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG
AACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCT
GAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCA
CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG

16 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel

Epidermale und dermale Aspekte der Hautalterung

*Die Rolle von Toll-like Rezeptor 3 in der Epidermis
und die Elastinfaserbildung in der Dermis*

selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen (alternativ: Zitate) als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Hamburg, den 16.12.2015

Meike Halm