

Altern im Zeitraffer: Entwicklung und Charakterisierung eines durch Mitomycin-C-induzierten Hautalterungsmodells

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Johanna Diekmann, geb. Fromm
aus Arnsberg

Düsseldorf

April 2013

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Brenneisen

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Joachim Ernst

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2013

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Alterung	12
1.1.1	Alterstheorien	12
1.1.1.1	Schadenstheorien.....	12
1.1.1.2	Evolutionstheorien	14
1.1.2	Seneszenz (zelluläres Altern)	15
1.1.2.1	Der Zellzyklus.....	18
1.2	Die Haut	21
1.2.1	Aufbau.....	21
1.2.1.1	Epidermis.....	22
1.2.1.2	Dermis	22
1.2.2	Funktion	23
1.2.3	<i>In vitro</i> Hautmodelle	24
1.3	Hautalterung	25
1.3.1	Prozesse der Hautalterung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	25
1.3.1.1	Intrinsische Hautalterung.....	25
1.3.1.2	Extrinsische Hautalterung	26
1.3.2	Hautalterung <i>in vitro</i> (Fibroblasten als Modellsystem)	28
1.3.3	Pathomechanismen der Hautalterung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	29
1.3.3.1	Reaktive Sauerstoffspezies.....	30
1.3.3.2	Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA).....	31
1.4	Anti-Aging-Strategien	32
1.4.1	Dermatokosmetische Wirkstoffe.....	32
1.4.1.1	Vitamine	33
1.4.1.2	Antioxidantien	34
1.4.1.3	Peptide	34
1.5	Mitomycin-C.....	35
1.6	Zielstellung	37
2	Material und Methoden.....	39
2.1	Material	39
2.1.1	Chemikalien	39
2.1.2	Zellmaterial	41
2.1.3	Puffer und Lösungen.....	42
2.1.4	Antikörper	43

2.1.4.1	Primäre Antikörper.....	43
2.1.4.2	Sekundäre Antikörper	43
2.1.5	Primer.....	44
2.1.6	Zellkulturmedien.....	44
2.1.7	Geräte	45
2.1.8	Labor-Software	45
2.1.9	Kits.....	46
2.1.10	Verbrauchsmaterial	46
2.2	Methoden	47
2.2.1	Isolierung von primären Zellen aus Biopsien.....	47
2.2.2	Kultivierung der Zellen.....	48
2.2.3	Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	48
2.2.4	Mycoplasmentest	48
2.2.5	Herstellung von Zelllysaten.....	49
2.2.6	Herstellung von Medienüberständen.....	49
2.2.7	Vitalitätstest.....	50
2.2.8	Proliferationstest (BrdU).....	50
2.2.9	Nachweis intrazellulärer ROS.....	51
2.2.10	CyQuant-Assay zur Bestimmung der Zellzahl	52
2.2.11	SA- β -Galaktosidase-Färbung.....	52
2.2.12	Bestimmung der Zellgröße.....	53
2.2.13	Immunfluoreszenz	53
2.2.14	ELISA für MMP-1	54
2.2.15	P1NP-Analyse	55
2.2.16	Zellzyklusanalyse.....	55
2.2.17	Immunologischer Nachweis von Proteinen	56
2.2.17.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	56
2.2.17.2	SDS-PAGE.....	56
2.2.17.3	Western-Blot	57
2.2.17.4	Ponceau-S Färbung.....	58
2.2.17.5	Immunologischer Proteinnachweis.....	58
2.2.18	Molekularbiologische Methoden.....	59
2.2.18.1	Isolierung der RNA aus dem Hautmodell.....	59
2.2.18.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA.....	59
2.2.18.3	Herstellung der komplementären DNA (cDNA)	59
2.2.18.4	Bestimmung der Genexpression mittels Realtime-PCR.....	60
2.2.19	Entwicklung eines dreidimensionalen Hautmodells.....	61
2.2.20	Entwicklung eines Hautalterungsmodells.....	61
2.2.21	Isolierung der Fibroblasten aus dem Hautmodell	62
2.2.22	Histologische Beurteilung	63

2.2.22.1	Fixierung der Hautmodelle.....	63
2.2.22.2	Schnittpräparate	63
2.2.22.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	64
2.2.22.4	AZAN-Färbung	64
2.2.22.5	Immunfluoreszenz-Färbung	65
2.2.23	Allgemeine Versuchsbedingungen	66
2.2.24	Statistik	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Untersuchungen zur Induktion einer dauerhaften Seneszenz.....	68
3.1.1	Toxizität seneszenz-induzierender Substanzen in Fibroblasten.....	69
3.1.2	Einfluss seneszenz-induzierender Substanzen auf die Zellproliferation	69
3.1.3	Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Induktion von Seneszenz ...	71
3.1.4	Auswirkung seneszenz-induzierender Substanzen auf die Zellmorphologie	73
3.1.5	Zusammenfassung der Untersuchungen zur Seneszenz-Induktion	74
3.2	Untersuchungen zur Alterung im Zeitraffer mit Mitomycin-C.....	75
3.2.1	Vergleich des Proliferationsverhaltens senescenter Fibroblasten	76
3.2.2	Morphologische Veränderungen bei seneszenten Fibroblasten.....	78
3.2.3	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in seneszenten Fibroblasten.....	80
3.2.4	ß-Galaktosidase-Aktivität in seneszenten Fibroblasten	81
3.2.5	Effekte von Seneszenz auf den Zellzyklus.....	81
3.2.6	Einfluss von Mitomycin-C auf die Expression von Matrix-Metalloproteinase-1 ..	83
3.2.7	Zusammenfassung der Untersuchungen zur Alterung im Zeitraffer.....	84
3.3	Untersuchungen zum Aufbau eines Hautalterungsmodells	86
3.3.1	Histologische Veränderungen <i>in vivo</i> gealterter Haut.....	86
3.3.2	Entwicklung eines dreidimensionalen Hautalterungsmodells	87
3.3.3	Überprüfung von Seneszenz-Markern an Fibroblasten aus dem Hautmodell	90
3.3.3.1	Vergleich des Proliferationsverhaltens isolierter Fibroblasten.....	90
3.3.3.2	Auswirkung von Mitomycin-C auf die Morphologie isolierter Fibroblasten	91
3.3.3.3	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies an isolierten Fibroblasten	93
3.3.3.4	SA-ß-Galaktosidase-Aktivität isolierter Fibroblasten aus dem Hautmodell	94
3.3.3.5	Aktivität von p53 in isolierten Fibroblasten aus dem Hautalterungsmodell....	95
3.3.3.6	Einfluss von MMC auf MMP-1 in isolierten Fibroblasten	96
3.3.3.7	Zusammenfassung der Seneszenz-Marker in isolierten Fibroblasten	97
3.3.4	Charakteristika des Hautalterungsmodells.....	98
3.3.4.1	Histologische Veränderungen der Strukturproteine	98
3.3.4.2	Einfluss von MMC auf den Kollagengehalt im Hautalterungsmodell	103
3.4	Anti-Aging	107
3.4.1	Anti-Aging-Effekte durch Vitamin-A	107

4	Diskussion	109
4.1	ROS induziert nur in Kombination mit DNA-Schäden dauerhafte Seneszenz..	109
4.2	Mitomycin-C induziert eine dauerhafte Seneszenz im Zeitraffer	112
4.2.1	Aktivierung von p53 durch Mitomycin-C führt zu einem Proliferationsstopp ...	112
4.2.2	Induktion von morphologischen Veränderungen durch Mitomycin-C	115
4.2.3	Positiver SA- β -Gal-Nachweis in MMC-behandelten Fibroblasten.....	116
4.2.4	Mitomycin-C induziert oxidativen Stress und steigert die MMP-1-Expression..	117
4.3	Hautalterungsmodell: Kennzeichen einer <i>in vivo</i> gealterten Haut	119
4.3.1	Verminderte Filaggrinexpression in MMC-behandelten Hautmodellen.....	121
4.3.2	Veränderung des elastischen Fasernetzwerks durch Mitomycin-C	123
4.3.3	MMP-vermittelter Abbau des Kollagens durch senescente Fibroblasten.....	124
4.4	Anti-Aging	128
5	Perspektiven.....	130
6	Zusammenfassung	131
7	Summary	132
8	Abbildungsverzeichnis	133
9	Literaturverzeichnis	135
	Konferenzen, Posterbeiträge und Publikationen	156
	Danksagung.....	157
	Erklärung.....	159

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Gewichtsprozent
abs.	absolut
ALI	Air Liquid Interphase
AP-1	Activator Protein
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
BU	Busulfan
c	Konzentration
CDK	cyclinabhängige Kinasen
cDNA	komplementäre DNA
ct	Kontrolle
CPD	kumulative Zellverdopplung
d	Tage
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DIAS	drug induced accelerated senescence
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent Assay
Em	Emission
EtOH	Ethanol
Ex	Extinktion
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetal Calf Serum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAG	Glykosaminoglykan
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunden
H ₂ -DCF-DA	2',7'-Dichlofodihydrofluorescein-Diacetat
HDF	Human Dermal Fibroblasts
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
L	Liter
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MeOH	Methanol
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mMol/L)
MMC	Mitomycin-C
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NGS	normal goat serum
NF-κB	kappa-light-chain-enhancer
nm	Nanometer
nM	Nanomolar (nMol/L)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Pleckstrin-Homologie
PBS	Phosphate buffered saline
PD	Populationsverdopplung
P1NP	Prokollagen Typ-1 aminoterminales Propeptid
Rb	Retinoblastom

RFU	relative Fluoreszenz Unit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	Rotationen pro Minute
RS	replikative Seneszenz
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelektrophorese
SIPS	stress induced premature senescence
SOD	Superoxiddismutase
TBS-T	Tris-gepufferte ionische Salzlösung mit TritonX100
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
µM	Mikromolar (μ Mol/L)
XGal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galaktosid

1 Einleitung

1.1 Alterung

Der deutsche Mediziner und Begründer der Gerontologie, Max Bürger, definierte 1965 das Altern als eine irreversible, zeitabhängige Veränderung von Strukturen und Funktionen lebendiger Systeme (Bürger, 1965). Der US-amerikanische Gerontologe Leonard Hayflick definierte Altern als die Summe aller Veränderungen, die in einem Organismus während seines Lebens auftreten und zu einem Funktionsverlust von Zellen, Geweben oder Organen und schließlich zum Tod führen (Hayflick, 2007). Bis heute gibt es keine allgemein akzeptierte wissenschaftliche Definition (Bowen & Atwood, 2004), jedoch steht fest, dass das Altern ein fortschreitender, nicht umkehrbarer biologischer Prozess ist, der mit dem Tod endet. Allgemein ist die Annahme akzeptiert, dass verschiedene hochkomplexe und vielfach noch ungeklärte Mechanismen für das Altern verantwortlich sind.

1.1.1 Alterstheorien

Da die Ursachen des Alterns sehr vielschichtig und komplex sind, gab es bereits 1990 etwa 300 verschiedene Theorien zum Altern (Medvedev, 1990). Die unterschiedlichsten Antworten, warum Organismen altern, werden als Alterstheorien bezeichnet. Viele der Alterstheorien ergänzen sich gegenseitig und können nicht strikt voneinander getrennt werden, sodass bis heute keine dieser Theorien allein betrachtet in der Lage ist, eine wissenschaftlich fundierte, allumfassende Erklärung für den Prozess des Alterns zu liefern. Letztlich wird es wohl nicht die **eine** Theorie sein, mit der alle altersbedingten Veränderungen erklärt werden können, sondern eine Kombination aus verschiedenen Theorien, welche sich in die zwei Hauptgruppen, Schadens- und Evolutionstheorie, einteilen lassen (Peto et al., 1985).

1.1.1.1 Schadenstheorien

Nach der Schadenstheorie ist das Altern ein Vorgang, der durch die Summe von Schäden wie Oxidation, Abnutzung oder Akkumulation defekter Strukturen wie Proteine oder DNA hervorgerufen wird. Die bekannteste Theorie ist die Freie-Radikal-Theorie.

Die **Theorie der freien Radikale** wurde 1956 von Harman formuliert (Harman, 1956). Nach Harman wird Altern hauptsächlich durch Schäden hervorgerufen, die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen entstehen. Die freien Radikale werden infolge von

Stoffwechselprozessen aus molekularem Sauerstoff gebildet und schädigen durch ihre Freisetzung wichtige Moleküle wie z.B. DNA, RNA, Proteine oder Lipide. Dies führt nach der Theorie von Harman zu einer stetig anwachsenden Ansammlung von geschädigten Zellkomponenten, die wiederum den Alterungsprozess auslösen.

Um sich gegen den oxidativen Schaden zu schützen, hat die Zelle verschiedene enzymatische Abwehrsysteme entwickelt wie z.B. die Superoxiddismutase (SOD), Katalase oder Glutathionperoxidase. Diese Enzyme sind in der Lage über eine Reihe chemischer Reaktionen reaktive Sauerstoffspezies zu inaktiven Komponenten zu detoxifizieren und somit unschädlich zu machen (Ames et al., 1993). Die Theorie von Harman wird in der Wissenschaft kontrovers diskutiert. Auf der einen Seite gibt es verschiedene unterstützende Ergebnisse (Duthie et al., 1989; Ames et al., 1993; Van Remmen et al., 2003). So konnte beispielsweise die Lebensdauer von Fruchtfliegen durch eine Überexpression der SOD und Katalase um 34% gesteigert werden (Orr et al., 2003) und eine besonders langlebige Spezies des Nematoden *Caenorhabditis elegans* zeigte ebenfalls einen signifikanten Anstieg dieser beiden Enzyme (Larsen, 1993). Auf der anderen Seite widersprechen einige Beobachtungen der Theorie von Harman (Orgel, 1970; Bjelakovic G, 2007; Perez et al., 2009; Salmon et al., 2010). Durch eine gezielte Verminderung der SOD2 in *C. elegans* verlängerte sich entgegen aller Erwartungen die durchschnittliche Lebensdauer des Fadenwurms (Van Raamsdonk & Hekimi, 2009) und besonders langlebige Ameisen besaßen weniger SOD1 als ihre kurzlebigeren Artgenossen (Parker et al., 2004). Experimente mit Knockout-Mäusen (SOD -/-) zeigten zwar eine erhöhte Menge an oxidativen Schäden auf zellulärer und molekularer Ebene, die Lebensdauer veränderte sich jedoch nicht (Van Remmen et al., 2003). Ebenso konnten Huang et al. durch eine Überexpression der CuZn-SOD die Lebensdauer von Mäuse nicht steigern (Huang et al., 2000).

Die **Mutationstheorie** und die **DNA-Schadenstheorie** sehen als Ursache des Alterns irreversible Schäden der DNA, welche zu Mutationen führen und die genetische Information verändern oder unbrauchbar machen (Failla, 1958). Im Laufe der Zeit wurde die DNA-Schadenstheorie mehrmals verändert, da immer neue DNA-Schäden und Mutationen entdeckt wurden (Gensler & Bernstein, 1981; Vijg & Dolle, 2002; Freitas & de Magalhaes, 2011). Mit zunehmendem Alter des Organismus versagen die zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen, um diese Mutationen zu beseitigen, die durch endogene und exogene Noxen entstanden sind. Folglich kommt es zu einer Akkumulation der DNA-Schäden und damit zur Bildung von fehlerhaften Proteinen oder dem Verlust von Proteinen, die für den Metabolismus benötigt werden. Es ist bewiesen, dass DNA-Mutationen sowohl in Mäusen als auch im Menschen mit dem Alter zunehmen (Esposito et al., 1989; Vijg & Dolle, 2002) und besonders langlebige Würmer eine erhöhte DNA-Reparatur-Kapazität zeigen (Hyun et al., 2008). Trotzdem ist es schwer eindeutig zu

sagen, ob diese Veränderungen Begleiterscheinungen oder Ursachen des Alterungsprozesses sind. Mäuse mit einer besonders hohen Expression von *MGMT* (*Methylguanin-Methyltransferase*) besaßen zwar ein geringeres Risiko an Krebs zu erkranken, der Alterungsprozess wurde jedoch nicht verlangsamt (Zhou et al., 2001). Auf der anderen Seite führte eine Überexpression von p53 in Mäusen zu einer verlängerten Lebensdauer (Matheu et al., 2007), jedoch wurde nicht deutlich, ob der Alterungsprozess an sich verzögert oder die DNA-Reparatur verbessert wurde. Die Mutationstheorie gilt inzwischen als weitgehend überholt, da Studien zeigen, dass die meisten Zellen auch im Alter noch in der Lage sind DNA-Schäden effektiv zu reparieren (Takebe et al., 1977).

Die **Fehler-Katastrophen-Theorie** wurde von Orgel begründet und lehnt an die Mutationstheorie an (Orgel, 1963). Demnach gibt es zwei Arten von Proteinen innerhalb einer Zelle. Zum einen gibt es Proteine, die Stoffwechselfunktionen ausüben und zum anderen Proteine, die der Informationsübertragung dienen. Nach der Fehler-Katastrophen-Theorie lösen Störungen bei der Translation und Transkription von Proteinen eine Fehlerkaskade in der Zelle aus, wodurch fehlerhafte Proteine mit der Zeit in den Zellen akkumulieren und schließlich zum Funktionsverlust und langfristig zum Tod führen (Medvedev, 1990). In der Tat wird mit zunehmendem Alter ein Anstieg an geschädigten Proteinen beobachtet (Gershon & Gershon, 1970), aber auch bei dieser Theorie gibt es eine Reihe von Versuchsergebnissen, die dagegen sprechen (Becker & Schipperges, 1993). Kritisiert wird unter anderem, dass keine konkreten Angaben über die genaue Position und Art der Fehler geliefert wird. Außerdem konnte durch die Zufuhr zerstörter Aminosäuren die Menge an fehlerhaften Proteinen zwar erhöht werden, die Lebensdauer verkürzte sich daraufhin allerdings nicht (Strehler, 1962).

1.1.1.2 Evolutionstheorien

Die Schadenstheorien liefern Erklärungsmodelle wie ein Organismus altern, die Evolutionstheorien hingegen versuchen, die Frage nach dem warum zu beantworten. Die Theorien gehen davon aus, dass die verschiedenen Etappen der Entwicklung in ihrer Reihenfolge und Dauer klar programmiert sind (Kirkwood & Cremer, 1982). Das Altern ist nach diesen Theorien das Ergebnis der Evolution und entstand erst im Laufe der Zeit. Bereits Darwin beschrieb 1859 in seiner Evolutionstheorie, dass die begrenzte Lebensdauer der höheren Organismen einen Nutzen haben müsse, der den Nachteil des Alterns kompensiert (Kirkwood, 1997). In der Evolutionstheorie werden vielfältige Mechanismen beschrieben, die als Ursache für das Altern diskutiert werden, von denen unter anderem die Verkürzung der Telomere besonders weit verbreitet ist.

Die **Telomer-Hypothese des Alterns** besagt, dass vom Zeitpunkt der Geburt an eine Verkürzung der Telomere an den Chromosomenenden stattfindet und diese Verkürzung ursächlich für das Altern einer Zelle ist. Für diverse Spezies konnte bereits gezeigt werden,

dass die Verkürzung der Telomere zur Ausbildung einer Seneszenz führt (Chiu & Harley, 1997; Lanza et al., 2000). Im Modellorganismus *C. elegans* hat die Telomerlänge dagegen keinen Einfluss auf das Altern (Raices et al., 2005) und auch Mäuse besitzen verhältnismäßig lange Telomere (Lanza et al., 2000). Des Weiteren wurden verkürzte Telomere bei geklonten Schafen, Kühen und Mäusen gefunden, welches bei Schafen zu vorzeitigen Alterungsprozessen führte, Kühe und Mäuse jedoch nicht beeinflusste (Shiels et al.; Tian et al., 2003). Die Theorie baut auf den Beobachtungen von Hayflick aus dem Jahre 1961 auf (Hayflick & Moorhead, 1961). Er beobachtete damals als Erster, dass mit jeder Zellteilung die Teilungsrate abnahm und widerlegte dadurch die bis dahin herrschende Meinung von A. Carrel, dass Zellen außerhalb des Gewebeverbands grundsätzlich unsterblich seien (Carrel & Ebeling, 1921). Die von Hayflick beschriebene begrenzte Lebensdauer wird auch als Hayflick-Limit oder replikative Seneszenz bezeichnet und wurde durch die Untersuchung von Harley et al. unterstützt. Harley et al. zeigten, dass mit jeder Zellteilung eine Verkürzung der Telomere einherging und in Folge dessen die Zellteilungsrate langsamer wurde (Harley et al., 1990). Ab einer kritischen Telomerlänge teilten sich die Zellen nicht mehr und wurden seneszent. Die Beobachtungen von Hayflick und Harley bilden bis heute die Grundlage für die Theorie der zellulären Seneszenz.

1.1.2 Seneszenz (zelluläres Altern)

Die Theorie der Seneszenz baut auf den Beobachtungen von Hayflick und Harley bezüglich eines Verlusts der proliferativen Kapazität nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen auf (Hayflick & Moorhead, 1961; Harley et al., 1990). Durch die Kultivierung von Säugertierzellen *in vitro* wurde es möglich, die molekularen Veränderungen des Alterns zu untersuchen und zu verstehen (Mitnitski et al., 2002). 1961 stellte Hayflick fest, dass sich normale menschliche Zellen nicht unendlich oft teilen können und somit nicht unsterblich sind (Hayflick & Moorhead, 1961). Hayflick unterteilt das von ihm beschriebene Wachstumsverhalten in drei Phasen (s. Abbildung 1.1). Die erste Phase beschreibt einen Zeitraum von 1-3 Wochen, in denen es zur Ausbildung der Primärkultur aus dem Originalgewebe kommt. Mit Erreichen der ersten Konfluenz dieser Kultur beginnt die zweite Phase. Die zweite Phase umfasst je nach Zelltyp einen Zeitraum von 2-10 Monaten und ist gekennzeichnet durch eine exponentielle Proliferation der Zellen mit hoher metabolischer Aktivität. Das Ende der zweiten Phase wird durch das Einstellen der Proliferation gekennzeichnet. In der dritten postmitotischen Phase verharren die Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus' und erreichen nicht mehr die S-Phase, sind jedoch trotz des Wachstumsarrests weiterhin metabolisch aktiv (Muller, 2009). Hayflick nahm an, dass es sich bei der dritten Phase um einen Prozess handelt, der auf zellulärer Ebene das

Altern darstellt. Dieser *in vitro* beobachtete Stillstand der Proliferation wird als **replikative Seneszenz** bezeichnet (Hayflick & Moorhead, 1961; Ben-Porath & Weinberg, 2005).

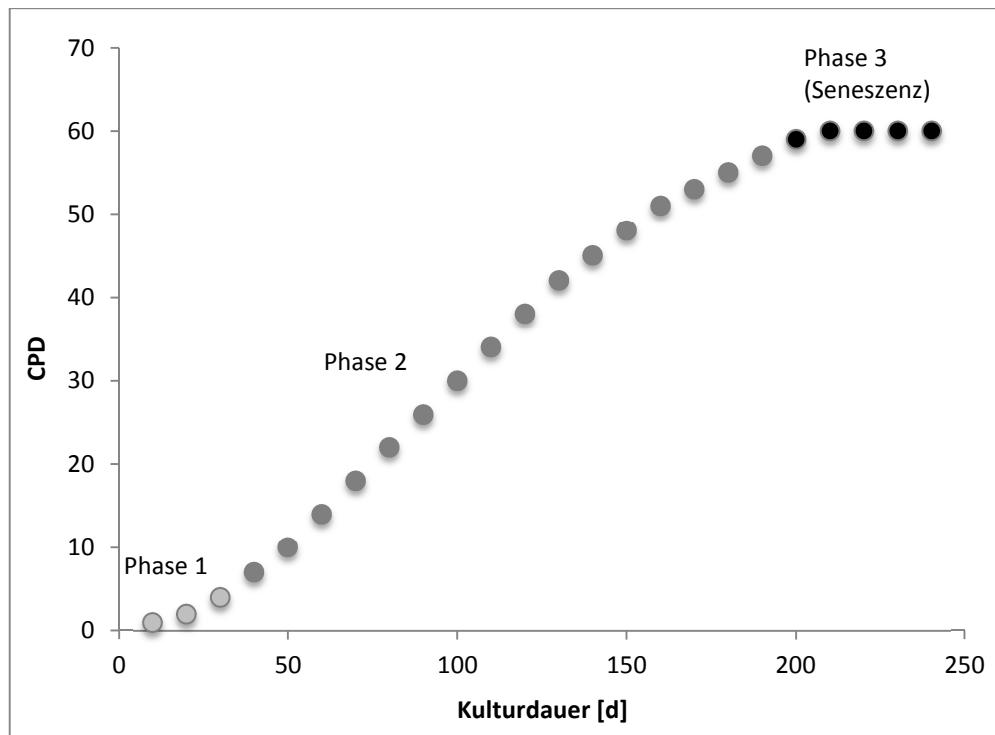


Abbildung 1.1: Einteilung der Wachstumskurve nach L. Hayflick In der 1. Phase kommt es zur Ausbildung der Primärkultur aus dem Originalgewebe. Mit Erreichen der ersten Konfluenz dieser Kultur beginnt die zweite Phase. Die zweite Phase umfasst je nach Zelltyp einen Zeitraum von 2-10 Monaten und ist gekennzeichnet durch eine exponentielle Proliferation der Zellen. Das Ende der zweiten Phase wird durch das Einstellen der Proliferation gekennzeichnet. In der dritten Phase verharren die Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus' und befinden sich in der replikativen Seneszenz. CPD: kumulative Populationsverdopplung

Als wichtiger Faktor für das Auftreten der replikativen Seneszenz wurde zunächst die Verkürzung der Telomere während der Replikation angesehen (Harley et al., 1990). Mit steigender Zahl durchlaufener Zellteilungen werden die Telomersequenzen stetig kürzer bis zu einer kritischen Länge, welche die replikative Seneszenz auslöst (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Weitere Untersuchungen lieferten außerdem Ergebnisse, dass nicht allein die Länge der Telomere, sondern vielmehr eine Störung des Gesamtzustands der Telomerstruktur (Telomer-Dysfunktion) für das Einleiten der replikativen Seneszenz verantwortlich ist (Gilley et al., 2005; Rodier et al., 2005). Durch die Telomer-Dysfunktion werden die gleichen Signalwege aktiviert, welche auch als Reaktion auf DNA-Schäden (d'Adda di Fagagna et al., 2004) oder externe Einflüsse wie oxidativen Stress (Reaper et al., 2004) aktiviert werden. Die Folge ist eine vorzeitige, telomerunabhängige Seneszenz, welche als „**stressinduzierte, vorzeitige Seneszenz**“ (*stress induced premature senescence*) (SIPS) bezeichnet wird (Campisi, 2005).

Durch diese vorzeitige Seneszenz und der damit verbundenen Kontrolle der Teilungsaktivität können Organismen vor der Akkumulation von Zellen geschützt werden, die einen kritischen Grad an potentiell transformierenden Mutationen in sich tragen. Das Risiko der Entstehung von Krankheiten, die auf einer erhöhten Proliferation basieren, wie z.B. Krebs, kann durch diesen Mechanismus gesenkt werden (Campisi, 2001). Zur Induktion eines seneszenten Phänotyps sind zahlreiche Veröffentlichungen erschienen, von denen die wichtigsten in Tabelle 1.1 exemplarisch aufgelistet sind.

Tabelle 1.1: Möglichkeiten zur Induktion zellulärer Seneszenz; modifiziert nach (Toussaint et al., 2002)

Fortlaufende Subkultivierung <i>in vitro</i> (Hayflick & Moorhead, 1961)	
SIPS <i>in vitro</i>	
• H ₂ O ₂	(Frippiat et al., 2001)
• Homocystein	(Xu et al., 2000)
• Busulfan	(Probin et al., 2007)
• Doxorubicin	(Robles et al., 1999)
• <i>Cis</i> -platin	(Wang et al., 1998)
• UV-A	(Wlaschek et al., 2000)
• UV-B	(Brenneisen et al., 2002)
• Gammastrahlung	(Oh et al., 2001)
Überexpression von Proto-Onkogenen	
• raf-1	(Ravi et al., 1999)
• ras	(Serrano et al., 1997)
• Jun-B	(Passegue & Wagner, 2000)
• c-rel	(Bernard et al., 2001)
• E2F1	(Dimri et al., 2000)
Überexpression von Tumorsuppressoren	
• p16	(Alcorta et al., 1996)
• p21	(McConnell et al., 1998)
Stimulation mit Cytokinen	
• TGF-β1	(Katakura et al., 1999)
• IL-1α	(Dewberry et al., 2003)

An der Kontrolle der Teilungsaktivität sind verschiedene Proteine beteiligt, z.B. Proto-Onkogene (Rb) oder Tumorsuppressoren (p53). Durch einen Funktionsausfall von Rb oder p53 kommt es auf der einen Seite zu einer verlängerten Lebensspanne und einem erhöhten Krebsrisiko (Wenyi et al., 2003), während auf der anderen Seite die Aktivierung von p53 bei jungen humanen Zellen zu einem Zellzyklusarrest führt, welcher von einem seneszenten Phänotyp begleitet wird (de Stanchina et al., 1998). Der Zellzyklusarrest ist eines der wesentlichen Merkmale sowohl bei replikativ seneszenten als auch bei induziert seneszenten Zellen.

1.1.2.1 Der Zellzyklus

Voraussetzung für die Entstehung einer neuen Zelle ist die Verdopplung der chromosomal DNA, die Trennung der Chromosomen und ihre Aufteilung auf zwei Tochterzellen. In der S-Phase (Synthese-Phase) wird die DNA repliziert und anschließend in der M-Phase (Mitose-Phase) auf die Tochterzellen verteilt (Müller-Esterl, 2010). Zwischen dem Ende der M-Phase und dem Beginn der S-Phase liegt die G1-Phase (Gap1-Phase), in der Proteine synthetisiert werden und das Zellwachstum voran schreitet. Nach der S-Phase gibt es eine weitere Wachstumsperiode, die G2-Phase, in welcher die Zelle sich für die Mitose vorbereitet. Während dieses Zellzyklus gibt es drei zentrale Kontrollpunkte (Rassow et al., 2012) (s. Abbildung 1.2). In der späten G1-Phase wird der Übergang in die S-Phase kontrolliert, indem die Zelle überprüft, ob eine ausreichende Zellgröße erreicht wurde und keine DNA-Schäden vorliegen. Am Ende der G2-Phase existiert ein weiterer Kontrollpunkt, welcher überprüft, ob die DNA vollständig repliziert wurde oder neue DNA-Schäden vorliegen. Ein dritter Kontrollpunkt überprüft am Ende der M-Phase, ob die beiden Chromosomensätze korrekt aufgeteilt wurden. Sollte an einem der Kontrollpunkte ein Defekt festgestellt werden, wird der Zellzyklus angehalten, sodass die Zelle entweder Reparaturmechanismen startet, die Apoptose oder Seneszenz einleitet. G1-, S- und G2-Phase werden zusammen als Interphase bezeichnet (Müller-Esterl, 2010). Ruhende, sich nicht mehr teilende Zellen können dauerhaft in der G0-Phase der Interphase verharren.

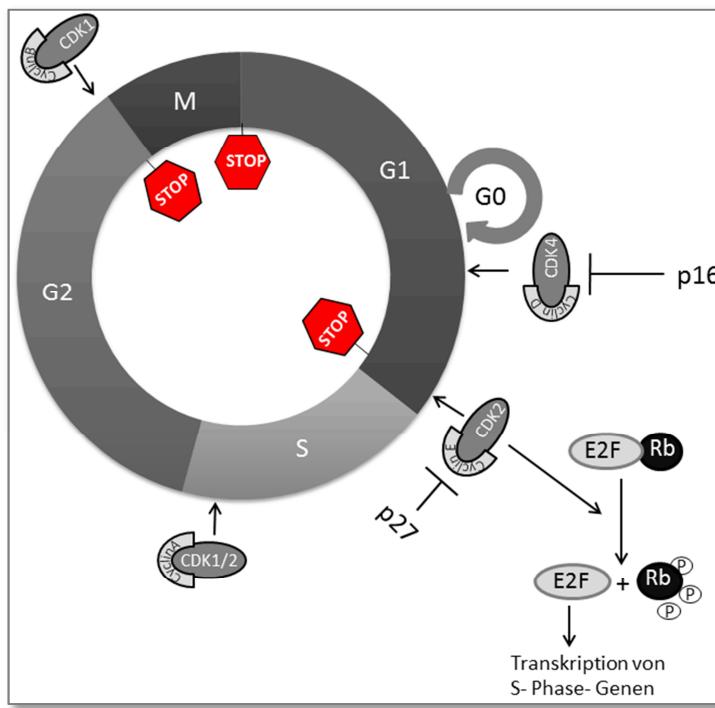


Abbildung 1.2: Regulation der Zellzyklusphasen durch Cycline Die phasenspezifisch exprimierten Cycline reagieren in allen Phasen des Zellzyklus mit spezifischen cyclinabhängigen Kinasen (CDK). Dadurch werden diese CDK's aktiviert und leiten den Übergang in die nächste Phase ein z.B. über eine Phosphorylierung des Rb-Proteins, welches den Transkriptionsfaktor E2F aktiviert und die Transkription von S-Phase-Genen initiiert.

Zur mitotischen Teilung einer Zelle muss diese zunächst mit Hilfe von mitogenen Stimuli aus der G0-Phase in die G1-Phase des Zellzyklus eintreten. Die mitogenen Stimuli steigern die Expression von Cyclinen, welche als Regulatorproteine in Kombination mit den dazugehörigen cyclinabhängigen Kinasen (CDK) das Herzstück des Kontrollsystems bilden (s. Abbildung 1.2). Die Cyclinkonzentration ist im Gegensatz zur Konzentration der CDK's zellzyklusabhängig reguliert und kontrolliert darüber die enzymatische Aktivität der CDK's (Müller-Esterl, 2010). Durch die Aktivierung der cyclinabhängigen Kinasen (CDK's) wird über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus kontrolliert. Die Cyclin-CDK-Komplexe durchlaufen dabei zyklische Veränderungen ihrer Aktivität, sodass z.B. der Komplex aus Cyclin-D und CDK4/6 sein Aktivitätsmaximum in der G1-Phase hat (Rassow et al., 2012). Der Übergang von G1- zur S-Phase wird durch die maximale Aktivität des Cyclin-E-CDK2-Komplexes gesteuert und Cyclin-B reguliert über die Interaktion mit CDK den Übergang von der G2- in die Mitose-Phase (Müller-Esterl, 2010). CDK1 ist während des gesamten Zellzyklus vorhanden, während Cyclin-B phasenweise reguliert wird. Erst in der späten S-Phase wird die Cyclin B Synthese eingeleitet, wodurch das Protein während der S- und der G2-Phase akkumuliert. Erste Voraussetzung für die Aktivierung von CDK1 ist die Assoziation mit Cyclin B. Außerdem muss Threonin161 phosphoryliert und Tyrosin14/Threonin15 dephosphoryliert werden (Löffler, 2008). Durch diese engmaschige Kontrolle wird

verhindert, dass die Zelle unkontrolliert in die Mitose übergeht, sodass eine Teilung nur unter optimalen Bedingungen stattfindet. In der M-Phase werden dann Mechanismen zur Abschaltung von CDK1 in Gang gesetzt (Rassow et al., 2012). Aktive Cyclin-CDK-Komplexe phosphorylieren Substratproteine wie bspw. das Rb-Protein. Das Rb-Protein bindet in seiner nativen Form an den proliferationsfördernden Transkriptionsfaktor E2F, welcher die Expression von Zellzyklusgenen und Genen der DNA-Replikation steuert (Dimri et al., 2000). Ein aktiverter Cyclin-CDK-Komplex phosphoryliert das Rb-Protein und löst es damit aus dem Komplex mit E2F, wodurch E2F-gesteuerte Gene zur Transkription frei gegeben werden. Ein weiteres Beispiel für die Kontrolle der zellulären Proliferation bildet der Tumorsuppressor p53. Ähnlich wie Rb wirkt auch p53 als transkriptioneller Regulator. Nach einem DNA-Schaden wird p53 durch posttranskriptionale Modifikationen aktiviert (Jayaraman & Prives, 1999), wobei die Phosphorylierungen an unterschiedlichen Stellen von p53 auftreten können. Daraufhin initiiert p53 eine Vielzahl von Signalkaskaden, welche zu unterschiedlichen Zyklusarresten führen können (s. Abbildung 1.3). Nach der DNA-Schädigung kann p53 direkt an den Promoter von p21 binden und dessen Transkription einleiten. Durch die erhöhte Expression von p21 wird beispielsweise der Cyclin-C-CDK4-Komplex inhibiert, welcher für den Übergang von der G1- in die S-Phase verantwortlich ist (Müller-Esterl, 2010).

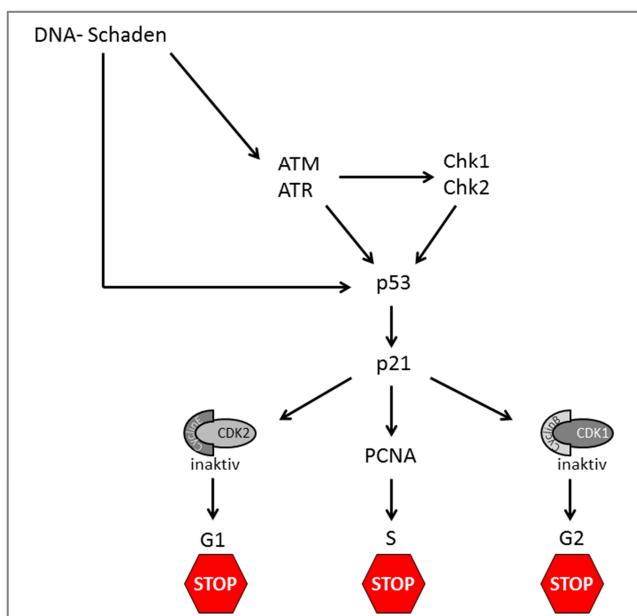


Abbildung 1.3: Zellzykluskontrolle durch p53 nach DNA-Schädigung p53 wird über posttranskriptionale Modifikationen aktiviert und kann direkt an den Promoter von p21 binden und dessen Transkription einleiten. p21 wiederum ist in der Lage unterschiedliche Cyclin-CDK-Komplexe zu inaktivieren, wodurch ein Zellzyklusarrest in der jeweiligen Zyklusphase ausgelöst werden kann.

1.2 Die Haut

1.2.1 Aufbau

Die menschliche Haut gliedert sich histologisch in drei abgrenzbare Schichten: die Epidermis, die Dermis und die Subkutis (Unterhaut) (s. Abbildung 1.4). Des Weiteren befinden sich Haarfollikel sowie Schweiß- und Talgdrüsen in der Haut. Letztere sekretieren verschiedene Substanzen, die auf der Haut einen Hydrolipidfilm bilden, dessen pH-Wert aufgrund der hohen Konzentration an freien Fettsäuren in dem Bereich 5,5-6,5 liegt (Fritsch, 1983). Dieser sogenannte Säureschutzmantel wirkt antibakteriell und schützt die Haut vor äußeren Einflüssen.

In Abhängigkeit vom Ernährungszustand lagert sich in der Subkutis das Fettgewebe ein, wodurch die Unterhaut als Kälteschutz und Energiespeicher dient (Deutschmann, 2007). Oberhalb der Subkutis befindet sich die Dermis. Sie dient als Stütz- und Bindegewebe und besitzt eine hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber mechanischer Beanspruchung. Die Dermis lässt sich aufgrund der Anordnung der Bindegewebefasern in *stratum papillare* und *stratum reticulare* unterteilen. Die äußerste Hautschicht bildet die Epidermis. Sie ist über die Basallamina mit der Dermis verbunden und dient hauptsächlich als natürliche Barriere (Millington & Wilkinson, 1983).

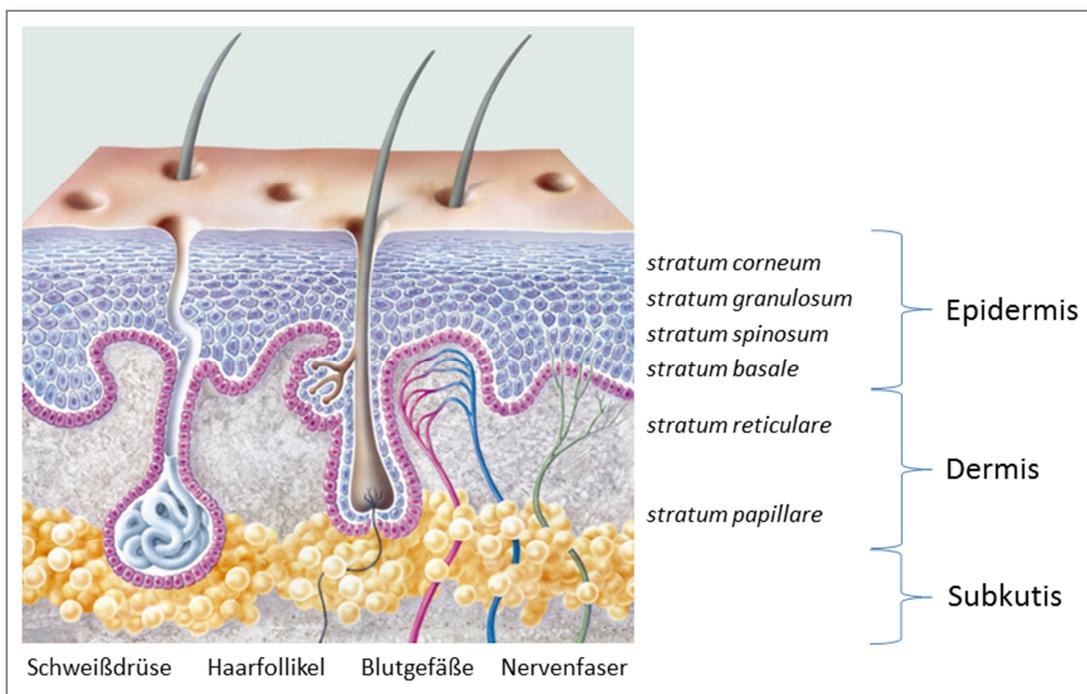


Abbildung 1.4: Aufbau der menschlichen Haut Der Querschnitt zeigt den schematischen Aufbau der Haut bestehend aus Subkutis, Dermis und Epidermis, sowie einen Teil der Hautanhangsgebilde. Die Epidermis wird von Keratinozyten aufgebaut und gliedert sich in *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum* (Modifiziert nach (Deutschmann, 2007)).

1.2.1.1 Epidermis

Als mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel bildet die Epidermis die oberste Hautschicht und besteht zu 90% aus Keratinozyten. Durch den mehrschichtigen Aufbau und den dichten Zellverbund bildet die Epidermis eine funktionelle Barriere und erfüllt damit eine wichtige Schutzfunktion (Deutschmann, 2007). Außerdem ist sie in der Lage, sich durch eine verstärkte Verhornung an eine wechselnde mechanische Beanspruchung anzupassen. Von innen nach außen unterscheidet man insgesamt vier Epidermisschichten: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und *stratum corneum* (Fritsch, 1983). Diese vier Schichten spiegeln den Differenzierungsprozess der Keratinozyten wieder, welcher im *stratum basale* beginnt. Dort befinden sich die epidermalen Stammzellen, aus denen die Keratinozyten durch Teilung hervorgehen. Von den beiden Tochterzellen teilt sich die eine erneut, während die andere beginnt zu differenzieren. Diese wandert über das *stratum spinosum* zum *stratum granulosum*, wo bereits ein Teil der Keratinozyten Keratogranula einlagert und somit leblos werden. Der Übergang in das *stratum corneum* erfolgt, sobald die Keratinozyten vollständig verhornt und damit abgestorben sind. Gemeinsam mit Fetten zwischen den Zellen bildet das *stratum corneum* eine wasserabweisende Schutzschicht (Millington & Wilkinson, 1983).

1.2.1.2 Dermis

Die Dermis liegt oberhalb der Subkutis und ist ein fibroelastisches Bindegewebe. In der Dermis sind zahlreiche Blut- und Lymphgefäße, sowie Drüsen, Haarwurzeln und Sinnesrezeptoren verankert. Durch die in der Dermis liegenden Gefäße wird die Epidermis über Diffusion mit Nährstoffen versorgt. Die Dermis besteht aus reißfesten Kollagenfasern und aus elastischen Fasern, wodurch sich sowohl eine starke Reißfestigkeit als auch eine hohe Elastizität ergibt. Die extrazelluläre Matrix der Dermis besteht zu ca. 75% aus Kollagen und ist überwiegend durch Fibroblasten bewachsen. Diese zeichnen sich durch eine besonders hohe Synthesekapazität aus (Wolff et al., 2007) und produzieren sowohl Strukturproteine wie Kollagen, Elastin, Fibronektin und Laminin, als auch extrazelluläre Matrixkomponenten wie Glukosaminoglykane oder Proteoglykane (Fritsch, 1983).

Die Dermis besteht überwiegend aus Kollagenfasern vom Typ I (80-90%) (Kadler, 1994). Der Rest teilt sich auf die Kollagene III, IV, V, VI und VII auf, wobei Kollagen IV und VII beispielsweise wichtig für die Verankerung zwischen Dermis und Epidermis sind (Fratzl, 2008). Das Kollagen wird als lösliches Prokollagen von den Fibroblasten in der Dermis gebildet und in den extrazellulären Raum sekretiert. Dort wird es enzymatisch umgebaut, wodurch nach Abspaltung terminaler Peptide das Kollagen durch die Lysyloxidase quervernetzt werden kann. Diese sogenannten Fibrillen lagern sich wiederum zu Fasern zusammen, die wiederum gebündelt das eigentliche Kollagen ergeben (Fratzl, 2008). Neben der Synthese findet in der Dermis ebenso der Abbau der extrazellulären Matrix

statt. Die Fibroblasten synthetisieren spezielle Proteasen, die aufgrund ihres Gehalts an Metall-Ionen als Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bezeichnet werden (Kester & Matthews, 1977).

1.2.2 Funktion

Die Haut ist mit einer Fläche von ca. 2 m^2 und einem Gewicht von bis zu 4 kg das größte Organ des menschlichen Körpers und bildet eine natürliche Barriere zur Umwelt. Sie ist das vielfältigste Organ des menschlichen Körpers, da sie zahlreiche Funktionen erfüllt, von denen in Tabelle 1.2 die Wichtigsten aufgelistet sind.

Tabelle 1.2: Funktionen der Haut

Funktion	
Grenzorgan	Schützt vor dem Eindringen von Krankheitserregern und Fremdstoffen, sowie vor dem Verlust von Flüssigkeiten, Elektrolyten oder Proteinen.
Stoffaustausch	Stoffe aus der Umgebung können aufgenommen oder abgegeben werden.
Wärmehaushalt	Durch die Schweißproduktion wird Wärme abgegeben und mit Hilfe des Unterfettgewebes und der Behaarung zurückgehalten.
UV-Schutz	Sowohl Hornschicht als auch Haare und die Pigmentierung dienen als Schutzmechanismen gegen UV-Strahlung.
Kontakt- und Sinnesorgan	Mit Hilfe unterschiedlicher Rezeptoren kann die Haut verschiedene Reize aufnehmen und weiter leiten.
Stammzellreservoir	Enthält adulte Stammzellen, die durch vier zusätzliche Gene, welche durch Retroviren eingeschleust werden zu pluripotenten Stammzellen umgewandelt werden können (Yu et al., 2007).
Repräsentation	Die Haut stellt den sichtbaren Teil des menschlichen Körpers dar und prägt somit das Erscheinungsbild des Menschen.

1.2.3 *In vitro* Hautmodelle

Der Einsatz dreidimensionaler organotypischer Gewebemodelle hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen, wobei Hautmodelle zu den ersten Entwicklungen gehörten (Bell et al., 1983). Die Grundlage für Arbeit mit organotypischen Hautmodellen legten Fusenig und Prunieras im Jahre 1983 (Fusenig et al., 1983; Prunieras, 1983), welche erstmalig die Kultivierung epidermaler Zellen auf Kollagensubstraten und an der Luft-Medium-Grenze beschrieben und zeigten, dass die so kultivierten Hautmodelle histologische Ähnlichkeit mit dem Originalgewebe besitzen (Parenteau et al., 1991; Regnier et al., 1992). Durch die Hautmodelle konnten die grundlegenden biologischen Funktionen der Haut besser verstanden werden und eine Alternative zu Tierversuchen für pharmakotoxikologische und kosmetische Wirkstoffprüfungen etabliert werden (Liu et al., 2009). Aufgrund der EU-Chemikalienverordnung REACH, welche besagt, dass immer Alternativmethoden zum Tierversuch verwendet werden müssen, sofern diese verfügbar sind und außerdem kosmetische Mittel nach dem 11. März 2013 nicht mehr in Verkehr gebracht werden dürfen, wenn diese oder deren Bestandteile im Tierversuch überprüft worden sind, wird der Bedarf an organotypischen Gewebemodellen auch zukünftig stark ansteigen (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm).

Für den Aufbau eines Vollhautmodells mit proliferierender und differenzierender Epidermis müssen zunächst Keratinozyten und Fibroblasten isoliert und kultiviert werden. Die Fibroblasten werden in eine dreidimensionale Matrix eingesät und anschließend die Keratinozyten aufgesät. Die Keratinozyten erfordern nach der Isolierung aus dem nativen Gewebe eine komplexere Kultivierung. Sie müssen entweder in serumhaltigem Medium auf Feederlayern oder in serumfreiem Spezialmedium kultiviert werden (Rheinwald & Green, 1975). Das serumhaltige Medium wurde 1975 von Rheinwald und Green entwickelt und später durch Zusätze wie EGF (*epidermal growth factor*), Insulin und Choleratoxin optimiert (Rheinwald, 1976). Durch diese Optimierung ist eine Kultivierung der Keratinozyten als Monolayer möglich, sodass grundlegende biologische Mechanismen untersucht werden können. Ein vollständig differenziertes Epithel entwickelt sich jedoch nur durch die luftexponierte Kultivierung von Keratinozyten auf einer Matrix (Bell et al., 1981; Prunieras, 1983). Somit bieten Ganzhautmodelle bestehend aus einer Matrix mit Fibroblasten und nativen Keratinozyten eine Alternative zu Tierversuchen und *in vivo* Untersuchungen. Dreidimensionale Hautmodelle kommen unter anderem in Metabolisierungsstudien, Toxizitätsprüfungen, Wundheilungsversuchen und in der kosmetischen Forschung zum Einsatz.

1.3 Hautalterung

Die Hautalterung ist ein fortlaufender Prozess, der letztendlich in einem veränderten Erscheinungsbild und funktionellen Veränderungen mündet. Von allen Alterserscheinungen des Organismus sind die Vorgänge an der menschlichen Haut besonders früh und deutlich zu erkennen. Erste Alterszeichen können an der Haut schon ab einem Alter von 25 Jahren beobachtet werden, wobei die Geschwindigkeit der Alterungsvorgänge von Mensch zu Mensch sehr unterschiedlich ist.

1.3.1 Prozesse der Hautalterung *in vivo* und *in vitro*

Die Vielzahl der Alterungstheorien (s. Kapitel 1.1.1) verdeutlicht einmal mehr, dass der Prozess des Alterns ein sehr komplexer Vorgang mit zellbiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Mechanismen ist. Diese Vielzahl an Mechanismen spielt auch bei der Hautalterung eine zentrale Rolle. Als mechanische und biologische Grenze zwischen den inneren Organen und der Umwelt, ist die Haut sowohl endogenen als auch exogenen Einflüssen ausgesetzt. Dadurch werden die Ursachen der Hautalterung in zwei Gruppen unterteilt: intrinsisch und extrinsisch, wobei es immer ein Zusammenspiel beider Prozesse ist.

1.3.1.1 Intrinsische Hautalterung

Der Prozess der intrinsischen Hautalterung vollzieht sich langsam und mit steigendem Lebensalter. Sie wird oft als chronologische oder genetische Hautalterung bezeichnet. Sie läuft für das gesamte Organ gleichmäßig ab und ist die Folge einer natürlichen, genetischen Determinierung (Farage et al., 2008).

Als mögliche Ursachen für die intrinsische Hautalterung werden beispielsweise das Hayflick-Limit (s. Kapitel 1.1.1), Veränderungen im Immunsystem (Galvao et al., 1998), Stoffwechselvorgänge und der Hormonhaushalt diskutiert. Die Prozesse sind jedoch nicht endgültig verstanden. Bezuglich des Hormonhaushaltes ist eine Abnahme der Östrogene im Alter zu beobachten (Affinito et al., 1999; Kaatz et al., 2008), wodurch eine Verminderung des Kollagengehalts und der elastischen Fasern diskutiert wird (Brincat et al., 1983; Bentley et al., 1986). Eine mögliche Folge der intrinsischen Veränderungen sind beispielsweise durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöste DNA-Mutationen, welche in gealterter Haut akkumulieren und zu einer fehlerhaften Transkription von Genen führen kann. Die intrinsische Hautalterung wird somit durch ein komplexes System von parallel ablaufenden Prozessen hervorgerufen und kann bisher nur in geringem Maße beeinflusst werden.

Intrinsisch gealterte Haut ist äußerlich dadurch gekennzeichnet, dass sie eine feine Faltenbildung aufweist, erste Anzeichen von Erschlaffung zeigt, sowie regelmäßig pigmentiert ist (Gilchrest & Krutmann, 2006). Die Haut wird anfälliger für Bagatelltraumen, die Wundheilung ist verlangsamt und die Aktivität der Schweiß- und Talgdrüsen sowie Haarfollikeln ist verringert. Ursächlich für dieses Erscheinungsbild ist eine Abnahme der Dicke aller Hautschichten, sowie molekulare und biochemische Veränderungen. In der Epidermis nimmt die Proliferationsrate der Keratinozyten ab und die Regeneration der Hornschicht nach einer Verletzung ist verringert (Elias & Ghadially, 2002). Die Dicke der Dermis nimmt aufgrund von Veränderungen der Matrixproteine ab, bei denen das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau zum Abbau hin verschoben ist (Gilchrest & Krutmann, 2006).

Bisherige Maßnahmen zur Abmilderung der Folgen einer intrinsischen Hautalterung sind nur begrenzt erfolgreich. So werden beispielsweise rückfettende Formulierungen verwendet, um die zunehmende Hauttrockenheit und verminderte Elastizität abzumildern (Boni & Burg, 2000). Zusätzlich wird versucht, durch Antioxidantien die Menge an freien Radikalen zu verringern (s. Kapitel 1.4). Insgesamt können die Ursachen und die Folgen der intrinsischen Hautalterung bisher nur sehr mäßig beeinflusst werden, wobei die Maßnahmen aufgrund der genetischen Determinierung individuell angepasst werden müssen. Der genetische Einfluss spielt jedoch nicht ausschließlich bei der intrinsischen, sondern in geringem Umfang auch bei der extrinsischen Hautalterung eine Rolle. So bestimmt beispielsweise der Hauttyp, in welchem Ausmaß die extrinsischen Faktoren wirksam werden (Falk & Anderson, 2013).

1.3.1.2 Extrinsische Hautalterung

Neben der intrinsischen Hautalterung unterliegt die Haut aufgrund ihrer Barrierefunktion auch lebenslang unterschiedlichen Umwelteinflüssen. Zu diesen extrinsischen Einflüssen zählen unter anderem UV-Strahlung, Umweltnoxen (z.B. Tabakrauch oder Ozon), die individuelle Lebensführung sowie die Ernährung. Es wird vermutet, dass ca. 80% des Hautalterungsprozesses auf das UV-Licht zurück zu führen sind (Gilchrest, 1989), wodurch die extrinsische Hautalterung oft auch als „Lichtalterung“ bezeichnet wird.

Die Vielzahl der exogenen Einflüsse bietet ein breites Spektrum für mögliche Ursachen. Auf der einen Seite ist beschrieben, dass durch UV-Licht reaktive Sauerstoffspezies induziert werden (Scharffetter-Kochanek et al., 1997; Brenneisen et al., 1998), wodurch zum einen die Kollagenmenge verringert (Brenneisen et al., 2002) und Makromoleküle wie Proteine oder DNA oxidiert werden. Studien haben gezeigt, dass *in vivo* gealterte Haut durch vermehrte Proteinoxidation (Sander et al., 2002) und einen Anstieg an mitochondrialen Mutationen gekennzeichnet ist (Berneburg et al., 2004). Die Ursachen dafür liegen in einem Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies, welche durch UV-Licht

induziert werden. Auf der anderen Seite wird durch das UVB-Licht ein charakteristischer DNA-Schaden erzeugt. Benachbarte Pyrimidinbasen eines DNA-Strangs werden zu Dimeren verknüpft, wodurch es zu einer fehlerhaften Replikation kommen kann. Diese Pyrimidindimere werden ebenfalls als Induktion für Matrix-Metalloproteininasen (MMP) diskutiert (Dong et al., 2008). Neben der DNA sind aber auch Proteine in der Lage als Chromophore für UV-Licht zu fungieren, wobei im Zuge der Hautalterung dermales Kollagen und Elastin besonders wichtig sind, da sie für die Elastizität und Stabilität der Haut verantwortlich sind. Neben UV-Licht bilden alkylierende Substanzen eines der häufigsten Umweltgifte in unserer Umgebung, vor denen sich der Organismus nur in geringem Maße schützen kann. Die Alkylierung wird häufig durch Sekundärreaktionen der DNA mit Metaboliten oder anderen Toxinen wie z.B. Zigarettenrauch ausgelöst. *In vivo* wird die vorzeitige Hautalterung bei Rauchern dem alkylierenden DNA-Schaden durch Zigarettenrauch zugeschrieben (Tubbs et al., 2009).

Extrinsische Hautalterung zeigt vor allem charakteristische Veränderungen in der dermalen Matrix, wie z.B. Elastosen, welche in intrinsisch gealterter Haut nicht beobachtet werden konnten (Krutmann, 2003). Auf der einen Seite wird eine Akkumulation von degeneriertem und fragmentiertem Material der Dermis als Ursache in Betracht gezogen, auf der anderen Seite wird die Ansammlung elastotischen Materials (Fibrillin und Elastin die in ihrer Organisation und Funktion gestört sind) als mögliche Ursache beschrieben (Sellheyer, 2003). Weitere typische Merkmale einer lichtgealterten Haut sind grobe Falten, unregelmäßige Pigmentierung, teilweise verdicktes *stratum corneum*, weniger Haarfollikel, eine verringerte Aktivität von Schweiß- und Talgdrüsen, sowie eine starke Veränderungen bezüglich der Kollagenfasern. Die Kollagenfasern in alter Haut nehmen mengenmäßig ab (Shuster et al., 1975), erscheinen weniger kompakt und strukturiert (Bernstein et al., 1996) und werden häufiger quervernetzt als in junger Haut (Sell et al., 1996). Die Abnahme des Kollagengehalts ist zum einen auf eine verminderte Kollagensynthese und zum anderen auf einen vermehrten Abbau durch Matrix-Metalloproteininasen zurückzuführen (Wlaschek et al., 1995; Brenneisen et al., 1998; Brenneisen et al., 2000). Die Aktivierung von MMP konnte ebenfalls durch andere exogene Noxen wie beispielsweise vermehrten Nikotinkonsum oder Infrarotstrahlung beobachtet werden (Boyd et al., 1999). Da es sich nicht um ein genetisch festgelegtes Programm handelt, bietet die extrinsische Hautalterung wesentlich mehr Ansätze für mögliche Anti-Aging-Strategien. Das größte Gebiet der Anti-Aging-Strategien gegen die Lichtalterung der Haut bietet der Schutz vor UV-Licht. Außerdem konnte in epidemiologischen Studien gezeigt werden, dass der BMI (**body mass index**) negativ mit der Hautalterung korreliert (Purba et al., 2001) und eine Einschränkung des Tabakkonsums wesentliche Merkmale einer gealterten Haut verringert (Yin et al., 2000).

1.3.2 Hautalterung *in vitro* (Fibroblasten als Modellsystem)

Die Untersuchung altersbedingter biochemischer, molekularbiologischer und zellulärer Veränderungen an isolierten Hautzellen hat wesentlich dazu beigetragen, grundlegende Aspekte der Hautalterung *in vivo* besser zu verstehen. Das Altern wurde bis in die 1950er Jahre als zeitliche Abnutzung verstanden und dessen molekularen Ursachen nicht erkannt. Die molekularen Veränderungen konnten erst analysiert werden, als es möglich wurde, Säugetierzellen *in vitro* zu kultivieren (Hayflick, 1965; Mitnitski et al., 2002). Hayflick entdeckte 1961, dass isolierte Fibroblasten *in vitro* eine begrenzte proliferative Kapazität besitzen, die in einem Zellzyklusarrest endet und als replikative Seneszenz bezeichnet wird (Hayflick & Moorhead, 1961). Die Untersuchungen von Hayflick (s. Kapitel 1.1.2) rückten Hautfibroblasten als Modellsystem in den Fokus der Altersforschung. Fibroblasten sind spindelförmige Bindegewebszellen mesenchymaler Herkunft und bilden den Hauptanteil der Zellen in der Dermis der Haut, wobei sie eine wichtige Rolle bei der Synthese der extrazellulären Matrix (EZM) einnehmen. Für die Untersuchung von Fibroblasten werden überwiegend Zellkulturen aus Hautfibroblasten verwendet. Die Hautfibroblasten werden aus Biopsien gewonnen und anschließend kultiviert (Jensen et al., 1964), wobei sie sich an ihre Wachstumsunterlage anheften und Zellverbände bilden. Unter günstigen Bedingungen teilen sich die Zellen bis zur Kontaktinhibition. Danach stellen sie ihre Teilungsaktivität ein, können diese jedoch wieder aufnehmen, sobald die Kontaktinhibition durch Subkultivierung aufgelöst wurde. Die Wiederaufnahme der Teilungsaktivität ist aber nicht unbegrenzt möglich, sodass es durch eine fortlaufende Subkultivierung zu einem Verlust der Teilungsfähigkeit und damit zum Proliferationsstoppt kommt (Hayflick & Moorhead, 1961; Ben-Porath & Weinberg, 2005). *In vitro* konnte beobachtet werden, dass dieser Proliferationsstoppt mit einer Reihe von strukturellen, physiologischen, biochemischen und molekularbiologischen Veränderungen einhergeht, welche als Seneszenz-Marker genutzt werden und Erklärungsansätze für die Veränderungen *in vivo* gealterter Haut liefern. Eine Zusammenfassung der wichtigsten phänotypischen Veränderungen ist in Tabelle 1.3 aufgeführt. Campisi beispielsweise beschrieb anhand von Zellkulturexperimenten, dass die zelluläre Seneszenz mehr als ein reiner Wachstumsarrest ist (Campisi, 2001). Sie fand heraus, dass die zelluläre Seneszenz aufgrund eines speziellen Seneszenz-assoziierten, sekretorischen Phänotyps (SASP) ein wichtiger Schutzmechanismus gegen Krebs ist und die Wundheilung fördern kann. Durch den Wachstumsarrest bildet die Seneszenz in der frühen Entwicklung einen Schutz vor Krebs, da potentiell entartete Zellen seneszent werden und somit eine unkontrollierte Vermehrung verhindert wird. Auf der anderen Seite führt in der späten Entwicklung die Ausschüttung von Amphiregulin durch senescente Fibroblasten zu einer Stimulation der Proliferation von Tumorzellen und eine vermehrte IL-6 bzw. IL-8-Produktion fördert die Invasion von Tumorzellen durch die Basalmembran (Rodier & Campisi, 2011). Es wird deutlich, dass die Seneszenz ein

komplexer Prozess ist, der unterschiedliche Auswirkungen auf den Organismus haben kann. Die Ergebnisse aus *in vitro*-Untersuchungen führen dazu, dass neue Erkenntnisse für die Veränderungen *in vivo* gealterter Haut gewonnen werden und altersabhängige Krankheiten wie z.B. Krebs oder Arteriosklerose besser verstanden werden können.

Tabelle 1.3: Phänotypische Veränderungen von replikativ seneszenten Fibroblasten *in vitro*

Strukturelle Veränderungen	Physiologische Veränderungen	Biochemische und molekularbiologische Veränderungen
<ul style="list-style-type: none"> • Zellform wird abgeflacht und unregelmäßig • Zellmembran wird steifer • Mehr Vakuolen • Zelle wird polynukleid 	<ul style="list-style-type: none"> • Ionenpumpe weniger aktiv • Verändertes Membranpotential • Weniger Energieproduktion • Empfindlicher gegenüber Stressoren 	<ul style="list-style-type: none"> • Dauerhafter G1-Arrest • Mehr Zellzyklusinhibitoren • Verkürzte Telomere • Mehr DNA-Schäden • Mehr Protein-Schäden • ROS-Gehalt steigt an • Spezieller sekretorischer Phänotyp

Das heutige Verständnis der zellulären und molekularbiologischen Grundlagen des Alterns fußt auf der von Hayflick beschriebenen Theorie der zellulären Seneszenz von Fibroblasten *in vitro*. Durch dieses System konnte analysiert werden, dass Alterung eine Folge von akkumulierten Schäden an unterschiedlichen Molekülen wie z.B. DNA, Proteinen oder Lipiden darstellt und wodurch die Funktionalität und die Reparaturfähigkeit gealterter Zellen beeinträchtigt werden. Die Schäden werden durch unterschiedliche Pathomechanismen hervorgerufen, welche sowohl bei der Hautalterung *in vivo* als auch *in vitro* eine wichtige Rolle spielen.

1.3.3 Pathomechanismen der Hautalterung *in vivo* und *in vitro*

Die klinischen Veränderungen *in vivo* gealterter Haut lassen sich aus den molekularen Mechanismen der Hautalterung direkt ableiten und spielen auch bei der *in vitro* Alterung von Fibroblasten eine zentrale Rolle. Viele dieser Mechanismen sind sowohl bei der extrinsischen als auch bei der intrinsischen Hautalterung ähnlich, obwohl die auslösenden Faktoren unterschiedlich sind.

1.3.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

In Kapitel 1.1.1.1 wurde bereits die zentrale Rolle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Alterungsprozess beschrieben. Es gibt intrinsische und extrinsische Quellen für ROS. Endogen entstehen ROS beispielsweise in Peroxisomen, im Cytosol, in Lysosomen, in Plasmamembranen oder in Mitochondrien. Im Rahmen der Energiegewinnung (intrinsisch) können O_2^- , H_2O_2 und $HO\cdot$ als Zwischenprodukte freigesetzt werden und aufgrund ihrer hohen Reaktivität mit anderen zellulären Molekülen reagieren. Extrinsische ROS-Quellen sind UV- oder ionisierende Strahlung, Xenobiotika sowie virale oder bakterielle Infektionen (Farage et al., 2010). Zelluläre Makromoleküle wie z.B. DNA, Proteine und Lipide können durch ROS geschädigt werden, sodass beispielsweise vermehrt DNA-Mutationen, oxidierte Proteine und Lipidhydroperoxide entstehen. ROS können zu Schädigungen von Makromolekülen wie Nukleinsäuren, Proteinen oder Lipiden führen (Sies, 1997). Durch die Oxidation von DNA können Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche und DNA-Addukte wie 8-Hydroxy-2-Deoxyguanin (8-OH-dG) entstehen, welche zu Mutationen oder Deletionen führen können (Ames et al., 1993). Bei Proteinen kann nahezu jede Aminosäure durch ROS oxidiert werden, wodurch es zu einer funktionellen Veränderung oder einem Funktionsverlust des Proteins kommen kann. Durch die Proteinoxidation werden die Seitenketten modifiziert, indem z.B. eine Carbonylgruppe eingeführt wird oder es zur Bildung von sulfenischen, sulfinischen oder sulfonischen Säuren an den Cystein-Resten kommt (Jacob et al., 2003). Die Modifikationen beeinflussen die Signaltransduktion und verändern die Aktivität der Proteine (Poole et al., 2004). Beispielsweise kann durch ROS die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1, NF- κ B oder HIF-1 beeinflusst werden, sodass es zu einer veränderten Genexpression kommt (Brenneisen et al., 2002).

Die Zelle verfügt jedoch über verschiedene Schutzmechanismen, um sich gegen die Schädigung durch ROS zu schützen. Sie beruhen auf der Bereitstellung von Antioxidantien, welche direkt oder indirekt mit ROS reagieren und dadurch verhindern, dass die unterschiedlichen Zellkomponenten durch ROS oxidiert werden (Halliwell, 1989). Es gibt nicht-enzymatische und enzymatische Antioxidantien (Sies, 1993). Vitamin-E, Vitamin-C, Carotinoide und Glutathion (GSH) gehören zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien. Zu den enzymatischen Antioxidantien werden Superoxiddismutases (SOD), Catalasen, Glutathionperoxidases (GPX) und Glutathion-S-Transferasen (GST) gezählt. Superoxiddismutases katalysieren beispielsweise die Disproportionierung des Superoxidradikalions zu Wasserstoffperoxid, welches durch die Catalase zu Wasser und O_2 abgebaut wird (Jacob et al., 2003). Überlastet der Körper diese Abwehrmechanismen durch kontinuierliche ROS-Bildung, kommt es jedoch zu einer Akkumulation an Schäden, welche wiederum die Hautalterung fördern.

1.3.3.2 Mutationen der mitochondrialen DNA (mtDNA)

Die Hauptaufgabe der Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP, welche mit Hilfe der Atmungskette am Komplex V (ATP-Synthase) gewährleistet wird. Die ATP-Synthese ist an den Prozess der oxidativen Phosphorylierung gekoppelt, die an der inneren Mitochondrienmembran stattfindet und bei der auch unter physiologischen Bedingungen ein Teil der Elektronen aus der Elektronentransportkette entweicht, wodurch es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt (Chance et al., 1979). Da Mitochondrien ihr eigenes genetisches Material (mtDNA) enthalten, kommt es als Folge der ROS-Produktion und einer verminderten Reparaturkapazität vermehrt zu Mutationen an der mtDNA. Eine der häufigsten mtDNA-Mutationen ist die sogenannte „common deletion“. Diese Deletion führt zu einem Verlust von mehreren Genen, welche Proteine der Atmungskette und mitochondriale tRNA's codieren. Anhand von Mausmodellen konnte ein Zusammenhang zwischen mtDNA-Mutationen und dem Alterungsprozess gezeigt werden, da Mäuse mit einer erhöhten Menge an mtDNA-Mutationen eine verkürzte Lebensdauer zeigten (Trifunovic, 2006). Des Weiteren konnten „common deletions“ durch wiederholende UVA-Bestrahlung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in Hautfibroblasten induziert werden (Berneburg et al., 2004) und wurden sowohl bei intrinsisch als auch bei extrinsisch gealterter Haut vermehrt nachgewiesen (Eshaghian et al., 2006). Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass in Folge von UVA-Strahlung unter anderem Singulett-Sauerstoff gebildet wird, welcher über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-2 zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. ICAM-1 führt (Grether-Beck et al., 1996). ICAM-1 gilt als zentrales Molekül der Immunantwort und könnte somit einen wichtigen Faktor bei der Pathogenese des malignen Melanoms in Folge einer erhöhten UV-Exposition spielen. Als weitere Auswirkung von exogenen Noxen wie z.B. UV-Licht oder ROS ist die Induktion der Transkriptionsfaktoren AP-1, AP-2 und NF-κB beschrieben. Durch diese Faktoren erfolgt innerhalb weniger Stunden unter anderem die Aktivierung von Genen zur Transkription von Matrix-Metalloproteininasen (MMP) (Brenneisen et al., 2002). Die Matrix-Metalloproteininasen scheinen überwiegend für die klinischen Veränderungen der gealterten Haut verantwortlich zu sein (s. Kapitel 1.3.1), da sie vorwiegend Matrixproteine wie Kollagen oder Elastin degradieren (Wlaschek et al., 1995; Brenneisen et al., 1996).

1.4 Anti-Aging-Strategien

Die Lebenserwartung der Menschen in Europa hat in den letzten Jahrzehnten stetig zugenommen. Klinische Anzeichen für Alterungsprozesse werden vor allem an dem Organ Haut besonders früh und besonders deutlich sichtbar. Da gerade in westlichen Kulturkreisen sichtbare Falten als Zeichen des Älterwerdens nicht als erstrebenswert gelten, kommt der Frage nach Anti-Aging-Strategien in der dermatologischen Forschung eine immer größere Bedeutung zu (Boni & Burg, 2000). Neben der Kontrolle der Ernährung, des Gewichts, der Fitness und des Hormonhaushaltes, wird das Spektrum möglicher Anti-Aging-Strategien in der Dermatologie durch spezifische konservative, systemische und minimalinvasive Behandlungsmöglichkeiten erweitert, welche versuchen, die Hautalterungserscheinungen zu reduzieren (Jacobi, 2005). Aufgrund der extrem großen Vielfalt dermatokosmetischer Wirkstoffe werden im Rahmen dieses Kapitels nur einige wenige ausgewählt und näher charakterisiert.

1.4.1 Dermatokosmetische Wirkstoffe

Für eine erfolgreiche Anwendung muss das Verhältnis zwischen Verträglichkeit und Wirksamkeit optimal eingestellt sein und der ausgewählte Wirkstoff muss sowohl penetrieren als auch ein hohes Maß an Stabilität zeigen. Derzeit werden dermatokosmetische Wirkstoffe in drei unterschiedliche Kategorien eingeteilt (s. Tabelle 1.4 modifiziert nach Plewig & Thomas, 2007):

Tabelle 1.4: Einteilung dermatokosmetischer Anti-Aging-Wirkstoffe

Kategorie	Wirkstoff	Wirkmechanismus	Beispiel
Erste Generation	Vitamine A/ C/ E Coenzyme Sek. Pflanzenstoffe	Überwiegend antioxidative Wirkung	Retinsäure Ubiquinon 10
Zweite Generation	Wachstumsfaktoren Peptide	Kollagenstoffwechsel anregen	Kupfer Tripeptid Palmitoyl Pentapeptid
Dritte Generation	Polypeptide	Freisetzung von Neurotransmittern inhibiert → weniger Mimikfalten	Acetyl-Hexapeptid-3

1.4.1.1 Vitamine

Vitamin-A und seine Derivate sind sowohl bei der intrinsischen als auch bei der extrinsischen Hautalterung sehr wirksam. Vitamin-A kommt ausschließlich im tierischen und menschlichen Organismus vor und entsteht überwiegend beim Abbau von Carotinoiden. Vitamin-A-Derivate gehören zu den wenigen Anti-Aging-Substanzen, deren klinische Wirksamkeit wissenschaftlich gut erforscht und belegt ist (Wohlrab, 1990; Varani et al., 2000; Griffiths, 2001; Quan et al., 2011).

Die Wirkung entfaltet sich im dermalen Bindegewebsstoffwechsel. Die Wirkstoffgruppe besteht aus verschiedenen Substanzen bzw. Derivaten wie zum Beispiel dem fettlöslichen Vitamin-A (Retinol), der Vitamin-A-Säure (Retinsäure) und dem Aldehyd (Retinaldehyd). Zunächst wurden Retinoide bei Patienten mit *Akne vulgaris* eingesetzt. Da als klinischer Nebeneffekt eine Verminderung der Hautfalten zu erkennen war, wurde es auch als Anti-Aging-Substanz verwendet. Die Wirksamkeit der Vitamin-A-Derivate wird in mehreren Publikationen dokumentiert (Goldfarb et al., 1989; Griffiths, 2001; Quan et al., 2011), wobei durch den Einsatz von Retinsäure zum Beispiel typische Zeichen der UV-induzierten vorzeitigen Hautalterung wie Falten oder Elastizitätsverlust deutlich verringert werden konnten (Goldfarb et al., 1989). Des Weiteren sind Effekte zur Steigerung der Kollagensynthese und zur Verminderung der Synthese von kollagenabbauenden Enzymen (Matrix-Metalloproteininasen) beschrieben (Griffiths, 2001). Jedoch besitzt Retinsäure einige negative Effekte. So wurden beispielsweise bei einer Studie bezüglich der Kanzerogenität, Ratten und Mäusen über 2 Jahre hohe Dosen Vitamin-A mit dem Trinkwasser zugeführt. Die Versuchstiere entwickelten daraufhin benigne (gutartige) und maligne (bösertige) Tumore (McPhillips et al., 1988). Weitere Untersuchungen bezüglich der akuten und embryo-fötalen Toxizität veranlassten die Kosmetikrichtlinie der EU, dass Vitamin-A und seine Derivate aufgrund ihrer hautirritierenden, kanzerogenen und teratogenen Eigenschaften ab 2013 nicht mehr in Kosmetika enthalten sein dürfen (<http://ec.europa.eu/consumers/sectors/cosmetics/documents/directive>).

Vitamin-C zählt zu den wichtigsten Redoxsystemen des Organismus und wirkt außerdem direkt auf den Kollagenhaushalt, indem es an der Hydroxylierung des Kollagenvorläufers P1NP beteiligt ist. Durch die Anwendung von Vitamin-C kommt es zu einer erhöhten mRNA-Expression für kollagensynthetisierende Enzyme und zu einer Abnahme der Matrix-Metalloproteininasen. Neben dieser Wirkung auf den Bindegewebsstoffwechsel fördert Vitamin-C auch die Differenzierung der Epidermis. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von Ascorbinsäure die epidermale Barriere rekonstruierter Haut zunimmt (Darr et al., 1992; Podda & Grundmann-Kollmann, 2001).

1.4.1.2 Antioxidantien

Flavonoide gehören zu den polyphenolischen Verbindungen, die überwiegend in Pflanzen vorkommen. Eine vergleichsweise gut dokumentierte Substanz dieser Gruppe der sekundären Pflanzenstoffe ist das α -Glucosylrutin, dessen Schutz gegen UV-induzierte oxidative Hautschädigungen nachgewiesen werden konnte (Sies & Stahl, 2004). Ebenso bieten **Polyphenole**, welche in grünem Tee enthalten sind, antioxidative Eigenschaften. Epicatechin stellt einen wichtigen Vertreter dieser Stoffgruppe dar und konnte *in vivo* eine photoprotektive Wirkung zeigen (Katiyar, 2003). **Coenzym Q10** bildet ein weiteres Antioxidans. Es ist in der Phospholipidmembran der Zellen lokalisiert und ist in der Lage, oxidiertes Vitamin-E zu reduzieren.

1.4.1.3 Peptide

Peptide werden in der dermatologischen Kosmetik unter anderem zur Stabilisierung und Freisetzung von Metallionen wie z.B. Kupfer genutzt. Kupfer ist für viele Zellen essentiell und ist beispielsweise für die Quervernetzung von Kollagen und Elastin wichtig, da das hierfür notwendige Enzym Lysyloxidase kupferabhängig ist. Experimentell konnte eine Steigerung der Kollagensynthese in Fibroblasten gezeigt werden, die mit Kupfertripeptid behandelt wurden (Pickart et al., 2012).

1.5 Mitomycin-C

Mitomycin-C (MMC) ist ein natürliches Antibiotikum, welches aus *Streptomyces caespitosus* isoliert werden kann. Als bifunktionelles Alkyland wird es überwiegend in der Tumortherapie als Mono-oder Kombinationstherapeutikum für die Behandlung von gastrointestinalen Adenokarzinomen und Bronchialkarzinomen (Paz et al., 1999) oder im Rahmen der Diagnostik von Fanconi-Anämie (Castella et al., 2011) eingesetzt. Nach metabolischer Aktivierung von Mitomycin-C durch Reduktasen, kann MMC mit der DNA interagieren (s. Abbildung 1.5).

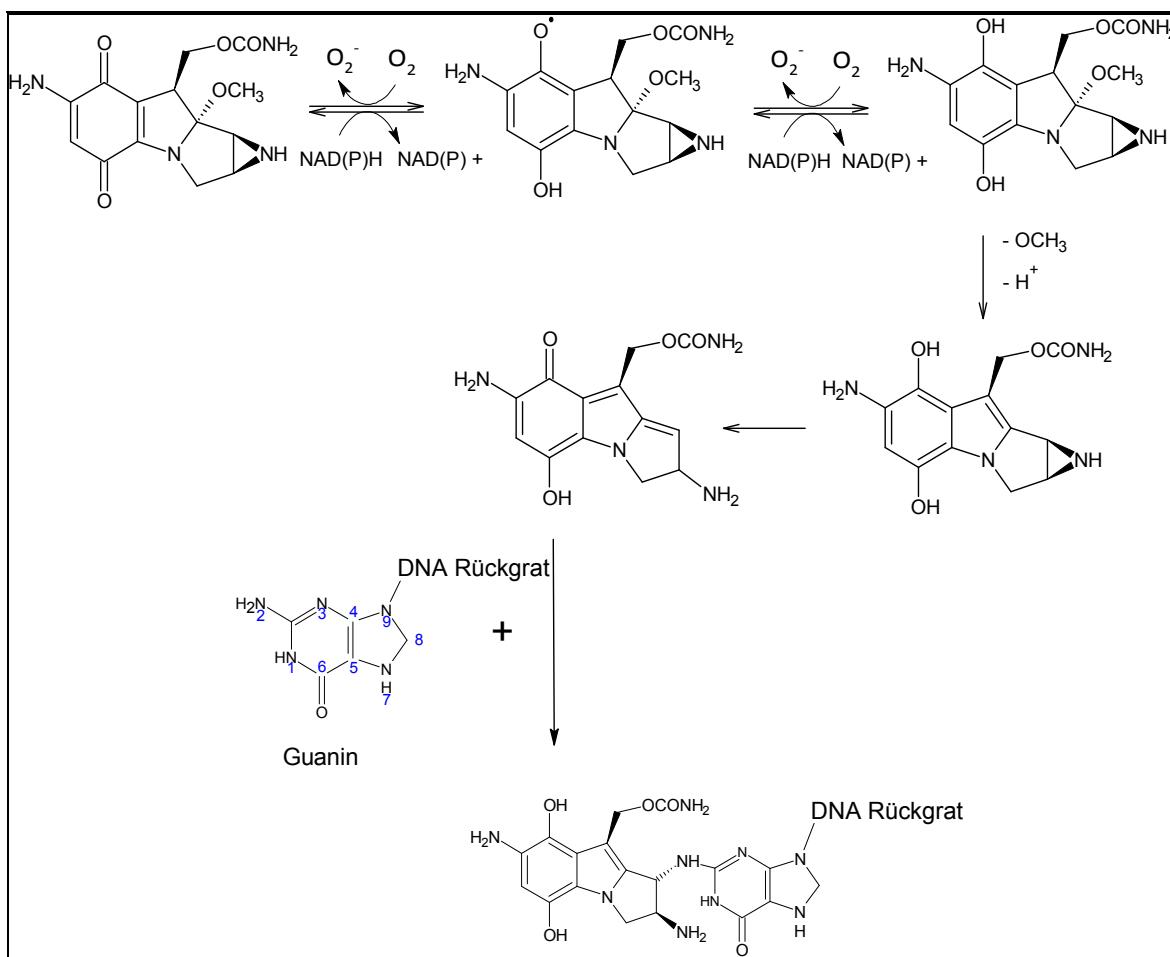


Abbildung 1.5: Enzymatische Aktivierung von Mitomycin-C Die Reduktion des Chinons leitet mehrere spontane Transformationen ein, welche mit der Öffnung des Aziridinrings enden. Das aktivierte Mitomycin-C reagiert dann weiter mit dem Guanin der DNA.

Der wesentliche Mechanismus ist dabei die Reduktion des Chinons zum Semichinon unter Abspaltung einer Methoxygruppe (Tomasz, 1995). Die Reduktion des Chinons geschieht mehrstufig über die reaktiven radikalischen Zwischenverbindungen des Semichinons und des Hydrochinons. Die Reduktion von Mitomycin-C wird dabei von unterschiedlichen Flavoenzymen wie z.B. NADPH-Reduktase katalysiert. Durch die Protonierung und Reduktion des Chinons entsteht ein reaktives, radikalisches Semichinon, welches in

Anwesenheit von Sauerstoff wieder zum Chinon oxidiert werden kann, wobei Superoxidanion entsteht (s. Abbildung 1.5). Das Superoxidanion dismutiert anschließend zu H_2O_2 , welches wiederum in der Lage ist Hydroxylradikale zu bilden (Komiyama et al., 1982). Diese reaktiven Sauerstoffspezies können intrazelluläre Makromoleküle wie z.B. Lipide, Proteine oder DNA schädigen und oxidativen Stress in der Zelle hervorrufen (Sies, 1997; Wang et al., 2010). Mitomycin-C besitzt also eine wichtige Funktion als sogenannter „Redox Cycler“ und bildet während der metabolischen Aktivierung, neben seiner Funktion als Alkylanz auch reaktive Sauerstoffspezies.

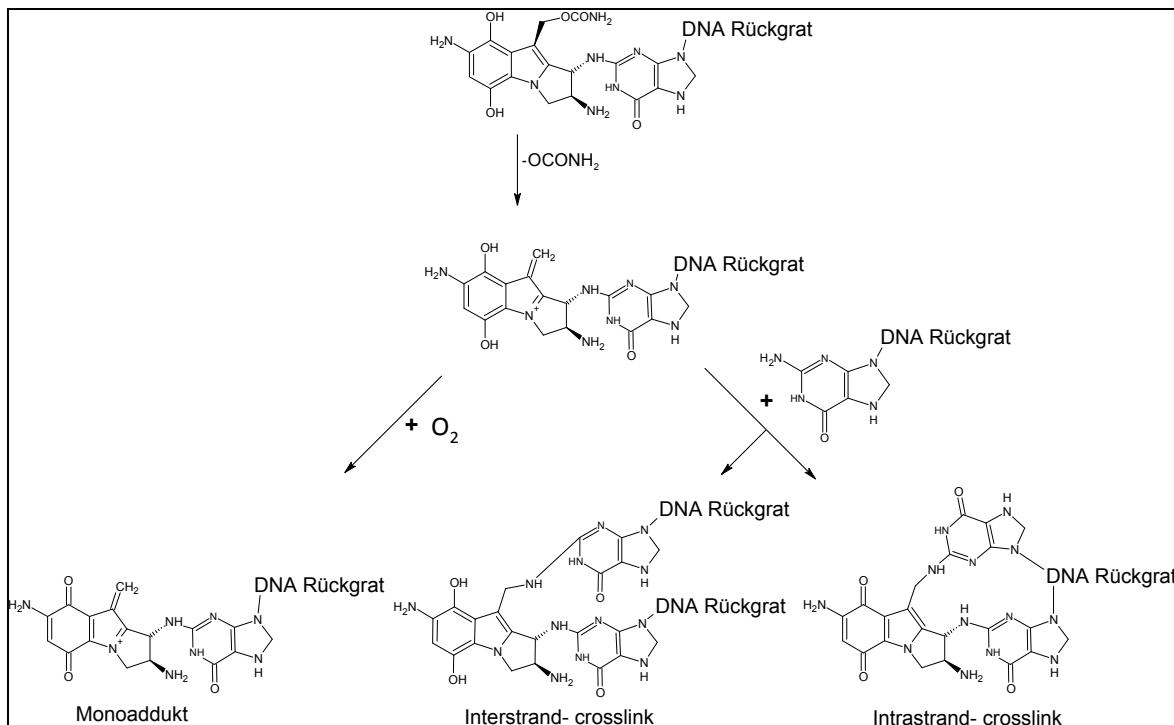


Abbildung 1.6: Quervernetzung der DNA durch Mitomycin-C Nach der metabolischen Aktivierung entstehen überwiegend drei Addukte. Durch die Aktivierung einer Alkylgruppe entsteht das Monoaddukt. Durch eine bifunktionelle Aktivierung beider Alkylgruppen kann es zu Interstrand- und Intrastrand-crosslinks kommen.

Durch die enzymatische Reduktion kommt es zu einer Öffnung des Aziridin-Rings, wodurch das Semichinon seine hohe Reaktivität erfährt und bevorzugt mit der N²-Aminogruppe des Guanins der DNA reagiert (s. Abbildung 1.6). Dadurch werden die DNA-Stränge kovalent miteinander verknüpft und es entstehen entweder Guanin-N²-Monoaddukte oder DNA-Quervernetzungen (DNA-crosslinks). Bei den DNA-crosslinks kann es sich sowohl um interstrand- als auch um intrastrand-crosslinks handeln (Kumar et al., 1992). Durch die Verknüpfung der DNA-Stränge ist eine Dissoziation, wie sie zur Replikation und Transkription nötig wäre, nicht mehr möglich, sodass die Zelle nach diesem DNA-Schaden verschiedene Signalkaskaden aktiviert und entweder einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase oder Apoptose induziert (Lee et al., 2006).

Die durch Mitomycin-C induzierten DNA-crosslinks gehören zu den DNA-Schädigungen, die hoch toxisch für Organismen sind. In reparaturdefizienten Bakterien konnte bereits eine einzige Strangverknüpfung den Zelltod auslösen (Magana-Schwencke et al., 1982). Die Reparatur von DNA-crosslinks ist bisher noch nicht hinreichend untersucht. Sicher ist, dass verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel Nukleotid-Exzisions-Reparatur oder Homologe-Rekombinationsreparatur gleichzeitig an der Reparatur beteiligt sind (Lee et al., 2006).

1.6 Zielstellung

Hautalterung ist ein fortlaufender Prozess, der letztendlich in einem veränderten Erscheinungsbild und funktionellen Veränderungen der Haut mündet. Die molekularen Mechanismen der Hautalterung sind komplex und werden von intrinsischen und extrinsischen Faktoren bestimmt.

Als Folge einer genetischen Determinierung vollzieht sich der Prozess der intrinsischen Hautalterung mit steigendem Lebensalter und läuft für das gesamte Organ gleichmäßig ab (Farage et al., 2008). Neben der genetischen Determinierung werden verschiedene exogene Ursachen und Mechanismen diskutiert (s. Kapitel 1.3). UV-Licht ist bspw. in der Lage reaktive Sauerstoffspezies, DNA-Strangbrüche oder DNA-Verknüpfungen zu induzieren. Neben dem UV-Licht bilden alkylierende Substanzen eines der häufigsten Umweltgifte in unserer Umgebung, welche häufig durch Sekundärreaktionen der DNA mit Metaboliten oder anderen Toxinen, wie z.B. Zigarettenrauch ausgelöst werden. *In vivo* wird die vorzeitige Hautalterung bei Rauchern z.B. dem alkylierenden DNA-Schaden durch Zigarettenrauch zugeschrieben (Tubbs et al., 2009).

Neben der Faltenbildung erscheint gealterte Haut dünner und schlaffer als junge Haut, ist leichter verwundbar, trocknet schneller aus und erscheint rauer in ihrer Struktur (Yaar, 2006). Zusätzlich zu diesen makroskopischen Alterserscheinungen sind verschiedene molekulare und biochemische Veränderungen beschrieben wie z.B. eine reduzierte DNA-Reparatur, eine gesteigerte Aktivität matrixabbauender Enzyme, der Anstieg an oxidativen Schäden und ein verminderter Stoffaustausch. Eine mögliche Folge sind alterstypischen Hauterkrankungen wie z.B. Keratosen, Elastosen, Dermatitis oder Xerosen (Kosmadaki & Gilchrest). Des Weiteren steigt bei *in vivo* gealterter Haut sowohl die Anzahl, als auch die Größe gutartiger Tumore und die Inzidenz für Hautkrebs verdreifacht sich innerhalb von 20 Jahren (Waldmann et al., 2012). Chronische Erkrankungen und Schäden der alternden Haut, aber auch steigende kosmetische Ansprüche stellen eine Hausforderung für Dermatologen dar.

Durch die Entwicklung eines Altershautmodells könnten die grundlegenden biologischen Funktionen der *in vivo* gealterten Haut besser verstanden werden. Bisherige Hautmodelle werden aus jungen, mitotischen Fibroblasten hergestellt, da alte Fibroblasten sich jedoch wesentlich in ihrer Stoffwechselaktivität und Zellantwort von jungen, mitotischen Fibroblasten unterscheiden, ist es sinnvoll, ein Hautmodell aufzubauen, welches die *in vivo*-Situation der gealterten Haut simuliert. Die molekularen Mechanismen, die zu alterstypischen Hauterkrankungen oder Krebs führen, können besser untersucht und gezielt therapiert werden. Für die Kosmetikindustrie ist es interessant zu untersuchen, inwiefern gealterte Haut anders auf kosmetische Wirkstoffe reagiert als junge Haut. Des Weiteren wäre die gezielte Entwicklung von kosmetischen Formulierungen möglich, welche speziell auf die Bedürfnisse der gealterten Haut eingehen.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung und Charakterisierung einer beschleunigten und dauerhaften Seneszenz in Hautfibroblasten zur Simulation der „Hautalterung im Zeitraffer“ *in vitro*. Darauf aufbauend sollte ein dreidimensionales *in vitro* Hautalterungsmodell entwickelt und charakterisiert werden, welches charakteristische Merkmale *in vivo* gealterter Haut besitzt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Adenin	Sigma, Taufkirchen
Apocynin	Calbiochem, Darmstadt
APS	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Ascorbylphosphat	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Choleratoxin	Sigma, Taufkirchen
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Darmstadt
Cytoseal Eideckmedium	Thermo Scientific, Waltham
DAPI	Sigma, Taufkirchen
DMSO	Roth, Karlsruhe
DTT	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Invitrogen, Kalifornien
EGF	Sigma, Taufkirchen
Entwicklerkonzentrat	Merck, Darmstadt
Eosin	Thermo Scientific, Waltham
Essigsäure (Eisessig)	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Fetal clone II	Sigma, Taufkirchen
FCS	GE Healthcare, Piscataway
Fixierkonzentrat	Merck, Darmstadt
Flouromount C	Southern Biotech, Eching
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Sigma, Taufkirchen
H ₂ -DCF-DA	Sigma, Taufkirchen
Hämatoxylin	Thermo Scientific, Waltham
HCl	Merck, Darmstadt
Hydrocortison	Sigma, Taufkirchen
Insulin	Sigma, Taufkirchen

Kaliumferrozyanid	MP Bio, Eschwege
Kaliumferrizyanid	MP Bio, Eschwege
KCl	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Sigma, Taufkirchen
Kollagenase 1	Biochrom, Berlin
Mitomycin-C	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
MgCl ₂	Invitrogen, Kalifornien
MTT (98%) (TCL)	Sigma, Taufkirchen
NaCl	Aldi-Süd, Düsseldorf
NaOH	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Sigma, Taufkirchen
N,N-Dimethylformamid	Sigma, Taufkirchen
PCR-Primer	Invitrogen, Kalifornien
Penicillin	Invitrogen, Kalifornien
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Proteinstandard	Fermentas, St. Leon-Rot
Retinsäure	Sigma, Taufkirchen
Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe
SDS (ultra pure)	Roth, Karlsruhe
Streptomycin	Invitrogen, Kalifornien
Stripping buffer	Thermo Scienfitic, Waltham
Super Signal West Pico	Pierce, Rockford
Super Signal West Femto	Pierce, Rockford
TEMED (p. A. 99%)	Roth, Karlsruhe
Thermolysin	Sigma, Taufkirchen
Tissue Freezing Medium	Roth, Karlsruhe
Triiodothyronin	Sigma, Taufkirchen
TRIS-Pufferan 99,9%	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Invitrogen, Kalifornien
TrypLEexpress	Invitrogen, Kalifornien
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid (30%) stab.	Riedel-de Häen, Seelze
X-Gal	Invitrogen, Kalifornien
Ziegennormalserum	Sigma, Taufkirchen

2.1.2 Zellmaterial

Humane dermale Fibroblasten und Keratinozyten

Die humanen dermalen Fibroblasten (HDF) und Keratinozyten wurden aus Präputien gesunder 2-5-Jähriger Jungen durch Zirkumzisionen gewonnen. Die Biopsien zur Isolation der Zellen wurden unter den geltenden ethischen Regeln und mit Einverständnis der Patienten entnommen.

Als Kontrollen für junge Fibroblasten (ct) dienten subkonfluente mitotische Fibroblasten bis zur 15. Passage, welches einer kumulativen Zellverdopplung (CPD) < 40 entsprach und im exponentiellen Bereich der Wachstumskurve lag. Fibroblasten des gleichen Donors wurden mit einer CPD > 55 verwendet und als replikativ gealtert angesehen, da diese Fibroblasten bereits in der Plateauphase der Wachstumskurve waren und mit einer Verdopplungszeit von 0,005/Woche ihr proliferatives Potential erschöpft hatten.

Mitotische Fibroblasten mit einer CPD < 40 wurden durch zweimalige Behandlung mit Mitomycin-C zu „**drug-induced accelerated senescent**“-Fibroblasten (DIAS-Fibroblasten). Die Behandlung erfolgte mit einer Konzentration von 200 nM für 24 Stunden gefolgt von einer 24-stündigen Erholungsphase in FB-Medium, nach der sich eine erneute Behandlung mit 200 nM Mitomycin-C für 24 Stunden anschloss. Nach der Behandlung folgte eine fünftägige Postinkubation.

Die Keratinozyten wurden für den Aufbau eines Hautmodells maximal bis zur vierten Passage verwendet und auf Feederzellen kultiviert (s. Kapitel 2.2.19).

2.1.3 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer 1	0,3 M Tris (pH 6,8) 10% (v/v) Methanol pH 10,4
Anodenpuffer 2	25 mM Tris (pH 6,8) 10% (v/v) Methanol pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris (pH 6,8) 40 mM Glycin 10% (v/v) Methanol pH 9,4
SDS-Laupuffer (10x)	10 g SDS 30,3 g Tris (pH 6,8) 144,1 g Glycin ad 1 l dH ₂ O
TBS-T (10x)	50 mM Tris (pH 6,8) 150 mM NaCl 0,1% Tween pH 7,5
SDS-Probenpuffer (4x) (Laemmli-Puffer)	40% Glycerin 20% β-Mercaptoethanol 12% SDS 0,4% Bromphenolblau
Blockierlösung für Westernblot	5% Milchpulver in TBS-T 5% BSA in TBS-T
Blockierlösung für Immunfluoreszenz	10% Ziegennormalserum in PBS
Coomassie Blue Färbelösung	0,05% Coomassie Brilliant Blue 20% Methanol 10% Essigsäure
MTT-Stocklösung (10x)	5 mg/ml in PBS ++

PBS ++	0,9 mM CaCl ₂ 0,5 mM MgCl ₂ 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 138 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄
PBS	2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 138 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄
Ponceau S Lösung	0,1% Ponceau S (w/v) 5% (v/v) Essigsäure
SDS-Lysepuffer	1% SDS Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 (Verd. 1/1000)
Thermolysin	0,01 M HEPES-Puffer 2,5 mg/ml KCl 2,9 mg/ml NaCl 0,7 mg/ml CaCl ₂

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnr.
Polyclonal rabbit anti elastin	Novotec labs, Lyon	250111
Monoclonal mouse anti human filaggrin	Tebu Bio, Paris	GTX23137
Monoclonal mouse anti human Ki67	DAKO, Dänemark	M7240
Polyclonal rabbit anti phosphor-p53 (Ser15)	Cellsignaling, Frankfurt	9284
Monoclonal mouse anti GAPDH	Sigma, Taufkirchen	G8795

2.1.4.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnr.
AlexaFluor 568 goat anti rabbit	Invitrogen, Kalifornien	A11011
AlexaFluor 488 rabbit anti mouse	Invitrogen, Kalifornien	A11059
FITC rabbit anti mouse	DAKO, Dänemark	F0261
Goat anti rabbit HRP	Dianova, Hamburg	

2.1.5 Primer

Transkript	Primer-Name	Primer (5'-3')	Annealing-Temperatur	Hersteller
Kollagen 1A1	Col1A1	Hs01076777_m1	50°C	Applied Biosystems
Kollagen 3A1	Col3A1	Hs00164103_m1	50°C	Applied Biosystems
18S rRNA	18S	Hs039289901_g1	60°C	Applied Biosystems

2.1.6 Zellkulturmedien

Einfriermedium	DMEM mit Glutamax 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10% DMSO
Leermedium	DMEM mit Glutamax 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Fibroblastenmedium (FB-Medium)	DMEM mit Glutamax 10% Fetales Kälberserum 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Keratinozytenmedium (Kera-Medium)	DMEM mit Glutamax/ Ham's F12 (3:1) 10% Fetal clone II 10^{-10} M Choleratoxin 24,3 µg/ml Adenin 0,4 µg/ml Hydrocortison 10 ng/ml EGF 0,12 IU/ml Insulin $2 \cdot 10^{-9}$ Triiodothyronin 1 mM Ascorbylphosphat 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
ALI-Medium	DMEM mit Glutamax/ Ham's F12 (3:1) 1,6 mg/ml Albumin (BSA) 0,4 µg/ml Hydrocortison 0,12 IU/ml Insulin 100 IU/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

2.1.7 Geräte

iCycler iQ (PCR Detection System)	Biorad, Kalifornien
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Plate Reader Spectramac Plus	Molecular Devices, Kalifornien
Fluoreszenzmikroskop BX51	Olympus, Tokio
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Inkubator	Binder, Tuttlingen
Sterilbank	Thermo Scienfitic, Waltham
Mikrotom RM2145	Leica, Wetzlar
Tissue Embedding Center EG1140H	Leica, Wetzlar
Cryostat CM1900	Leica, Wetzlar
Histo Tek Slide Stainer	Miles Scientific, Princeton
Entwässerungsautomat	Miles Scientific, Princeton
Plate Reader Genios Pro	Tecan, Männedorf
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Elektrophoresekammer	BioRad, München
Gelkammer Novex Mini Cell	Invitrogen, Kalifornien
Heizblock	Peqlab, Erlangen
Magnetrührer	Janke&Kunkel, Staufen
Milli-Q-Anlage	Millipore, Eschborn
Nanodrop	PeqLab, Wilmington
Neubauer-Zählkammer	Brand, Göttingen
pH-Meter	Hanna Instruments, Kehl
Powersupplie Power Pac Basic	BioRad, München
Rollschüttler RM5	Braun, Melsungen
Schüttler	Janke&Kunkel, Staufen
Tischzentrifuge	Roth, Karlsruhe
Vortexer	Janke&Kunkel, Staufen
Wasserbad	Köttermann, Düsseldorf
Zentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg

2.1.8 Labor-Software

Total Lab 100 (lifescience analysis)

iCycler optical System Software

CellF Imaging Software (Olympus)

XFluor4 Software (Tecan)

Prism Graph Pad

Image J

2.1.9 Kits

MycoAlert Mycoplasma Detection Kit	Lonza, Rockland
Fluoreokine Enzyme Activity Assay MMP1	R&D Systems, Minneapolis
Quantikine ELISA Human Pro-MMP1	R&D Systems, Minneapolis
P1NP Elecsys Test	Roche, Penzberg
BrdU Cell Proliferation Assay	Merck, Darmstadt
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Cyquant NF	Initrogen, Kalifornien

2.1.10 Verbrauchsmaterial

Einmal-Küvetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmal-Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gelkassetten	Invitrogen, Kalifornien
Kryomold Einbettkassetten	Sakura, Tokio
Kryotubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen
SuperFrostPlus Objektträger	Thermo Scientific, Waltham
Deckgläschchen	Thermo Scientific, Waltham
PDVF-Membran	GE Healthcare, Freiburg
High performance chemiluminescence film	GE Healthcare, Freiburg
Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Skalpelle	Braun, Melsungen
Whatman-Papier	Roth, Karlsruhe
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb	Thermo Scientific, Waltham

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von primären Zellen aus Biopsien

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von primären Fibroblasten und Keratinozyten wurden Präputium-Biopsien bis zu einem Alter von fünf Jahren verwendet. Unmittelbar nach der Entnahme der Biopsie wurde das Material in DMEM mit Penicillin und Streptomycin überführt. Die Weiterverarbeitung sollte möglichst am Tag der Entnahme erfolgen, die Lagerung bei 4°C erlaubt jedoch eine Aufarbeitung bis zu vier Tage nach der Entnahme. Zunächst wurde mit einem Skalpell und Pinzetten das sichtbare Fettgewebe entfernt und die Biopsie anschließend in eine sterile Kulturschale überführt. Mit einem Skalpell wurde die Haut in kleine Stücke zerteilt und mit der Epidermis nach oben in eine neue Zellkulturschale mit Thermolysin gelegt, in der sie über Nacht bei 4°C für 15-18 Stunden inkubiert wurden. Nach dieser Behandlung konnte die Epidermis mit einer Pinzette von der Dermis abgelöst werden.

Die Epidermis wurde anschließend bei 37°C in Trypsin inkubiert und die Reaktion nach 20 Minuten durch Zugabe von Kera-Medium gestoppt. Die Suspension wurde durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben, anschließend zentrifugiert (2000 rpm, 10 Minuten) und das Pellet in Kera-Medium aufgenommen. Die gesamten Keratinozyten wurden anschließend auf eine mit Feederlayern besetzte 175cm²-Zellkulturflasche ausgesät und am nächsten Tag der erste Mediumwechsel durchgeführt. Die Konfluenz der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert und sollte nach gut einer Woche 80% betragen. Wenn die Keratinozyten diesen Konzfluenzgrad erreicht hatten, wurden sie durch Trypsin von der Zellkulturflasche abgelöst. Dazu wurde das unterschiedliche Ablöseverhalten der Feederzellen (3 Minuten) und der Keratinozyten (8 Minuten) ausgenutzt. Nach 3 Minuten wurden die abgelösten Feederzellen abgesaugt und frisches Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 5 Minuten lösten sich die Keratinozyten ab und wurden mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen/ml als P0 in Einfriermedium in flüssigem Stickstoff tiefgefroren (s. Kapitel 2.2.3).

Nachdem die Dermis von dem sichtbaren Fettgewebe befreit wurde, folgte der Kollagenaseverdau in einem Zentrifugenrörchen mit Kollagenase (10 000 U/ml in Leermedium) für 3-4 Stunden schüttelnd bei 37°C. Die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben, zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten), mit PBS gewaschen, das Pellet in FB-Medium aufgenommen und in eine 175cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag und danach zweimal pro Woche. Die Zellen wurden mikroskopisch auf Kontaminationen und Konfluenz überprüft und bei einer Zelldichte von 80% passagiert oder eingefroren (s. Kapitel 2.2.2 und 2.2.3).

2.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Fibroblasten und Keratinozyten wurden in 175cm²-Zellkulturflaschen in einer wasser dampfgesättigten, auf 37°C temperierten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid kultiviert. Für die Versuche wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90% verwendet und in Zellkulturschalen oder Zellkulturplatten verschiedener Formate ausgesät. Dafür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe einer Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Reaktion des Trypsins wurde nach 5-10 Minuten durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt und die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in dem jeweiligen Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die benötigte Anzahl an Zellen wurde daraufhin in das entsprechende Zellkulturgefäß überführt und die Proliferation mit Hilfe der kumulativen Populationsdichte kontrolliert.

$$PD = \frac{\ln(\text{geerntete Zellzahl}) - \ln(\text{ausgesäte Zellzahl})}{\ln(2)}$$

$$CPD = \sum PD$$

2.2.3 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Die Fibroblasten wurden bis zur Subkonfluenz in 175cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium wurde die Reaktion des Trypsins gestoppt und die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und die Zellen mit einer Dichte von 3*10⁶ in Kryotubes bei -80°C eingefroren und nach 3 Tagen in flüssigen Stickstoff überführt. Dort können die Zellen über mehrere Jahre gelagert werden. Zur Revitalisierung wurden die Zellen in serumhaltiges Medium überführt und mit einer Zellzahl von 1*10⁶ pro 175cm²-Flasche ausgesät. Die Zellen wurden mindestens einmal passagiert, bevor sie für die Experimente verwendet wurden.

2.2.4 Mycoplasmentest

Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht, da diese das Zellwachstum und die Reaktion von Zellen beeinflussen können. Bei Mykoplasmen handelt es sich um kleine, zellwandlose, von einer Zytoplasmamembran umgebene Bakterien, welche parasitär Zellen befallen und lichtmikroskopisch nicht detektierbar sind. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des *MycoAlert Detection Kits* (Lonza)

nach den Herstellerangaben. Dieser selektive biochemische Test nutzt die Aktivität bestimmter myoplasmatischer Enzyme aus. Das MycoAlert-Substrat reagiert mit den Enzymen und katalysiert die Umwandlung von Adenosindiphosphat (ADP) zu Adenosintriphosphat (ATP). Die ATP-Konzentration wurde sowohl vor als auch nach der Zugabe von MycoAlert mittels einer Biolumineszenz-Messung überprüft.

Für die Messung wurden 2 ml einer Zellsuspension zentrifugiert und 100 µl des Überstands in eine 96Well-Lumineszenzplatte pipettiert. Nach der Zugabe von 100 µl MycoAlert-Reagenz folgte eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur in der die Mycoplasmen lysiert wurden. Anschließend folgte die erste Lumineszenzmessung bei 565 nm. Danach wurden 100 µl MycoAlert-Substrat zu der Probe gegeben und für 10 Minuten inkubiert, bevor erneut die Lumineszenz gemessen wurde. Die untersuchte Probe ist frei von Mykoplasmen, wenn die zweite Messung im Bereich der ersten Messung liegt. Steigt die Lumineszenz bei der zweiten Messung jedoch an, ist dies ein Indikator für eine Kontamination mit Mykoplasmen, da die myoplasmatischen Enzyme das Substrat umgesetzt haben.

2.2.5 Herstellung von Zelllysaten

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen in 3,5cm²-Zellkulturschalen kultiviert und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse mit einem Zellscharber in Lysepuffer (1% SDS, Phosphataseinhibitor-Cocktail). Die Lysate wurden bei -20°C bis zur Verwendung tiefgefroren.

2.2.6 Herstellung von Medienüberständen

Für die Analyse sezernierter, löslicher Proteine wie z.B. MMP-1 oder P1NP wurden Medienüberstände abgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C tiefgefroren. Die Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^4$ Zellen in 3,5cm²-Zellkulturschalen ausgesät und nach 3 Tagen das serumhaltige Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml serumfreies Leermedium auf die Zellen gegeben. Nach 48 Stunden wurden die Überstände bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren. Nachdem die Überstände abgenommen wurden, folgte das Ablösen der Zellen mit einer Trypsin-EDTA-Lösung und die anschließende Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer. Die gemessenen Konzentrationen an MMP-1 oder P1NP konnten somit auf die jeweilige Zellzahl normiert werden.

Für die Überstände der Hautmodelle wurde das ALI-Medium nach 48 Stunden abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren, da eine Kultivierung in serumfreiem Medium bei dem Ganzhautmodell nicht möglich war.

2.2.7 Vitalitätstest

Der MTT-Test dient dazu, die Vitalität von Zellen in der Zellkultur zu bestimmen. Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem blauen, unlöslichen Formazan. Diese Reaktion kann photometrisch bestimmt werden und läuft nur in metabolisch aktiven Zellen mit intakten Mitochondrien ab, sodass sie als Indikator für die Vitalität der Zellen gesehen werden kann (Green et al., 1984).

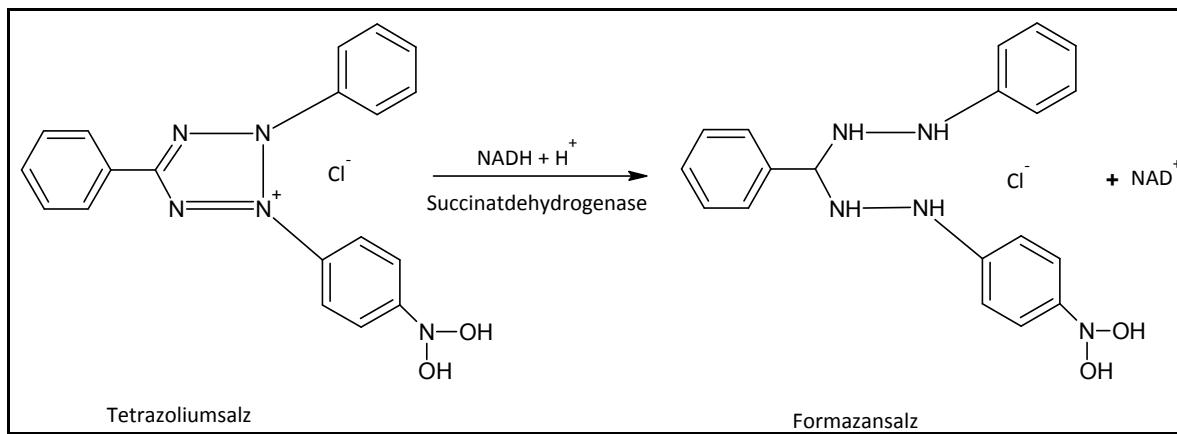


Abbildung 2.1: Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT zum Formazansalz Durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase wird MTT zu dem blauen Formazansalz reduziert.

Für den MTT-Test wurden die Fibroblasten fünf Tage nach der Behandlung mit Mitomycin-C in 96well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in FB-Medium mit 10% MTT für 3 Stunden im Brutschrank behandelt. Anschließend wurde das MTT-haltige Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und in DMSO solubilisiert. Das in DMSO gelöste Formazan wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm quantifiziert und die Vitalität der Zellen prozentual bestimmt.

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Ex (behandelte Zellen)}}{\text{Ex (unbehandelte Zellen)}} * 100$$

2.2.8 Proliferationstest (BrdU)

Mit Hilfe des BrdU-Enzymimmunoassays kann die Proliferationsrate von Zellen quantifiziert werden. Bei dieser Methode wird Thymidin durch das Thymidinanalogen Bromodesoxyuridin (BrdU) ersetzt und in die neu synthetisierte DNA proliferierender Zellen eingebaut. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen BrdU kann auf diese Weise quantitativ die Zellproliferation dargestellt werden.

Für die Durchführung wurde das *BrdU Cell Proliferation*-Kit verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 100 µl mit $1 \cdot 10^4$ Zellen in 96well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden 20 µl BrdU-Label dazu gegeben und für 12 Stunden im Brutschrank inkubiert. Der Inhalt der Platten wurde entfernt, indem die Platten vorsichtig auf ein Papiertuch geklopft wurden und 200 µl Fixative/Denaturing Solution in jedes Well gegeben wurden. Die Platten inkubierten anschließend für 30 Minuten bei RT und danach wurde der Inhalt erneut auf Papiertüchern entleert. Anschließend wurden 100 µl des Anti-BrdU Antikörpers auf die Zellen gegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschritt mit PBS und anschließender Inkubation mit 100 µl des Peroxidase Goat Anti-Mouse IgG's für 30 Minuten bei RT. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen, vollständig mit dH₂O geflutet und auf Papiertüchern ausgeklopft. Zum Schluss wurde in jedes Well 100 µl Substrat pipettiert und im Dunkeln für 15 Minuten bei RT inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden 100 µl Stopp-Lösung zugefügt und die Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.2.9 Nachweis intrazellulärer ROS

Mit Hilfe des Farbstoffs 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) können intrazelluläre reaktive Sauerstoffspezies (ROS) nachgewiesen werden. Esterasen in der Zelle spalten das Diacetat, sodass der Farbstoff membranundurchlässig wird und in der Zelle bleibt. Das H₂DCF wird dann in der Zelle durch ROS zu DCF oxidiert, welches bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 520 nm detektiert werden kann.

Für die fluorometrische Messung mit einem Mikrotiterplattenlesegerät wurden die Zellen in 96well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit einer 100 µM H₂DCF-DA-Lösung für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert wurden. Anschließend wurde die H₂DCF-DA-Lösung abgesaugt, die Zellen nochmal mit PBS gewaschen und direkt im Anschluss die Fluoreszenz gemessen. Dazu wurden die Zellen mit 100 µl PBS++ überschichtet und im vorgewärmten Mikrotiterplattenlesegerät alle 10 Minuten für insgesamt 1,5 Stunden die Fluoreszenz bei den oben angegebenen Wellenlängen detektiert. Für die Bestimmung der ROS-Konzentration der isolierten Fibroblasten aus dem Hautmodell mussten die Zellen für weitere 4 Tage nach der Isolierung kultiviert werden, um den Stress durch den Kollagenaseverdau zu kompensieren. Aufgrund der Tatsache, dass die unbehandelten Zellen in dieser Zeit noch weiter proliferierten, sodass die Zellzahl zwischen unbehandelten und MMC-behandelten Zellen unterschiedlich war, wurde mit Hilfe des *CyQuant NF-Assays* (Invitrogen) die genaue Zellzahl in jedem Well bestimmt. Anschließend konnte die ROS-Konzentration auf die Zellzahl normiert werden.

2.2.10 CyQuant-Assay zur Bestimmung der Zellzahl

Mit Hilfe des *CyQuant NF*-Assays (Invitrogen) ist es möglich, die exakte Zellzahl in 96well-Platten zu bestimmen. Der *CyQuant NF*-Assay beruht auf der Messung der Gesamt-DNA mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes, welcher an die DNA bindet. Der DNA-Farbstoff ist zelldurchlässig, sodass die Zellen nicht lysiert werden müssen. Zunächst wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS++ gewaschen und der DNA-Farbstoff 1:500 mit HBSS verdünnt. Anschließend wurden 50 µL des Farbstoffs auf die Zellen gegeben und für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz mit dem Mikrotiterplattenlesegerät *Tecan* bei einer Extinktion von 485 nm und einer Emission von 530 nm detektiert. Anhand einer Standardkurve mit verschiedenen Zellzahlen konnte die genaue Zellzahl der Proben berechnet werden.

2.2.11 SA- β -Galaktosidase-Färbung

Die Färbung der SA- β -Galaktosidase beruht auf der Beobachtung, dass senescente Fibroblasten durch eine erhöhte Aktivität der lysosomalen β -Galaktosidase bei pH6 vermehrt Substrat umsetzen (Dimri et al., 1995). Mit Hilfe von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galaktosid (XGal) kann die Aktivität des Enzyms als blauer Niederschlag nachgewiesen werden.

Die Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Kammer in 4well-Chamberslides (Nunc) ausgesät. Nach 3 Tagen wurde das Kulturmedium ausgetauscht und 21 Tage nach der Aussaat die Aktivität der β -Galaktosidase durch die Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen für 5 Minuten mit 4% Formaldehyd fixiert, mit PBS++ gewaschen und anschließend mit der XGal-Substratlösung überschichtet. Für die Substratlösung wurden 20 mg/ml XGal in Dimethylformamid (DMF) gelöst und 1:20 verdünnt. Die Verdünnung erfolgte in Zitronensäurephosphatpuffer, welcher auf pH 4 und auf pH 6 eingestellt wurde.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Zitronensäurephosphatpuffers

Inhaltsstoffe des Zitronensäurephosphatpuffers	Konzentration
Zitronensäuremonohydrat	0,1 M
Di-Natriumhydrogenphosphat	0,2 M
X-Gal in DMF (20 mg/ml)	1:20

Supplementiert wurde die Substratlösung mit Kaliumferrozyanit (50 mM), Kaliumferrizyanit (50 mM), Natriumchlorid (150 mM) und Magnesiumchlorid (2 mM). Die Fibroblasten wurden mit der Färbelösung überschichtet und anschließend für 24 Stunden bei 37°C ohne CO₂-Begasung inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgesaugt, die Zellen mit PBS++ gewaschen, mit *Cytoseal* (Thermo Scientific) eingedeckt und die Aktivität der β-Galaktosidase mikroskopisch als blauer Niederschlag beurteilt. Die Färbung bei pH 4 diente als Positivkontrolle.

2.2.12 Bestimmung der Zellgröße

Die Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Kammer in *4well-Chamberslides* (Nunc) ausgesät. Nach 3 Tagen wurde das Kulturmedium ausgetauscht und 7 Tage nach der Aussaat eine Morphologiefärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 5 Minuten mit 4% Formaldehyd fixiert und anschließend mit *Coomassie Brilliant Blue* überschichtet. Nachdem die Fibroblasten mit PBS ++ gewaschen wurden, folgte das einbetten mit *Cytoseal* (Thermo Scientific) und die mikroskopische Begutachtung. Für die Analyse der Zellgröße wurden von jedem unabhängigen Versuch jeweils drei Bildausschnitte pro Zelltyp ausgewertet, von denen jeweils die Größe von fünf Zellen exemplarisch mit Hilfe der Software *ImageJ* vermessen wurden.

2.2.13 Immunfluoreszenz

Mit Hilfe dieser Methode konnte Ki67 durch einen fluoreszierenden Sekundärantikörper in fixierten Zellen nachgewiesen werden. Anfang der achtziger Jahre generierten Gerdes et al. erstmals einen monoklonalen Antikörper, der gegen ein Antigen gerichtet war, welches als Ki-67 Antigen bezeichnet wurde. Erst einige Jahre später konnte dieses Antigen als Protein (pKi-67) identifiziert werden (Gerdes et al., 1991).

Auffällig war das charakteristische Färbeverhalten des Ki-67 Antikörpers, welches ausschließlich in Kernen proliferierender Zellen nachgewiesen werden konnte. Daher eignet sich das Ki-67-Antigen hervorragend als Marker, um die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen.

Die Fibroblasten wurden mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^4$ Zellen pro Kammer in *4well-Chamberslides* (Nunc) ausgesät. Nach 3 Tagen wurde das Medium ausgetauscht und der Nachweis von Ki67 mittels Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 10 Minuten in eiskaltem Aceton bei -20°C fixiert, luftgetrocknet und anschließend zur Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit 10%-igem Ziegenserum inklusive 0,01% Triton-X100 für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper (Monoclonal mouse anti human Ki67) in 10%-igem Ziegenserum 1:20 verdünnt und mit

den Zellen über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrifte für jeweils 10 Minuten in PBS, bevor der Sekundärantikörper inklusive DAPI (FITC rabbit anti mouse) 1:20 in Ziegenserum verdünnt und für eine Stunde bei RT auf die Zellen gegeben wurde. Nach drei weiteren Waschschriften von jeweils 10 Minuten in PBS wurden die Schnitte mit *Fluorescenc Mounting Medium* (DAKO) eingebettet und mikroskopisch ausgewertet.

2.2.14 ELISA für MMP-1

Die ELISA-Methode wurde zur Analyse der Konzentration an sezerniertem MMP-1 genutzt. Zum einen wurde der *Quantakine ELISA Human Pro-MMP1* (R&D) genutzt, um eine quantitative Aussage über die Konzentration an MMP-1 zu erhalten, zum anderen wurde die Aktivität der sezernierten MMP-1 mit Hilfe des *Fluorokine Enzyme Activity ELISA Human Active MMP1* (R&D) überprüft.

Zur Analyse der **Konzentration an Pro-MMP-1** wurden Mikrotiterplatten eingesetzt, die mit einem monoklonalen Antikörper vorbeschichtet waren, welcher spezifisch menschliches Pro-MMP-1 erkennt. Standards, Kontrollen und Proben (1:10 verdünnt) wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert, sodass das vorhandene Pro-MMP-1 an den immobilisierten Antikörper binden konnte. Nach 2 Stunden wurden nichtgebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt und ein HRP-gekoppelter monoklonaler Sekundärantikörper zugegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation und wiederholtem Waschen, wurde für 20 Minuten eine Substratlösung in die Mikrotiterplatten pipettiert. Bei der folgenden Enzymreaktion kam es zu einem blauen Farbumschlag, der durch die Zugabe der Stopp-Lösung abgebrochen wurde, sodass die Absorption bei 450 nm bestimmt werden konnte. Dabei war die Farbintensität proportional zu der Menge an gebundenem Pro-MMP-1 und die Konzentration der Proben konnte mit Hilfe der Standardkurve berechnet werden.

Zur Analyse der **Aktivität von MMP-1** wurden Mikrotiterplatten eingesetzt, die mit einem monoklonalen Antikörper vorbeschichtet waren, welcher spezifisch menschliches MMP-1 erkannte. 150 µl Standards, Kontrollen und Proben (Medienüberstände) wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatten pipettiert, sodass das vorhandene MMP-1 an den immobilisierten Antikörper binden konnte. Nach 3 Stunden wurden nichtgebundene Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt und das Aktivierungsreagenz (APMA) zugegeben. Durch die Zugabe von APMA wurde potentiell aktives MMP-1 in Folge einer Spaltung der Zink-Cystein-Verbindung aktiviert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37°C und wiederholtem Waschen wurde für 16 Stunden die fluorogene Substratlösung in die Mikrotiterplatten pipettiert, welche mit einem Quencher verbunden war. Aktiviertes MMP-1 löste die Peptidverbindung zwischen Quencher und Fluorophor, sodass ein

Fluoreszenzsignal frei wurde. Dieses Signal konnte mit einem Fluoreszenz-Mikrotiterplattenlesegerät bei einer Extinktion von 320 nm und einer Emission von 405 nm detektiert werden. Die Extinktion bzw. Emission mussten für die Messung angepasst werden, da die exakten Wellenlängen nicht zur Verfügung standen. Die Messung erfolgte bei einer von Extinktion 360 nm und einer Emission von 465 nm. Die Fluoreszenzintensität war proportional zu der Menge an aktivem MMP-1 und mit Hilfe der Standardkurve konnte die Konzentration berechnet werden.

2.2.15 P1NP-Analyse

Für die Analyse der Kollagensynthese wurden Medienüberstände der Hautmodelle und von den isolierten Fibroblasten aus den Hautmodellen verwendet. Die P1NP-Konzentrationsbestimmung wurde mit dem *P1NP Elecsys-Assay* (Roche) durch das biochemische Labor des Zentrums der Dermatologie und Venerologie am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. A. Bernd durchgeführt. Mit Hilfe der Elektrochemolumineszenz kann die P1NP-Konzentration in einem Bereich von 0,15-500 ng/ml bestimmt werden. Die Medienüberstände wurden in spezielle Probengefäße überführt und mit biotinyliertem und Ruthenium-gekoppelten anti-P1NP Antikörpern inkubiert. Beide Antikörper konnten an das in der Probe enthaltene P1NP binden und mit Streptavidin-gekoppelten Mikropartikeln komplexieren. Das Reaktionsgemisch mit dem Immunkomplex wurde in die Messzelle des Elecsys 1010 (vollautomatisches Random-Access Analysesystem, Roche) gesaugt, wo sich der Immunkomplex magnetisch an die Elektroden anlagerte. Nicht gebundene Immunkomplexe und Reagenzlösungen wurden durch mehrmaliges Waschen aus der Messzelle entfernt und Tripolyamin (TPA) zugefügt, welches ebenfalls an der Elektrode band. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wurde das TPA angeregt und es bildeten sich TPA-Radikale, welche den Ruthenium-Komplex oxidierten. Durch die Reduktion des Ruthenium-Kations wurde dieses in einen energiereichen instabilen Zustand überführt, welches durch Abgabe eines Licht-Photons der Wellenlänge 620 nm wieder in seinen stabilen Grundzustand zurück gelangte. Diese Chemolumineszenz wurde mit Hilfe eines Photomultipliers gemessen und die P1NP-Konzentration anhand einer Standardreihe bestimmt.

2.2.16 Zellzyklusanalyse

Die Analyse des Zellzyklus der Fibroblasten erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Propidiumiodid-Färbung. Propidiumiodid ist ein DNA-Farbstoff, welcher in die DNA interkaliert und dadurch sein Emissionsmaximum von 519 nm nach 617 nm verschiebt. Die gefärbten Zellen werden einzeln durch eine Kapillare gesogen und passieren einen

Laserstrahl dessen Licht in Abhängigkeit von der Zellbeschaffenheit unterschiedliche stark gestreut wird. Die Emission des fluoreszierenden Lichts wird detektiert und die Intensität gibt Auskunft über den DNA-Gehalt der Zelle und somit über den Zellzyklus.

Für die Analyse wurden die Zellen in 175cm²-Zellkulturflaschen kultiviert und mit einer Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden abgelöst. Die Zellsuspension wurde 1:1 mit FB-Medium gemischt um die Reaktion des Trypsins zu stoppen und zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten). Nach dem Zentrifugieren wurde das Zellpellet zunächst zweimal mit PBS gewaschen (2 ml) und anschließend unter ständigem Verwirbeln eiskaltes Methanol zugetropft (1ml). Die fixierten Zellen konnten nun über mehrere Wochen im Kühlschrank gelagert werden. Nach der Fixierung wurden die Zellen zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten), der Überstand verworfen, mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend mit 350 µl RNase (50 µg/ml) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach dem RNase-Verdau wurden 20 µl Propidiumiodid dazu gegeben und nach 5 Minuten mit Hilfe der Durchflusszytometrie vermessen. Im Durchflusszytometer (Epics XL-MCL) wurde von jeder Zelle die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichts gemessen und dadurch der DNA-Gehalt pro Zelle bestimmt. Pro Ansatz wurden 10 000 Zellen vermessen und die Messwerte anschließend mit Hilfe der Software Expo32 MultiCOMP ausgewertet.

2.2.17 Immunologischer Nachweis von Proteinen

2.2.17.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinbestimmung erfolgte gegen eine BSA-Standardkurve auf Basis der Methode nach Lowry unter Einsatz kommerziell erhältlicher Lösungen (BioRad DC) nach Herstellerangaben. Reagenz A' wurde hergestellt, indem 1 ml Reagenz A mit 20 µl Reagenz S gemischt wurden. 20 µl Probe wurden in eine Standardküvette vorgelegt, 100 µl Reagenz A' und 750 µl Reagenz B dazu pipettiert. Diese Mischung wurde für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert und die optische Dichte photometrisch bei 750 nm gemessen. Auf Basis der Daten der BSA-Standardkurve wurde durch lineare Regression der Proteingehalt der Proben berechnet.

2.2.17.2 SDS-PAGE

Proteine wandern bei der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfat polyacrylamid gel electrophoresis*) in einem elektrischen Feld durch ein dreidimensionales Netzwerk aus Acrylamid/ Bis-Acrylamid und werden nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Bei der von U. K. Laemmli entwickelten Methode werden durch β-Mercaptoethanol die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen und durch das anionische Natriumdodecylsulfat (SDS) die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst. Außerdem lagert sich das SDS an die Proteine an (ca. 1,4 µg SDS/ µg Protein) und überdeckt dadurch deren Eigenladung.

In Folge dessen bilden sich Micellen mit konstant negativer Ladung, die proportional zur Masseneinheit ist. Das Polyacrylamidgel setzt sich aus einem weitporigen Sammelgel und einem engporigem Trengel zusammen. Im Sammelgel werden die Proteine zunächst konzentriert und das gleichmäßige Einlaufen in das Trengel vorbereitet. Für die Bestimmung der Proteingröße laufen Standards mit, sodass nach der Auftrennung der Proteine und dem anschließendem immunologischem Nachweis die Größe des detektierten Proteins bestimmt werden kann.

Die Polyacrylamid-Gele wurden in Gelkassetten gegossen und dabei die Porengröße des Trengels an die Größe des zu detektierenden Proteins angepasst (s. Tabelle 2.2). Die Porengröße des Gels ist abhängig von der Konzentration der Acrylamidmoleküle. Es werden in der Regel Gele mit einer Acrylamid-Konzentration zwischen 8-15% verwendet. Die chemische Copolymerisierung der Acrylamidmonomere wurde durch die Zugabe von APS und TEMED gestartet. Das weitporige Sammelgel (pH 6.8) wurde über das Trengel (pH 8.8) gegossen und für 24 Stunden bei Raumtemperatur auspolymerisiert (Zusammensetzung der Gele s. Kapitel 0). Bis zur Verwendung wurden die Gele feucht verpackt und bei 4°C gelagert. Für die Detektion von p53 wurden 35 µg Gesamtprotein aufgetragen, nachdem die Proben mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt und für 10 Minuten bei 95°C inkubiert wurden, um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zu zerstören. Die elektrophoretische Auftrennung im Sammelgel erfolgte bei 20 mA pro Gel und im Trengel bei 40 mA pro Gel. Die Spannung wurde konstant auf 150 V gehalten.

Tabelle 2.2: Auftrennung der Proteine mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen

Proteingröße [kDa]	Acrylamidkonzentration [% (w/v)]
12-43	15
16-68	10
36-94	7,5
57-212	5

2.2.17.3 Western-Blot

Der Western-Blot wurde für den Nachweis von p53 eingesetzt. Bei dieser Methode werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem Gel mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran übertragen und immobilisiert. Anschließend kann durch die Verwendung spezifischer Antikörper der Proteinnachweis auf der Membran erfolgen. Die PVDF-Membran wurde für 10 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend in Anodenpuffer überführt. Auf die Anodenplatte der Semi-dry-Blottingapparatur wurden zwei mit Anodenpuffer getränktes Whatmanpapiere und darauf die aktivierte Membran gelegt. Das Trengel wurde auf die Membran und darauf zwei in Kathodenpuffer getränktes Whatmanpapiere gelegt. Der Proteintransfer erfolgte für eine Stunde bei 80 mA und 15 V pro Gel.

2.2.17.4 Ponceau-S Färbung

Der Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurde mit Hilfe der Ponceau-S Färbung überprüft. Ponceau-S enthält einen roten Azofarbstoff, welcher reversibel an Proteine bindet und dadurch die Proteinbanden auf der Membran sichtbar macht. Die Membran wurde direkt nach dem Transfer für einige Sekunden in Ponceau-S Lösung geschwenkt und anschließend mit dH₂O wieder entfärbt.

2.2.17.5 Immunologischer Proteinnachweis

Die Membran wurde nach der Ponceau S Färbung zur Absättigung der freien Bindestellen für eine Stunde bei RT in Blockierlösung (5% Albumin in TBS-T) in 50 ml Röhrchen rotierend inkubiert. Dadurch wurde die unspezifische Bindung des Antikörpers verhindert. Der primäre Antikörper wurde 1:1000 in Blockierlösung verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C rotierend in 50 ml Röhrchen inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 15 Minuten in TBS-T gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:10 000 in TBS-T) und erneutes Waschen. Zum Nachweis der Bindung des Sekundärantikörpers wurden die beiden Nachweisreagenzien im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Die Membran wurde in Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette platziert. Die Expositionszeiten variierten dabei abhängig von der Intensität des Signals. Die Röntgenfilme wurden anschließend in den entsprechenden Lösungen in einer Dunkelkammer entwickelt und fixiert. Die densitometrische Auswertung der Banden erfolgte mit dem Programm *Total Lab 100*.

2.2.18 Molekularbiologische Methoden

2.2.18.1 Isolierung der RNA aus dem Hautmodell

Die Isolierung der RNA aus den Fibroblasten des Hautmodells wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) durchgeführt. Die Hautmodelle wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und bis zur Aufarbeitung bei -20°C tiefgefroren. Für die Isolierung wurden die Modelle mit 300 µl RLT-Puffer (inklusive β-Mercaptoethanol 10 µl/ml) für 45 Minuten schüttelnd inkubiert. Anschließend folgte der Proteinase-K-Verdau für 10 Minuten bei 55°C. Nachdem das Reaktionsgemisch für 3 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert wurde, konnte der Überstand (ca. 600 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Es folgte die Fällung der RNA mit dem halben Volumen an 99%igem Ethanol, bevor das Lysat auf die RNeasy Mini Säule aufgetragen wurde. Nachdem die komplette Probe auf die Säule aufgetragen wurde, folgte nach einer kurzen Zentrifugation ein Waschschnitt mit 350 µl RW1. Der Waschpuffer wurde ebenfalls durch die Säule zentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach diesem Waschvorgang folgte der DNase-Verdau. Die DNase wurde nach Herstellerangaben angesetzt und für 15 Minuten bei RT auf der Säule inkubiert. Anschließend folgten drei weitere Waschschnitte (1x RW1, 2x RPE), bevor die RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert wurde. Die eluierte RNA kann bei -20°C gelagert werden.

2.2.18.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund ihrer aromatischen Basen im UV-Bereich, sodass ihre Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Die RNA-Konzentration der Proben wurde mit dem *Nanodrop*-Photometer (Wilmington) bestimmt. Es bietet den großen Vorteil, dass nur sehr geringe Volumina benötigt werden, da die Messung ohne Küvetten direkt in einem Tropfen der Probe erfolgt. Dem Absorptionsmaximum entsprechend wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt, welche im Bereich von 0,1-1 proportional zur Nukleinsäurekonzentration ist, wobei eine Absorption von 1 bei einzelsträngiger RNA 40 µg/ml entspricht. Für die Messung wurden 2 µl Probe direkt auf den Messkopf des Nanodrops pipettiert und die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Die Absorption bei 260 nm wurde für die quantitative Aussage genutzt. Mit Hilfe des Quotienten aus der Absorption von 260 nm und 280 nm konnte die Qualität der RNA beurteilt werden.

2.2.18.3 Herstellung der komplementären DNA (cDNA)

Die isolierte RNA wurde mit MMLV (moloney murine leukemia virus) reverser Transkriptase und Oligo-(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 300 ng RNA mit DEPC-H₂O auf 20 µl verdünnt, mit 1 µl Oligo-(dT)-Primern versetzt und die Primer-Anlagerung 10 Minuten bei 50°C im Thermocycler durchgeführt. Danach wurden 6 µl

MMLV-Reaktionspuffer, 1 µl dNTP's, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 1 µl MMLV reverse Transkriptase und 0,5 µl DEPC-H₂O zugegeben und eine weitere Stunde im Thermocycler inkubiert. Die umgeschriebene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.18.4 Bestimmung der Genexpression mittels Realtime-PCR

Für die Bestimmung der relativen Genexpression wurde zunächst die RNA aus dem Hautmodell isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relative Quantifizierung der Zielgene auf cDNA-Ebene erfolgte anschließend in einer Realtime-PCR. Für die PCR wurden 10 µl Taqman-Mastermix, 6 µl DEPC-H₂O und 1 µl des jeweiligen Primers in eine 96well-PCR-Platte vorgelegt und 3 µl cDNA (entspricht 30ng) zugegeben. Die PCR wurde mit dem *Multicolor Detection System iCycler iQ* von Biorad mit der entsprechenden Software nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Tabelle 2.3: Protokoll der Realtime-PCR im iCycler

Zyklus	Temperatur	Zeit
1	50°C	2 Minuten
	95°C	10 Minuten
2 (40x)	95°C	15 Sekunden
	60°C	1 Minute
3	20°C	halten

Als intrazelluläres Referenzgen wurde das Gen der 18S ribosomalen RNA verwendet, welches unter verschiedenen Bedingungen gleichmäßig exprimiert werden sollte. Die Expression des Zielgens konnte anschließend wie folgt berechnet werden:

- a) Abzug der Referenzgene von dem Zielgen (jeweils bei der unbehandelten Kontrolle (X) und bei der MMC-behandelten Probe (Y))

$$X = ct(\text{Zielgen}) - ct(\text{Referenzgen})$$

$$Y = ct(\text{Zielgen}) - ct(\text{Referenzgen})$$

- b) Berechnung der relativen Expression

$$\text{relative Expression} = 2^{-(X-Y)}$$

Der c_t -Wert beschreibt den Schwellenwert am Anfang der exponentiellen Phase der Fluoreszenzkurve und markiert den Zeitpunkt an dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz steigt. Hohe c_t -Werte deuten somit auf eine niedrige Expression des Zielgens hin.

2.2.19 Entwicklung eines dreidimensionalen Hautmodells

Die Herstellung der Matrix erfolgt auf Basis des Patentes EP 296078 von 1991 vom CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). Bei der „CNRS-Matrix“ handelt es sich um ein Gel aus Kollagen (Typ I und III), Chitosan und Chondroitinsulfat. Das Gel wurde in 24well-Platten gegossen, bei -80°C tiefgefroren und anschließend lyophilisiert. Bei diesem Prozess bilden sich Poren aus, die für die Besiedlung mit Fibroblasten von entscheidender Bedeutung sind. Die lyophilisierte Matrix sollte anschließend mindestens sechs Wochen bei Raumtemperatur gelagert werden, bevor sie für die Einsaat der Fibroblasten benutzt wird. Vier Tage bevor die Fibroblasten in die Matrix eingesät wurden, musste die Matrix über Nacht mit Ethanol (70%) benetzt und anschließend mit PBS ++ mindestens viermal über einen Zeitraum von sechs Stunden gewaschen werden. Bis zur Einsaat der Fibroblasten wurde die Matrix in FB-Medium für mindestens 24 Stunden äquilibriert. Anschließend wurden $5 \cdot 10^5$ Fibroblasten pro Vertiefung eingesät und für 14 Tage in FB-Medium submers bei 37°C kultiviert, wobei das Medium jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Die Keratinozyten wurden auf Feederzellen kultiviert, welche im Vorfeld durch Mitomycin-C- Behandlung (4 Stunden; 0,5 mg/ml) teilungsunfähig gemacht wurden, dadurch aber wachstumsfördernde Stoffe für die Keratinozyten produzierten. Zwei Tage nachdem die Feederzellen in eine Zellkulturflasche ausgesät wurden, erfolgte die Einsaat der Keratinozyten mit $6 \cdot 10^5$ pro 175cm^2 -Zellkulturflasche. Die anschließende Kultivierung in Keratinozytenmedium bis zu einer Konfluenz von 80% dauerte 6-9 Tage. Danach wurden die Keratinozyten geerntet und $4,5 \cdot 10^5$ auf die Matrix mit den Fibroblasten eingesät. Das Modell wurde submers für weitere zwei Tage in Keratinozytenmedium kultiviert und anschließend auf Filterpapier an die Luft-Medium-Grenze angehoben. Für den 14-tägigen Differenzierungsprozess wurden die Modelle in ALI-Medium weiter kultiviert, sodass das Epithel differenzieren konnte. Nach 21 Tagen wurden die Modelle für histologische und biochemische Analysen verwendet. Während der ALI-Phase wurde das Medium jeden zweiten Tag erneuert.

2.2.20 Entwicklung eines Hautalterungsmodells

Die Vorbereitung der Matrix erfolgte wie in Kapitel 2.2.19 beschrieben. Eine direkte Einsaat von seneszenten Fibroblasten (DIAS oder RS) führte nicht zu dem gewünschten Aufbau der typischen Hautschichten, sodass sich diese Methode nicht eignete, um ein Hautalterungsmodell aufzubauen. Für die erfolgreiche Entwicklung eines Hautalterungsmodells wurden $5 \cdot 10^5$ mitotische Fibroblasten pro Vertiefung eingesät und für 12 Tage in FB-Medium submers bei 37°C kultiviert, wobei das Medium jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Zwei Tage bevor die Keratinozyten aufgesät wurden, erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das FB-Medium durch Mitomycin-C-haltiges (200 nM) FB-Medium ausgetauscht wurde. Das Mitomycin-C-haltige Medium wurde nach 24 Stunden

erneuert und das Modell insgesamt für 48 Stunden damit behandelt. Anschließend wurden das Mitomycin-C-haltige FB Medium abgesaugt und die Keratinozyten mit einer Zellzahl von $4,5 \cdot 10^5$ in Keratinozytenmedium auf die Matrix mit den Fibroblasten gesät. Die Keratinozyten wurden zuvor bis zu einer Konfluenz von 80% auf Feederzellen kultiviert (s. Kapitel 2.2.19). Das Modell wurde submers für weitere zwei Tage in Keratinozytenmedium kultiviert und anschließend an die Luft-Medium-Grenze angehoben. Für den 14-tägigen Differenzierungsprozess wurden die Modelle in ALI-Medium weiter kultiviert, sodass das Epithel differenzieren konnte. Nach 21 Tagen wurden die Modelle für histologische und biochemische Analysen verwendet. Während der ALI-Phase wurde das Medium jeden zweiten Tag erneuert.

2.2.21 Isolierung der Fibroblasten aus dem Hautmodell

Da eine detaillierte Untersuchung der Fibroblasten zur biochemischen Charakterisierung im Gewebeverband nur begrenzt möglich ist, wurden die Fibroblasten nach der vollständigen Entwicklung des Ganzhautmodells aus diesem isoliert und in Monolayerversuchen analysiert. Dazu wurde das Hautmodell zunächst für 2 Stunden bei 37°C mit Thermolysin inkubiert um die Epidermis von der Dermis zu lösen. Die Epidermis konnte anschließend mit einer Pinzette abgezogen und bei Bedarf für weitere Untersuchungen verwendet werden. Die Dermis wurde anschließend geviertelt und für 2 Stunden bei 37°C mit einer Kollagenase-Leermedium-Lösung (10000 U/ml) schüttelnd inkubiert. Die Matrix löste sich während dieser Inkubation weitestgehend auf und Matrixreste wurden mit einer Pinzette entfernt. Um die Anzahl an Matrixtrümmern zu verringern, wurde die gesamte Suspension durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben und anschließend zentrifugiert (1000 rpm, 5 Minuten). Das Zellpellet wurde in FB-Medium aufgenommen und für die entsprechenden Tests mit der gewünschten Zellzahl eingesetzt.

2.2.22 Histologische Beurteilung

2.2.22.1 Fixierung der Hautmodelle

Anhand von Paraffin- und Kryoschnitten wurde die Morphologie der Hautmodelle begutachtet. Die Hautmodelle wurden halbiert und für die Paraffinschnitte in 4% Formalin fixiert. Anschließend wurden die Modelle mit Hilfe einer Alkoholreihe im Entwässerungsautomaten durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (s. Tabelle 2.4) und am EG1140H von Leica bei 60°C in Paraffin eingebettet. Die andere Hälfte der Modelle wurde für die Kryoschnitte in *Tissue Freezing Medium* in Kryomols eingebettet und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Tabelle 2.4: Alkoholische Reihe zum Entwässern der Paraffinschnitte

Lösung	Zeit	Temperatur
Ethanol 50%	1 Stunde	35°C
Ethanol 70%	1 Stunde	35°C
Ethanol 70%	1 Stunde	35°C
Ethanol 90%	1 Stunde	35°C
Ethanol 95%	1 Stunde	35°C
Ethanol 95%	1 Stunde	35°C
Isopropanol	1,5 Stunden	35°C
Isopropanol	1,5 Stunden	35°C
Xylol	1,5 Stunden	35°C
Xylol	1,5 Stunden	35°C
Paraffin	1 Stunde	60°C
Paraffin	1 Stunde	60°C
Paraffin	1 Stunde	60°C

2.2.22.2 Schnittpräparate

Paraffinschnitte

Die in Paraffin eingebettet Hautmodelle wurden auf 1°C abgekühlt und anschließend mit dem Mikrotom RM2145 von Leica in 5 µm dicke Präparate geschnitten. Die Schnitte wurden in 45°C warmes Wasser überführt und mit Hilfe eines feinen Pinsels auf *SuperFrostPlus* Objektträger (Thermo Scientific) übertragen. Nach dem Antrocknen der Schnitte über Nacht bei 37°C im Trockenschrank wurden diese entweder für histologische Färbungen benutzt oder bei Raumtemperatur gelagert.

Kryoschnitte

Die Kryoschnitte wurden mit Hilfe des Kryostaten CM1900 (Leica) hergestellt. Die gefrorenen Hautmodelle wurden für 30 Minuten bei -25°C äquilibriert und anschließend mit Hilfe des *Tissue Freezing Mediums* auf dem Probenteller fixiert. Die 8 µm dicken

Schnitte wurden auf *SuperFrostPlus* Objektträger überführt und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entweder für histologische Färbungen verwendet oder im Kühlschrank gelagert.

2.2.22.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Ein Färbeverfahren in der Histologie, mit dem die verschiedenen Strukturen eines feingeweblichen Schnittes angefärbt werden können ist die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, oft abgekürzt als HE-Färbung. Sie dient der Unterscheidung verschiedener Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild. Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum, der seine färbende Eigenschaft entwickelt, wenn er zu Hämalaun (basischer Hämateinlack) aufbereitet wird. Hämalaun färbt alle sauren bzw. basophilen Strukturen, insbesondere Zellkerne, blau ein. Eosin ist ein synthetischer saurer Farbstoff, der alle azidophilen beziehungsweise basischen Strukturen rot färbt. Mit Hilfe des Färbeautomaten *HistoTek Slide Stainer* (Miles Scientific) wurden die Paraffinschnitte nach folgendem Protokoll mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt.

Tabelle 2.5: Färbeprotokoll der automatisierten HE-Färbung

Lösung	Zeit
Xylol	2 Minuten
Ethanol abs.	20 Sekunden
Ethanol 50%	20 Sekunden
Hämatoxylin	3,5 Minuten
Ethanol 70%	20 Sekunden
Ammoniumhydroxid-Ethanol (1,5% / 80%)	20 Sekunden
Ethanol 95%	20 Sekunden
Eosin	20 Sekunden
Ethanol abs.	20 Sekunden
Ethanol abs.	20 Sekunden
Xylol	20 Sekunden

2.2.22.4 AZAN-Färbung

Die AZAN-Färbung wurde 1915 von dem Tübinger Professor M. Heidenhain beschrieben und ist ein Akronym aus den Anfangsbuchstaben der Farbstoffe Azocarmin und Anilinblau. Sie dient der Differenzierung von extrazellulären Bindegewebsfasern, Geweben und Zellkomponenten. Der Bestandteil Anilinblau setzt sich aus den beiden Farbstoffen Anilinblau und Orange G zusammen. Dementsprechend handelt es sich bei dieser Methode um eine Trichromfärbung, bei der die einzelnen Farbstoffe bevorzugt mit unterschiedlichen Gewebestrukturen reagieren. Die Paraffinpräparate wurden für die Färbung zunächst über Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert und rehydriert (Xylol 2 x 5 Minuten, jeweils 1 Minute 100%, 90%, 70% und 50% Ethanol).

Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in Anilinalkohol vorgebeizt und danach kurz mit H₂O gespült. Nach der Inkubation mit Azokarmin (15 Minuten, 56°C) wurden die Schnitte erneut mit H₂O gewaschen und so lange in Anilinalkohol gegeben, bis die Kerne deutlich zu erkennen waren (ca. 20 Minuten). Diese Differenzierung wurde durch das Eintauchen in essigsäuren Alkohol unterbrochen (1 Minute). Die sich anschließende Inkubation in 5%-iger Phosphorwolframsäure (30 Minuten) entfärbte und beizte das kollagene Bindegewebe. Nach dem Spülen der Schnitte mit H₂O erfolgte eine Gegenfärbung mit 1:3 verdünnter Anilinblau-Goldorange-Essigsäure (30 Minuten). Nach einem weiteren Waschschritt mit H₂O wurden die Schnitte zur Differenzierung in 96% Alkohol inkubiert (1 Minute) und anschließend über Isopropanol (30 Sekunden) und Xylol (30 Sekunden) dehydriert, sodass die Präparate mit *Cytoseal* eingedeckelt werden konnten.

2.2.22.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Die Immunfluorezenz wird eingesetzt, um bestimmte Proteine in Zellen und Geweben zu lokalisieren. Dazu werden Antikörper verwendet, die mit fluoreszierenden Farbstoffen, Enzymen oder Goldpartikeln gekoppelt sind und dadurch mikroskopisch nachweisbar werden. In der Regel werden die Gewebsschnitte aber nicht direkt mit diesen markierten Antikörpern inkubiert. Vielmehr erfolgt die Inkubation zunächst mit einem nicht markierten, spezifisch Primärantikörper, der gegen das gesuchte Antigen gerichtet ist und erst in einem zweiten Schritt wird ein konjugierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der speziesspezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet ist. Für die Immunfluoreszenz wurden die Kryoschnitte zunächst etwa 20 Minuten lang bei RT luftgetrocknet. Danach folgte eine Inkubation für 10 Minuten in eiskaltem Aceton bei -20°C zur Fixierung des Gewebes. Nachdem die Schnitte luftgetrocknet waren, erfolgte eine einstündige Inkubation mit 10%-igem Ziegenserum bei RT zur Sättigung der unspezifischen Bindungsstellen. Anschließend wurde der Primärantikörper in 10%-igem Ziegenserum verdünnt und mit dem Schnittpräparat über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschschritte für jeweils 10 Minuten in PBS. Unter Berücksichtigung der Herkunft des Primärantikörpers wurden die Gewebeschnitte anschließend eine Stunde bei RT mit dem jeweils speziesspezifischen Sekundärantikörper und DAPI inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten von jeweils 10 Minuten mit PBS wurden die Schnitte mit *Fluorescenc Mounting Medium* (DAKO) eingebettet.

2.2.23 Allgemeine Versuchsbedingungen

Alle im Ergebnisteil gezeigten Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und Signifikanzen mit dem ANOVA-Test und anschließendem Newman-Keuls-Test ermittelt. Alle verwendeten Substanzen wurden mittels MTT-Test auf Toxizität überprüft, außerdem wurden immer subkonfluente Fibroblasten verwendet. Die Behandlung mit Mitomycin-C erfolgte in 175cm²-Zellkulturflaschen (2 x 24 Stunden, 200 nM) mit einer anschließenden Postinkubation von 5 Tagen. Danach wurden die Fibroblasten abtrypsinisiert und für die jeweiligen Versuche in Mikrotiterplatten oder Zellkulturschalen unterschiedlicher Größe eingesät.

2.2.24 Statistik

Als Maßstab für die Signifikanz wurde $p < 0,05$ als signifikant, $p < 0,01$ als hochsignifikant und $p < 0,001$ als höchstsignifikant festgelegt. Der Student's t-Test wurde für den Vergleich von zwei Datenreihen in *Excel* durchgeführt. Für die Analyse von mehr als zwei Datenreihen wurde mit Hilfe des Programms *Prism* eine nicht parametrische One-way-ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls post hoc-Test durchgeführt.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Induktion einer beschleunigten und dauerhaften Seneszenz in Hautfibroblasten und darauf aufbauend die Etablierung und Charakterisierung eines dreidimensionalen Hautalterungsmodells.

Durch eine dauerhafte Subkultivierung kommt es bei fast allen menschlichen somatischen Zellen zu einem Stillstand der Proliferation, welcher als replikative Seneszenz (RS) bezeichnet wird (Ben-Porath & Weinberg, 2005). Als wichtiger Faktor für das Auftreten der replikativen Seneszenz wurde zunächst die Verkürzung der Telomere bis zu einer kritischen Länge während der Replikation angesehen (Harley et al., 1990). (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Des Weiteren ist jedoch beschrieben, dass nicht allein die Länge der Telomere, sondern vielmehr eine Störung des Gesamtzustands der Telomerstruktur (Telomer-Dysfunktion) für das Einleiten der replikativen Seneszenz verantwortlich ist (Gilley et al., 2005; Rodier et al., 2005). Durch die Telomer-Dysfunktion und anderen Faktoren wie z.B. oxidativen Stress (Reaper et al., 2004) werden Signalwege aktiviert, die zu einer vorzeitigen, telomerunabhängigen Seneszenz führen (Campisi, 2005). Zellkulturexperimente haben mehrfach gezeigt, dass neben Pro-Oxidantien wie H₂O₂ (Toussaint et al., 2000) auch DNA-schädigende Substanzen wie Busulfan (Probin et al., 2007), ein zytostatisch wirkendes Alkylanz, eine vorzeitige Seneszenz bei Fibroblasten auslösen können, die nicht mit einer Verkürzung der Telomere einhergehen muss. Ein vorübergehender Zellzyklusarrest ist beschrieben, jedoch nur kurzweilig bis zu einer Zeit von drei Tagen nach der H₂O₂-Behandlung (Frippiat et al., 2001) oder bis zu 11 Tagen nach der Busulfan-Behandlung (Probin et al., 2007). Eine dauerhafte Seneszenz, wie sie *in vivo* vorkommt, wird durch die genannten Arbeiten jedoch nicht beschrieben. Da der zweite Teil dieser Arbeit den Aufbau eines dreidimensionalen, organotypischen *in vitro* Modells zur Hautalterung umfasst, musste eine Möglichkeit gefunden werden, eine dauerhafte beschleunigte Seneszenz zu induzieren (Altern im Zeitraffer). Als potentielle neue Substanz zur Induktion einer dauerhaften Seneszenz wurde Mitomycin-C (MMC) ausgewählt, da MMC sowohl oxidativen Stress als auch direkte DNA-Schädigungen induziert und somit zwei wichtige Mechanismen der replikativen Seneszenz aufgreift. Außerdem wurde bereits eine beschleunigte Differenzierung von Fibroblasten durch die Behandlung mit Mitomycin-C beschrieben (Bayreuther, 1988; Brenneisen et al., 1994).

Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse der Experimente zum Ermitteln einer geeigneten Substanz für die dauerhafte Induktion einer beschleunigten Seneszenz *in vitro* gezeigt (s. Kapitel 3.1) und im Anschluss daran Merkmale der replikativen Seneszenz (RS) mit der **drug-induced-accelerated senescence** (DIAS) verglichen (s. Kapitel 3.2).

Danach wird die Entwicklung und Charakterisierung eines dreidimensionalen Hautalterungsmodells beschrieben (s. Kapitel 3.3) und Ansätze für mögliche Anti-Aging-Strategien gezeigt (s. Kapitel 3.4).

3.1 Untersuchungen zur Induktion einer dauerhaften Seneszenz

Zur Induktion einer telomerunabhängigen, beschleunigten und dauerhaften Seneszenz wurden folgende Substanzen untersucht (s. Tabelle 3.1): Wasserstoffperoxid, Mitomycin-C und Busulfan. Sowohl die Konzentrationen, als auch die Behandlungsdauer richteten sich nach Literaturangaben. Als Kontrolle (ct) für junge Zellen dienten subkonfluente, exponentiell wachsende Fibroblasten bis zur 15. Passage, entsprechend einer CPD von maximal 40.

Tabelle 3.1: Übersicht potentieller Substanzen zur Induktion einer Seneszenz

Passage	Substanz	Abk.	Dauer	Konzentration	Literatur
5-15	Wasserstoffperoxid	H ₂ O ₂	1 x 2 h	150 µM	(Frippiat et al., 2001)
5-15	Mitomycin-C	MMC	2 x 24 h	200 nM	(Rodemann, 1989)
5-15	Busulfan	BU	1 x 24 h	120 µM	(Probin et al., 2007)

3.1.1 Toxizität seneszenz-induzierender Substanzen in Fibroblasten

Da mit Hilfe subtoxischer Konzentrationen von H_2O_2 oder Busulfan die Induktion einer vorzeitigen zellulären Alterung beschrieben ist (Frippiat et al., 2001; Probin et al., 2007), wurde die Toxizität der eingesetzten Substanzen mit Hilfe eines Vitalitätstests (MTT-Test) überprüft.

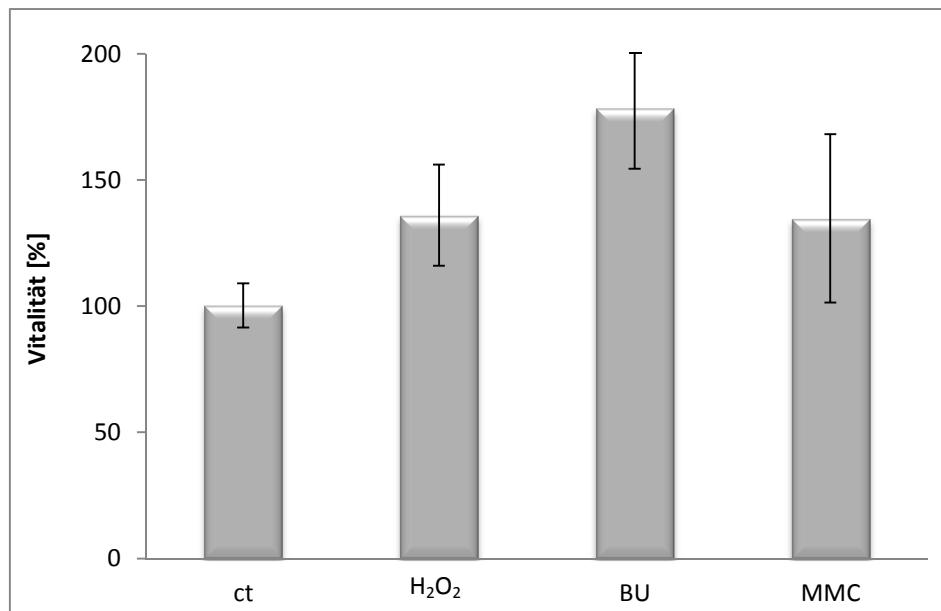


Abbildung 3.1: Toxizität seneszenz-induzierender Substanzen Humane dermale Fibroblasten wurden mit 150 μM H_2O_2 , 120 μM Busulfan (BU) und 200 nM Mitomycin-C (MMC) behandelt. Die Zellvitalität wurde bei gleicher Zellzahl fünf Tage nach der Behandlung mittels MTT-Test bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Die Extinktion der unbehandelten Kontrolle (ct) wurde auf 100% gesetzt und die Messwerte der behandelten Zellen darauf bezogen.

Subkonfluente Fibroblasten wurden nach den Angaben in Tabelle 3.1 behandelt und die Vitalität nach einer fünftägigen Postinkubation mit Hilfe des MTT-Tests überprüft. Abbildung 3.1 zeigt deutlich, dass keine Abnahme der Vitalität durch die jeweilige Behandlung hervorgerufen wurde. Ebenfalls wurde die Vitalität direkt nach der Behandlung gemessen. Die Ergebnisse zeigten ebenfalls keine toxischen Effekte (Diekmann 2013; Daten nicht gezeigt). Die Vitalität der behandelten Fibroblasten stieg sowohl nach der H_2O_2 -Behandlung als auch nach der Behandlung mit Mitomycin-C auf $135\% \pm 20\%$ (H_2O_2) bzw. $135\% \pm 33\%$ (MMC). Durch die Busulfanbehandlung konnte ein Anstieg der Vitalität auf $178\% \pm 24\%$ beobachtet werden.

3.1.2 Einfluss seneszenz-induzierender Substanzen auf die Zellproliferation

Ein wichtiges Merkmal replikativ seneszenter Fibroblasten ist ein permanenter Stopp des Zellzyklus. Inwiefern H_2O_2 , Busulfan und Mitomycin-C zur Hemmung der Proliferation und

dem damit verbundenen Zellzyklusstopp geeignet sind, wurde mit Hilfe des BrdU-Assays untersucht. Der Einbau des Thymidinanalogs Bromdesoxyuridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA kann als direkter Ausdruck der proliferativen Kapazität der Zellen angesehen werden.

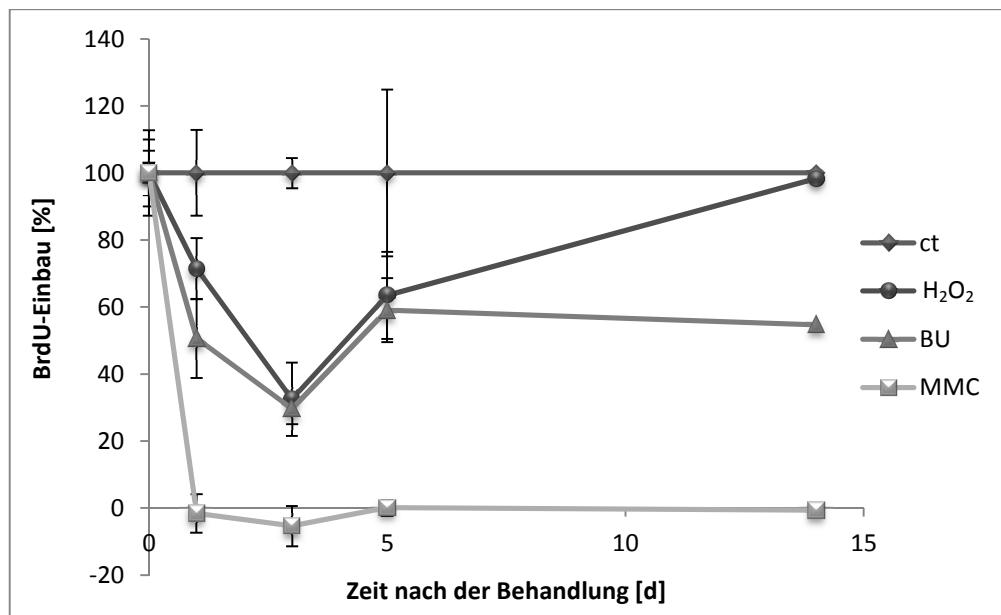


Abbildung 3.2: Zeitlicher Verlauf der Proliferation Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 150 µM H₂O₂, 120 µM Busulfan und 200 nM Mitomycin-C behandelt. Anschließend wurde bei gleicher Zellzahl die proliferative Kapazität mit Hilfe des BrdU-Assays an Tag 1, 3, 5 und 14 nach der Behandlung gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung drei voneinander unabhängig durchgeföhrter Experimente (n=2). Die gemessene Extinktion der unbehandelten Fibroblasten wurde auf 100% normiert und die Extinktion der behandelten Zellen darauf bezogen.

Abbildung 3.2 zeigt die zeitliche Entwicklung der Proliferation nach der Behandlung. Es ist deutlich zu erkennen, dass durch die Behandlung mit 150 µM H₂O₂ eine kurzzeitige Hemmung der Proliferation induziert werden konnte. Die Proliferation sank im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle direkt nach der Behandlung (H₂O₂, 1d) auf 71%. Bis zum dritten Tag nach der Behandlung sank die Proliferation weiter auf 32% ab, bevor sie bereits nach fünf Tagen auf 63% anstieg. Nach 14 Tagen war der Wachstumsarrest aufgehoben und die Proliferationsrate stieg auf 100%. Durch die Behandlung mit Busulfan sank die Proliferation nach einem Tag auf 50% und erreichte nach drei Tagen ein Minimum von 30%, bevor sie nach fünf Tagen wieder 50% anstieg und dieses Niveau konstant hielt. Mitomycin-C hingegen induzierte einen dauerhaften Proliferationsstopp über die gesamte Kultivierungszeit von 14 Tagen, sodass die MMC- behandelten Fibroblasten zu keinem Zeitpunkt proliferative Aktivität zeigten. Als mögliche Ursache für einen Wachstumsarrest werden reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*) (ROS) diskutiert (Frippiat et al., 2001). Um herauszufinden, ob es sich um einen ROS-abhängigen Proliferationsstopp handelt, wurde im nächsten Schritt die Menge an intrazellulären ROS gemessen.

3.1.3 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Induktion von Seneszenz

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen gemäß der von Harman formulierten Freie-Radikal-Theorie (Harman, 1956) eine zentrale Rolle bei der Alterung von Fibroblasten. Um den Einfluss von H_2O_2 , Busulfan und Mitomycin-C auf den intrazellulären ROS-Gehalt von Fibroblasten zu untersuchen, wurden die Fibroblasten mit dem Farbstoff 2'7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat ($H_2DCF-DA$) angefärbt, welcher intrazellulär durch ROS zu dem fluoreszierenden Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert wird. Die Fluoreszenzintensität des Farbstoffs verhält sich proportional zum Gehalt an ROS.

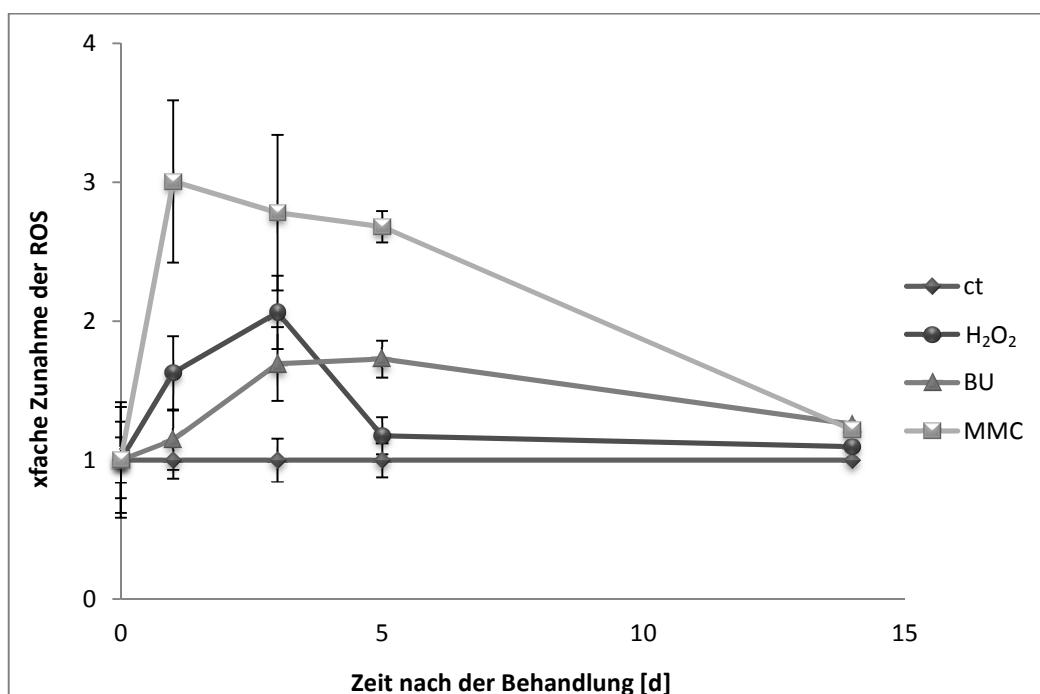


Abbildung 3.3: Zeitlicher Verlauf des Auftretens von ROS Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 150 μM H_2O_2 , 120 μM Busulfan (BU) oder 200 nM Mitomycin-C (MMC) behandelt. Anschließend wurde bei gleicher Zellzahl der Gehalt an intrazellulären ROS 1, 3, 5 und 14 Tage nach der Behandlung mit Hilfe der DCF-Messung ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten ($n=2$). Der ROS-Gehalt der unbehandelte Kontrolle (ct) wurde auf 1 normiert und der ROS-Gehalt der behandelten Zellen darauf bezogen.

Nach der Behandlung mit H_2O_2 stieg der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies nach einem Tag bereits auf das 1,6-fache an und erreichte nach drei Tagen bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, mit einer 2-fachen Erhöhung sein Maximum. Nach 14 Tagen wurde ein deutlicher Abfall gemessen, sodass keine signifikante Erhöhung mehr detektierbar war. Durch die Behandlung mit Busulfan (BU) stieg der ROS-Gehalt nicht direkt nach der Behandlung, sodass erst nach drei Tagen ein 1,7-facher Anstieg gemessen wurde, welcher auch am fünften Tag nach der Behandlung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, konstant gehalten wurde, bevor er nach 14 Tagen mit einem

1,3-fachen Anstieg nicht mehr signifikant erhöht war. Die Behandlung mit Mitomycin-C (MMC) lieferte den stärksten Anstieg an intrazellulären ROS. Direkt nach der Behandlung konnte eine Verdreifachung des ROS-Gehaltes gemessen werden. Dieser Anstieg hielt sich bis zu fünf Tage konstant auf dem hohen Niveau und sank erst in den folgenden Tagen, sodass nach 14 Tagen kein signifikanter Anstieg verglichen mit der unbehandelten Kontrolle mehr messbar war.

Die Ergebnisse zeigen, dass 14 Tage nach der jeweiligen Behandlung keine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies innerhalb der Zellen vorlag. Aufgrund der Tatsache, dass durch die Behandlung mit BU und MMC nach 14 Tagen keine ROS mehr detektierbar waren, der Wachstumsarrest jedoch immer noch stabil war (s. Kapitel 3.1) lässt sich schlussfolgern, dass der Auslöser für einen dauerhaften Wachstumsarrest nicht allein die reaktiven Sauerstoffspezies sein können, sondern durch die Behandlung mit BU oder MMC voraussichtlich ein DNA-Schaden induziert wird, welcher zu einer Aktivierung von Wachstumsarrest-auslösenden Signalkaskaden führen kann.

3.1.4 Auswirkung seneszenz-induzierender Substanzen auf die Zellmorphologie

Mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz bei Fibroblasten ist eine Zunahme der Zellgröße beschrieben (Mitsui & Schneider, 1976). Um festzustellen inwiefern durch die Behandlung mit H_2O_2 , Busulfan oder Mitomycin-C eine Zunahme der Zellgröße als Indikator einer seneszenten Zelle beobachtet werden kann, wurden die Fibroblasten mit *Coomassie Brilliant Blue* zur mikroskopischen Auswertung angefärbt. In Abbildung 3.4 sind repräsentative Aufnahmen der Zellfärbungen gezeigt.

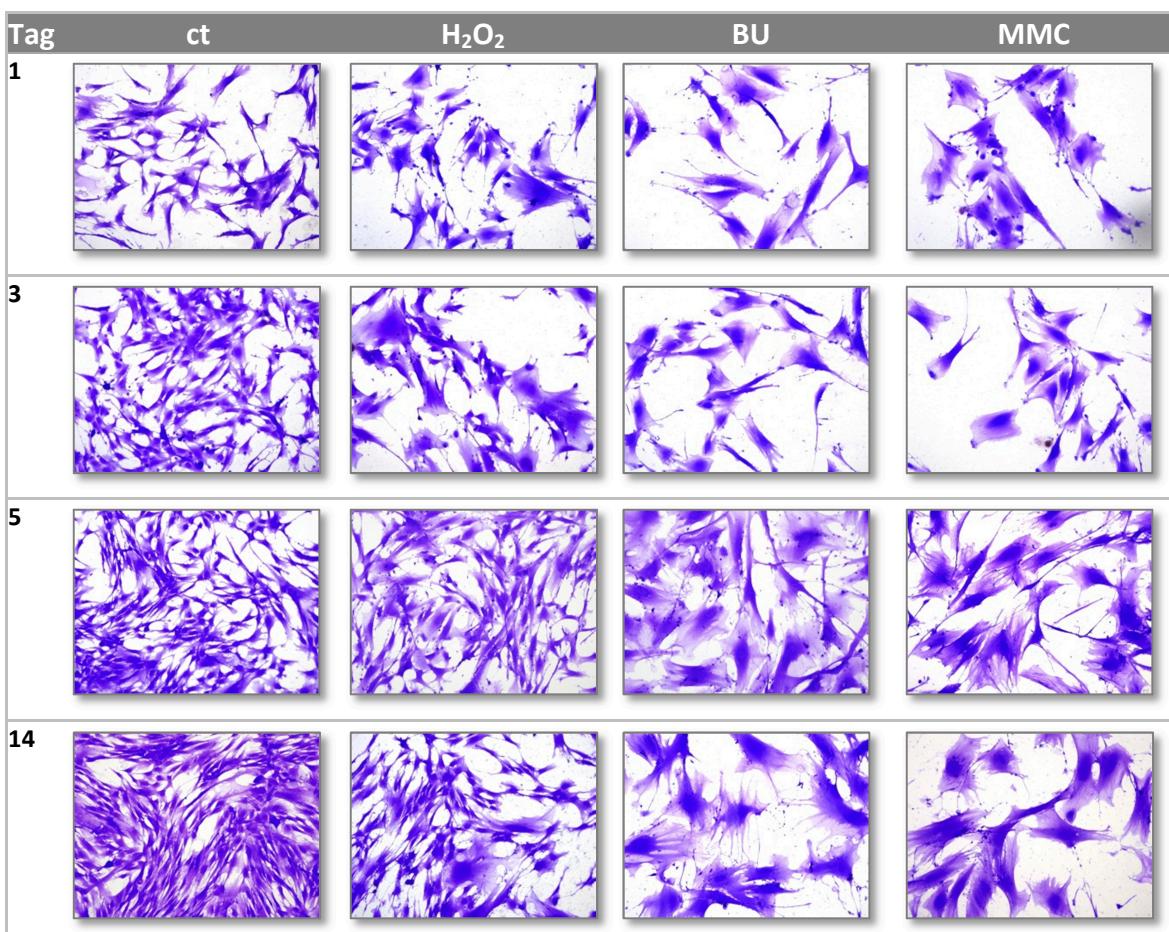


Abbildung 3.4: Morphologische Entwicklung der Zellform Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 150 μM H_2O_2 , 120 μM Busulfan (BU) und 200 nM Mitomycin-C (MMC) behandelt. Anschließend wurde die morphologische Entwicklung mikroskopisch durch Anfärben der Zellen mit *Coomassie Brilliant Blue* über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Bild von drei unabhängigen Färbungen ($n=3$).

Eine Zunahme der Zellgröße nach der Behandlung mit H_2O_2 kann in den ersten drei Tagen nach der Behandlung beobachtet werden (s. Abbildung 3.4, H_2O_2 , Tag 1 + 3). Fünf bzw. 14 Tage nach der Behandlung sind lediglich vereinzelt Fibroblasten erkennbar, die eine vergrößerte Oberfläche zeigen (s. Abbildung 3.4, H_2O_2 , Tag 5 + 14). Die Mehrheit der Fibroblasten zeigt zu diesem Zeitpunkt die typische spindelförmige Zellform mitotischer (proliferierender) Fibroblasten. Im Gegensatz dazu konnte sowohl durch die Behandlung

mit Busulfan, als auch mit Mitomycin-C mit zunehmender Kulturdauer eine Zunahme der Zellgröße beobachtet werden, welche übereinstimmt mit den bereits früher beschriebenen morphologischen Kriterien gealterter Fibroblasten (Bayreuther, 1988). Mitotische Fibroblasten zeichnen sich durch eine spindelförmige Zellform mit Ausbuchtungen rund um den Zellkern aus (s. Abbildung 3.4, ct, Tag 1-14). Im Gegensatz dazu sind typische Kennzeichen seneszenter Fibroblasten eine 10 bis 20-fache Vergrößerung der Zelloberfläche mit großem, flachem und ovalem Zellkern. Diese Morphologie konnte bei den Fibroblasten nach fünf bzw. 14 Tagen beobachtet werden, welche mit Busulfan (s. Abbildung 3.4, BU, Tag 5 + 14) oder Mitomycin-C (s. Abbildung 3.4, MMC, Tag 5 + 14) behandelt wurden, jedoch nicht bei den Zellen, die mit H₂O₂ behandelt wurden (s. Abbildung 3.4, H₂O₂, Tag 5 + 14).

3.1.5 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Seneszenz-Induktion

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass durch die Behandlung mit H₂O₂ eine transiente Seneszenz induziert werden konnte. Diese Seneszenz führte in den ersten drei Tagen nach der Behandlung zu einem Wachstumsarrest, einem Anstieg des intrazellulären ROS-Gehalts sowie einer Vergrößerung der Zellmorphologie. Fünf bzw. 14 Tage nach der Behandlung sank die intrazelluläre Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, sodass keine signifikante Erhöhung mehr gemessen werden konnte. Parallel zum Abfall des ROS-Gehalts, stieg die Proliferationsrate wieder an und die morphologischen Veränderungen gingen verloren. Somit wird eine ROS-Abhängigkeit bei der Induktion einer vorzeitigen Seneszenz durch H₂O₂ deutlich. Allerdings ist H₂O₂ allein nicht geeignet, um eine vorzeitige und dauerhafte Seneszenz zu induzieren. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Untersuchungen zur Seneszenz-Induktion auf die Anwendung von H₂O₂ als Stimulus verzichtet.

Busulfan und Mitomycin-C zeigten einen dauerhaften Wachstumsarrest über den untersuchten Zeitraum von 14 Tagen. Dieser Wachstumsarrest wurde sowohl von einer Zunahme der Zellgröße, als auch von morphologischen Veränderungen konstant begleitet. Durch die Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies, welche nach 14 Tagen sowohl bei der Busulfanbehandlung, als auch bei der Behandlung mit Mitomycin-C keinen signifikanten Anstieg mehr zeigten, wurde deutlich, dass ROS alleine nicht ausreichen, um eine vorzeitige und dauerhafte Seneszenz zu induzieren. Vielmehr ist ein zweiter Stimulus wie z.B. ein DNA-Schaden durch alkylierende Substanzen wie Busulfan oder Mitomycin-C notwendig, um den seneszenten Charakter der Fibroblasten dauerhaft aufrecht zu erhalten.

Aufgrund der Tatsache, dass die vorzeitig induzierte Seneszenz durch H₂O₂ nur transient war und Busulfan die Proliferation lediglich um 50% verringerte und nur einen leichten

Anstieg des ROS-Gehalts induzierte, wurde in den weiteren Versuchen ausschließlich das Potential von Mitomycin-C zur Induktion einer beschleunigten und dauerhaften Seneszenz (DIAS = **d**rug **ibduced **a**ccelerated **s**enescence) genauer untersucht. Mitomycin-C kombiniert sowohl oxidativen Stress als auch eine DNA-Schädigung und umfasst somit zwei wesentliche Mechanismen, die als Ursachen für replikative Seneszenz in der Theorie der freien Radikale und der DNA-Schadenstheorie (s. Kapitel 1.1.1.1) diskutiert werden.**

3.2 Untersuchungen zur Alterung im Zeitraffer mit Mitomycin-C

Replikative Seneszenz (RS) ist ein zeitaufwendiger Prozess, welcher bei humanen, dermalen Fibroblasten in Folge einer dauerhaften Kultivierung nach ca. 200 Tagen bei einer kumulativen Populationsverdopplung (CPD) von 55-60 erreicht wird (Cristofalo & Pignolo, 1993). Der replikativen Seneszenz wurde bisher die stressinduzierte, vorzeitige Seneszenz durch H₂O₂ (SIPS) gegenübergestellt, mit dessen Hilfe ein frühzeitiger Alterungsprozess ausgelöst werden kann. Aufgrund der Untersuchungen zur Induktion einer dauerhaften Seneszenz (s. Kapitel 3.1) zeigte sich jedoch, dass es sich bei der vorzeiten Alterung durch H₂O₂ um eine transiente Seneszenz handelt und ein zweiter Stimulus wie z.B. ein DNA-Schaden durch Mitomycin-C nötig ist, um eine dauerhafte Seneszenz zu induzieren. In den folgenden Untersuchungen wurde analysiert, welche gemeinsamen Merkmale zwischen RS und MMC-induzierter Seneszenz (DIAS) bestehen und inwiefern durch die Behandlung mit Mitomycin-C eine replikative Seneszenz simuliert werden kann, sodass dadurch eine Möglichkeit gegeben wäre, den Alterungsprozess im Zeitraffer zu untersuchen. Für die vergleichende Analyse zwischen RS und DIAS wurden folgende Versuchsbedingungen gewählt:

Als Kontrolle für junge Zellen (ct) dienten subkonfluente mitotische Fibroblasten bis zur 15. Passage. Diese Fibroblasten hatten eine CPD < 40 und zeigten ein exponentielles Wachstum. Fibroblasten des gleichen Spenders wurden mit einer CPD > 55 verwendet und als replikativ gealtert angesehen, da diese Fibroblasten bereits in der Plateauphase der Wachstumskurve waren und mit einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von 0,02/Woche ihr proliferatives Potential erschöpft hatten. Diese Fibroblasten wurden ca. 14 Tage nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz verwendet. Mitotische Fibroblasten mit einer CPD < 40 wurden durch zweimalige Behandlung mit Mitomycin-C zu induziert beschleunigt seneszenten Fibroblasten (DIAS) (s. Kapitel 2.1.2). Die Behandlung erfolgte mit einer Konzentration von 200 nM für 24 Stunden, gefolgt von einer 24-stündigen Erholungsphase in FB-Medium, nach der sich eine erneute Behandlung mit 200 nM Mitomycin-C für 24 Stunden anschloss. Nach der Behandlung folgte eine fünftägige Postinkubation in FB-Medium.

3.2.1 Vergleich des Proliferationsverhaltens senescenter Fibroblasten

Das Alter einer Zellkultur kann durch die kumulative Populationsverdopplung (CPD) als Summe der durchlaufenen Verdopplungen der Gesamtpopulation ausgedrückt werden. Abbildung 3.5 zeigt die Entwicklung der Populationsverdopplungen unbehandelter Zellen bis zum Status der replikativen Seneszenz (RS) im Vergleich zu den MMC-induziert seneszenten Zellen (DIAS).

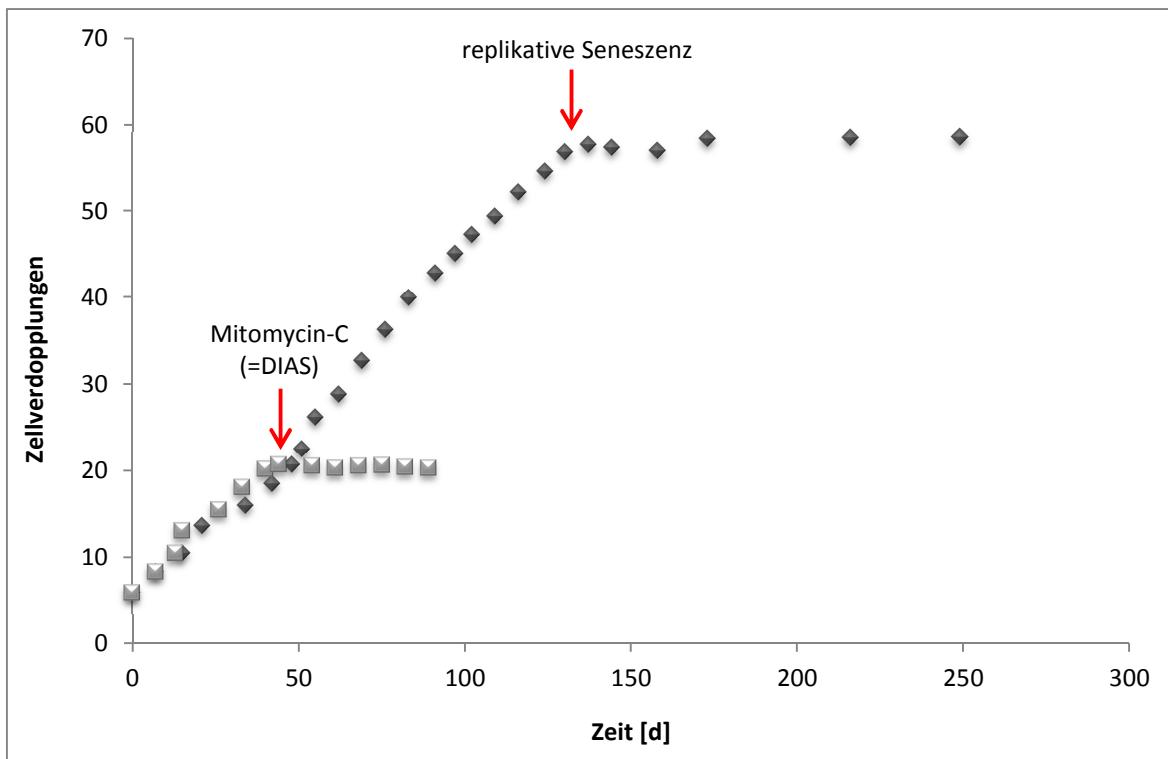


Abbildung 3.5: Zeitliche Entwicklung der Populationsverdopplungen Um replikativ senescente Zellen zu erhalten, wurden dermale Fibroblasten über einen Zeitraum von 250 Tagen seriell subkultiviert. Zur Induktion einer beschleunigten Seneszenz wurden mitotische Fibroblasten in der exponentiellen Phase mit Mitomycin-C (200 nM, 2 x 24 h) behandelt (DIAS). Durch die Berechnung der Zellverdopplungen (CPD) wurde das Wachstumsverhalten dokumentiert.

Zu Beginn der Wachstumskurve proliferierten die Fibroblasten exponentiell und teilten sich mit einer PD von durchschnittlich 3/Woche. Die exponentielle Phase ging nach ca. 170 Tagen und einer Gesamtzahl von 57 Populationsverdopplungen in die stationäre Phase über, welche durch einen Abfall der PD von 3/Woche in der exponentiellen Phase auf 0,02/Woche in der stationären Phase gekennzeichnet war. Dieser Stillstand der Proliferation nach ca. 170 Tagen kennzeichnete bei den verwendeten Fibroblasten den Beginn der replikativen Seneszenz. Durch die Behandlung mit Mitomycin-C konnte ein dauerhafter Wachstumsstopp vorzeitig induziert werden, bei dem die PD von 3/Woche auf 0,08/Woche abfiel. Die MMC-Behandlung führte bei den mitotischen Fibroblasten zu einem sofortigen Wachstumsstopp, welcher über einen Zeitraum von zwei Monaten beobachtet wurde und somit dauerhaft aufrechterhalten werden konnte. Mit Hilfe der

Wachstumskurve konnten erste Hinweise bezüglich eines dauerhaften Proliferationsstopps gewonnen werden, welcher durch MMC ausgelöst wurde und sich zeitlich deutlich von der replikativen Seneszenz abgrenzt (s. Abbildung 3.5).

Die nächsten Experimente dienten dazu, die Inhibition der Proliferation mit Hilfe des BrdU-Tests zu bestätigen. Der Einbau des Thymidinanalogs Bromodesoxyuridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA kann als direkter Ausdruck der proliferativen Kapazität der Zellen gesehen werden.

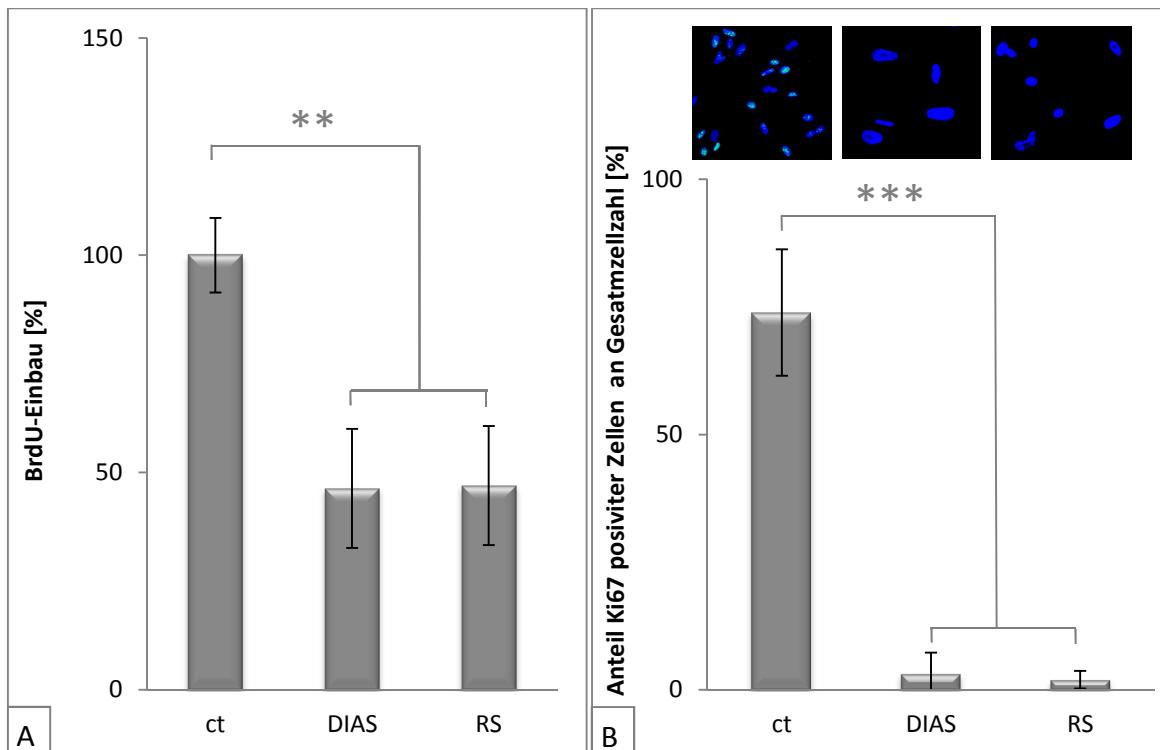


Abbildung 3.6: Proliferatives Potential mitotischer und senescenter Fibroblasten Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 200 nM Mitomycin-C (2 x 24 h) behandelt (DIAS) und deren proliferative Kapazität bei gleicher Zellzahl mit Hilfe des (A) BrdU-Assays und (B) der Ki67-Färbung im Vergleich zu replikativ seneszenten Fibroblasten (RS) und mitotischen Fibroblasten (ct) untersucht. (A) Die Extinktion der mitotischen Fibroblasten wurde auf 100% gesetzt und die Messwerte der seneszenten Fibroblasten darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n=3). (B) In Bezug auf die Gesamtzellzahl wurde der Anteil proliferierender Zellen anhand einer positiven Ki67-Färbung ermittelt. Mitotische Fibroblasten dienten als Kontrolle (ct). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (n=3), sowie repräsentative Aufnahmen. Sowohl der BrdU-Assay, als auch die Ki67-Färbung erfolgten fünf Tage nach der MMC-Behandlung. (**p<0,01; ***p<0,001; One-way-Anova)

In Abbildung 3.6 zeigt sich deutlich eine Korrelation bezüglich des Proliferationsverhaltens von replikativ seneszenten (RS) und MMC-induziert seneszenten (DIAS) Fibroblasten. Beide Fibroblastentypen zeigten im BrdU-Assay mit weniger als 50% proliferativer Aktivität einen signifikanten Unterschied bezüglich des Proliferationsverhaltens im Vergleich zu den unbehandelten mitotischen Kontrollzellen (ct).

Zur Bestätigung der Ergebnisse des BrdU- Assays, wurde das Protein Ki67 untersucht, dessen Expression im Zellkern in mitotischen, nicht aber in ruhenden, seneszenten Zellen zu finden ist. Dieser Umstand macht Ki67 zu einem guten Marker, um die proliferative Aktivität einer Zellpopulation zu untersuchen. Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden sowohl mitotische, unbehandelte Fibroblasten, als auch senescente Fibroblasten (DIAS und RS) auf Objekträgern kultiviert. Für die quantitative Auswertung wurde die Gesamtzellzahl mit Hilfe der DAPI-Färbung bestimmt und der relative Anteil an Ki67-positiven Zellen gezählt. In Abbildung 3.6 sind repräsentative Aufnahmen der Fibroblasten von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Die Ki67-Färbung zeigte sowohl bei den replikativ seneszenten (RS), als auch bei den MMC-induziert seneszenten (DIAS) Zellen eine deutliche Abnahme der Ki67-Expression, im Vergleich zu den mitotischen Fibroblasten (ct). Beide seneszenten Zelltypen zeigten einen signifikanten Rückgang der Proliferation auf unter 10%, im Vergleich zu einer 80%igen Proliferation bei den mitotischen Fibroblasten.

Die Ergebnisse der Wachstumskurve, des BrdU-Einbaus und der Ki67-Färbung verdeutlichen bezüglich des Proliferationsstopps erste gemeinsame Merkmale zwischen replikativer und durch Mitomycin-C induzierter Seneszenz (DIAS).

3.2.2 Morphologische Veränderungen bei seneszenten Fibroblasten

Mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz bei Fibroblasten ist eine Zunahme der Zellgröße beschrieben (Mitsui & Schneider, 1976). Um festzustellen, ob sowohl bei den MMC-induziert beschleunigt seneszenten (DIAS), als auch bei den replikativ seneszenten (RS) Fibroblasten eine Zunahme der Zellgröße zu beobachten ist, wurde die durchschnittliche Zellgröße der Gesamtpopulation bestimmt. Dazu wurden mitotische Kontrollzellen und senescente Zellen (DIAS und RS) mit *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt. Zur mikroskopischen Auswertung wurden von jedem unabhängigen Versuch jeweils drei Bildausschnitte pro Zelltyp ausgewertet, von denen jeweils die Größe von fünf Zellen exemplarisch mit Hilfe der Software *ImageJ* vermessen wurden (s. Kapitel 2.2.12). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

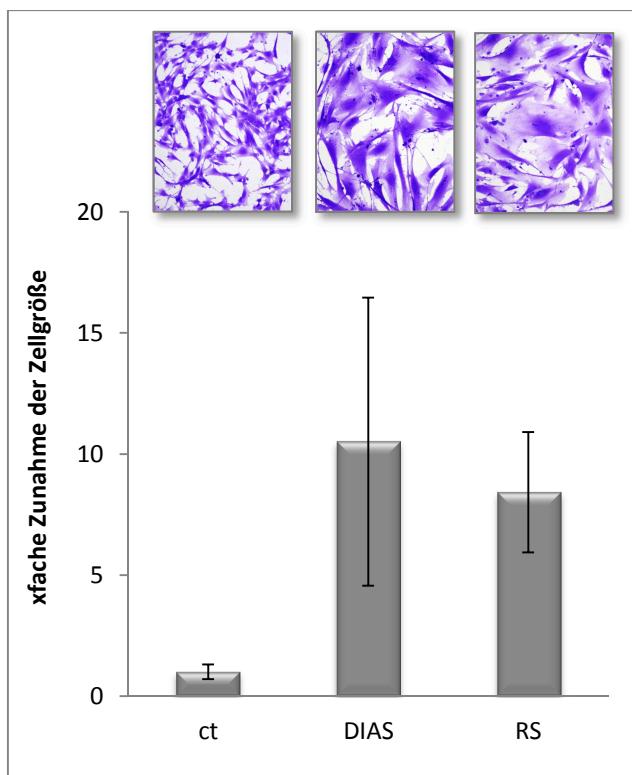


Abbildung 3.7: Morphologie und Zellgröße mitotischer und senescenter Fibroblasten Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 200 nM Mitomycin-C (2 x 24 h) behandelt (DIAS) und die Zellgröße im Vergleich zu replikativ seneszenten Fibroblasten (RS) und mitotischen Fibroblasten (ct) untersucht. Die Zellgröße der mitotischen Fibroblasten wurde auf 1 normiert und die der seneszenten Fibroblasten darauf bezogen. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen (20-fache Vergrößerung), sowie die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Die Zellgröße ist sowohl bei den replikativ gealterten Fibroblasten, als auch bei den MMC-induziert seneszenten Fibroblasten im Vergleich zu den mitotischen Fibroblasten erhöht (s. Abbildung 3.7). Die Fläche der RS-Fibroblasten ist um den Faktor 8 ± 2 und die der DIAS-Fibroblasten um den Faktor 10 ± 5 deutlich erhöht im Vergleich zu den mitotischen Fibroblasten. Diese Zunahme der Zellgröße wird bei Fibroblasten mit zunehmender Anzahl durchlaufener Zellteilungen durch eine Veränderung der Zellmorphologie begleitet (Bayreuther, 1988). Die mitotischen Fibroblasten zeichnen sich durch eine spindelförmige Zellform, mehrheitlich mit Ausbuchtungen rund um den Zellkern aus. Typische Kennzeichen senescenter Fibroblasten ist eine 10 bis 20-fache Vergrößerung der Zelloberfläche mit großem, flachem und ovalem Zellkern. Sowohl die RS- als auch die DIAS-Fibroblasten zeigten die morphologischen Merkmale senescenter Fibroblasten, welche von einer pleiomorphen Zellform begleitet wurden (s. Abbildung 3.7).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass durch die Behandlung mit Mitomycin-C anhand der starken Zunahme der Zellgröße und einer Veränderung der Zellmorphologie ergänzend zum Wachstumsstopp, weitere Merkmale replikativer Seneszenz induziert werden konnten.

3.2.3 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in seneszenten Fibroblasten

Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) spielen gemäß der „Freien-Radikal-Theorie“ (Harman, 1956) eine zentrale Rolle bei der Alterung und stellen daher ein weiteres wichtiges Merkmal senescenter Zellen dar. Die Analyse des ROS-Gehalts wurde mit Hilfe der DCF-Messung (s. Kapitel 2.2.9) durchgeführt.

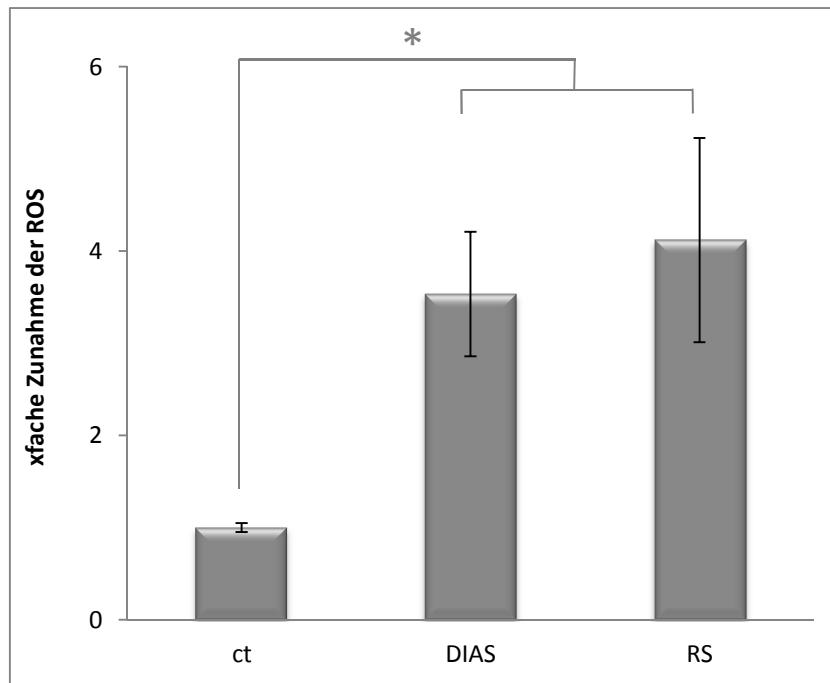


Abbildung 3.8: Reaktive Sauerstoffspezies in seneszenten Zellen Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 200 nM Mitomycin-C (2 x 24 h) behandelt und der Gehalt an intrazellulären ROS bei gleicher Zellzahl fünf Tage nach der MMC-Behandlung (DIAS) mit Hilfe der DCF-Messung im Vergleich zu replikativ seneszenten Fibroblasten (RS) untersucht. Unbehandelte mitotische Fibroblasten dienten als Kontrolle (ct). Der ROS-Gehalt der mitotischen Fibroblasten wurde auf 1 normiert und der ROS-Gehalt der seneszenten Zellen darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). (* $p<0,05$; One-way-Anova)

Abbildung 3.8 zeigt deutlich, dass der Gehalt an intrazellulären ROS im Vergleich zu den mitotischen Fibroblasten, sowohl bei den replikativ seneszenten (RS) um den Faktor $4,1 \pm 1,1$, als auch bei den MMC-induziert seneszenten (DIAS) Fibroblasten um den Faktor $3,5 \pm 0,7$ erhöht wurde und sich somit signifikant unterschied. Die Analyse des intrazellulären ROS-Gehalts fünf Tage nach der Behandlung zeigte ein weiteres gemeinsames Merkmal zwischen RS und DIAS.

3.2.4 β -Galaktosidase-Aktivität in seneszenten Fibroblasten

Für replikativ senescente Fibroblasten wird die Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase als Biomarker beschrieben (Dimri et al., 1995). β -Galaktosidase ist ein lysosomales Enzym, welches im Alter aufgrund stark vergrößerter Lysosomen bei einem suboptimalen pH-Wert von 6.0 nachweisbar ist. In diesem Fall spricht man von einer Seneszenz assoziierten- β -Galaktosidase-Aktivität (SA- β -Gal-Aktivität).

Zur Bestimmung der SA- β -Gal-Aktivität wurden die DIAS-Fibroblasten nach der Behandlung mit Mitomycin-C für 21 Tage weiter kultiviert, damit es zu einer Akkumulation des Enzyms kam. Die Enzymaktivität wurde durch eine Enzym-Substrat-Farbreaktion nachgewiesen (s. Kapitel 2.2.11), welche durch eine sichtbare Blaufärbung der Zellen die erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität anzeigt. Abbildung 3.9 zeigt repräsentative Aufnahmen der mitotischen, der DIAS- und der RS-Fibroblasten.



Abbildung 3.9: SA- β -Galaktosidase-Aktivität senescenter Fibroblasten Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 200 nM Mitomycin-C (2 x 24 h) behandelt (DIAS) und die Aktivität der SA- β -Galaktosidase nach 21 Tagen im Vergleich zu replikativ seneszenten Fibroblasten (RS) untersucht. Unbehandelte mitotische Fibroblasten dienten als Kontrolle (ct). Die Fibroblasten wurden auf Objektträgern kultiviert und gefärbt. Durch einen blauen Niederschlag wurde die Aktivität der SA- β -Galaktosidase sichtbar. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen (20-fache Vergrößerung) aus drei unabhängigen Versuchen (n=3).

Abbildung 3.9 zeigt deutlich, dass ausschließlich die seneszenten Fibroblasten einen blauen Farbniederschlag und somit eine erhöhte SA- β -Galaktosidase-Aktivität besitzen. Der Anteil an Zellen mit erhöhter Aktivität ist sowohl bei den replikativ seneszenten, als auch bei den MMC-induziert seneszenten Fibroblasten vergleichbar. Die mitotischen Fibroblasten hingegen zeigten keinen blauen Farbniederschlag, somit konnte keine erhöhte Aktivität der SA- β -Galaktosidase in mitotischen Fibroblasten nachgewiesen werden.

3.2.5 Effekte von Seneszenz auf den Zellzyklus

Bisherige Analysen des Zellzyklus haben gezeigt, dass Fibroblasten nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert sind (Stein & Dulic, 1995). Der Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus wird durch den G1-

Kontrollpunkt reguliert, bei dem das Tumorsuppressorprotein p53 eine hemmende Rolle spielt. Mit Hilfe des Westernblots wurde untersucht, ob die beobachtete Inhibition der Proliferation von einer veränderten Aktivität des Proteins p53 begleitet wurde. Die Phosphorylierung von p53 ist ein Marker für die Aktivität des Proteins und kann eine Verschiebung der Zellzyklusphasen auslösen (s. Abbildung 1.3). Der Zellzyklus wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie genauer untersucht. Dazu wurden mitotische (ct), replikativ senescente (RS) und MMC-induziert senescente (DIAS) Fibroblasten mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und ermöglicht dadurch eine quantitative Bestimmung der Nukleinsäuren, welche charakteristisch für die einzelnen Zyklusphasen ist.

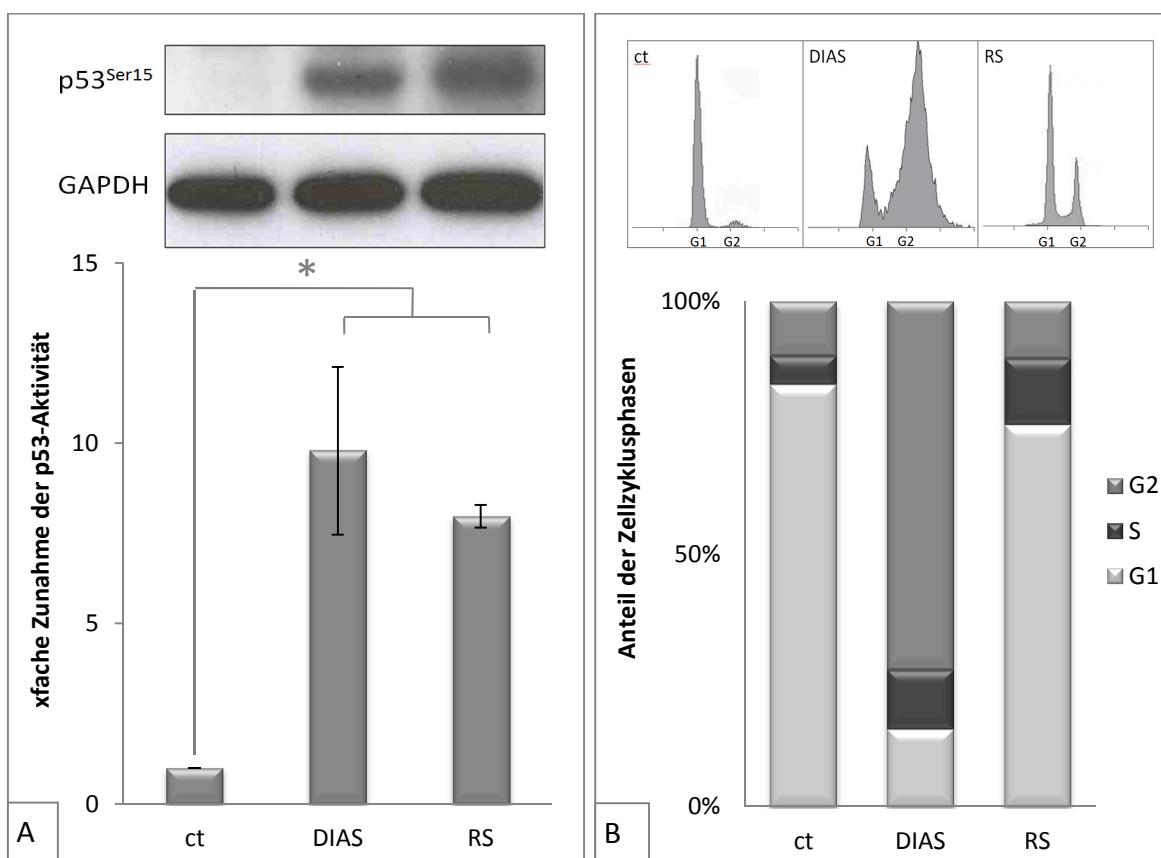


Abbildung 3.10: Zellzyklusregulation in seneszenten Fibroblasten Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 200 nM Mitomycin-C (2 x 24 h) behandelt (DIAS) und der Zellzyklus fünf Tage nach der Behandlung im Vergleich zu replikativ seneszenten (RS) und mitotischen (ct) Fibroblasten untersucht. **(A)** Die Aktivität von p53 wurde mit Hilfe des Westernblots fünf Tage nach der Behandlung untersucht. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot von drei unabhängigen Experimenten (n=3), sowie die Mittelwerte ± Standardabweichung der gemessenen Bandenintensitäten nach der Normierung auf GAPDH. Die p53-Aktivität der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 normiert und die der seneszenten Fibroblasten darauf bezogen. **(B)** Die Fixierung der Zellen zur Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte fünf Tage nach der MMC-Behandlung. Die Zellzyklusphasen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte mitotische Fibroblasten (ct). Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm von drei unabhängigen Experimenten (n=3), sowie die Mittelwerte der prozentualen Verteilung der Zellzyklusphasen. (*p<0,05; One-way-Anova).

Die Analyse des Zellzyklus zeigte eine typische Verteilung der Zellzyklusphasen bei den mitotischen Fibroblasten. In der G1-Phase befanden sich 83%, in der S-Phase 6% und in der G2-Phase 11%. Durch die Behandlung der mitotischen Fibroblasten mit Mitomycin-C (DIAS), konnte fünf Tage nach der Behandlung eine Umverteilung der Zellzyklusphasen analysiert werden, sodass 14% der behandelten Fibroblasten in der G1-Phase, 11% in der S-Phase und 68% in der G2-Phase waren. Somit wurde durch die MMC-Behandlung ein G2-Arrest induziert, welcher bei den replikativ seneszenten Fibroblasten (RS) nicht detektiert werden konnte. Für die RS ergab sich folgendes Bild: 72% der Zellen verharrten in der G1-Phase, 13% in der S-Phase und 11% in der G2-Phase. Trotz des Zellzyklusarrests beider seneszenten Zelltypen (RS und DIAS) konnte ein Unterschied in den Zellzyklusarrest-Phasen nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass sowohl ein G1-Arrest, als auch ein G2-Arrest durch die Aktivierung von p53 ausgelöst werden kann (Agarwal et al., 1995), wurde mit Hilfe eines Westernblots die Aktivität von p53 untersucht.

Die Aktivität von p53 war sowohl bei den replikativ seneszenten (RS), als auch bei den durch MMC-Behandlung induziert seneszenten Fibroblasten (DIAS) signifikant erhöht. Durchschnittlich ergab sich eine signifikante Erhöhung des an Serin-15 phosphorylierten Proteins um das 9,8-fache bei den DIAS-Fibroblasten ($\pm 2,3$) und das 7,9-fache bei den replikativ seneszenten Zellen ($\pm 0,32$). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der Zellzyklusarrest auf einen ähnlichen Mechanismus zurück zu führen ist. p53 wird über Phosphorylierung aktiviert und initiiert in Folge dessen unterschiedliche Signalwege, welche unter anderem zu dem bereits beobachteten Wachstumsarrest führen können. Der auslösende Mechanismus für den Wachstumsarrest ist sowohl bei den replikativ seneszenten, als auch bei den MMC-induziert seneszenten Fibroblasten auf eine Aktivierung von p53 zurückzuführen.

3.2.6 Einfluss von Mitomycin-C auf die Expression von Matrix-Metalloproteinase-1

Da der zweite Teil dieser Arbeit die Entwicklung eines Hautalterungsmodells umfasste, lag ein besonderes Augenmerk auf der Synthese kollagenabbauender Enzyme senescenter Fibroblasten. Replikativ gealterte Fibroblasten zeichnen sich durch die vermehrte Produktion von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) aus (Coppe et al., 2010). Diese vermehrte Produktion an MMP ist eine der Hauptursachen für die Faltenbildung gealterter Haut und stellt somit einen wichtigen Ansatz für mögliche Anti-Aging-Rohstoffe dar (Griffiths, 2001). Um festzustellen, ob durch die MMC-Behandlung ein ähnliches Expressionsmuster bezüglich der Matrix-Metalloproteinasen auftritt, wie bei replikativ gealterten Fibroblasten, wurden die Überstände der jeweiligen Fibroblasten analysiert.

Dazu wurden die Überstände (s. Kapitel 2.2.6) von mitotischen Fibroblasten mit denen von replikativ seneszenten und MMC-induziert seneszenten Fibroblasten verglichen und mit Hilfe des „*Quantakine ELISA Human Pro-MMP1*“ die Konzentration an MMP-1 gemessen und auf die jeweilige Zellzahl bezogen.

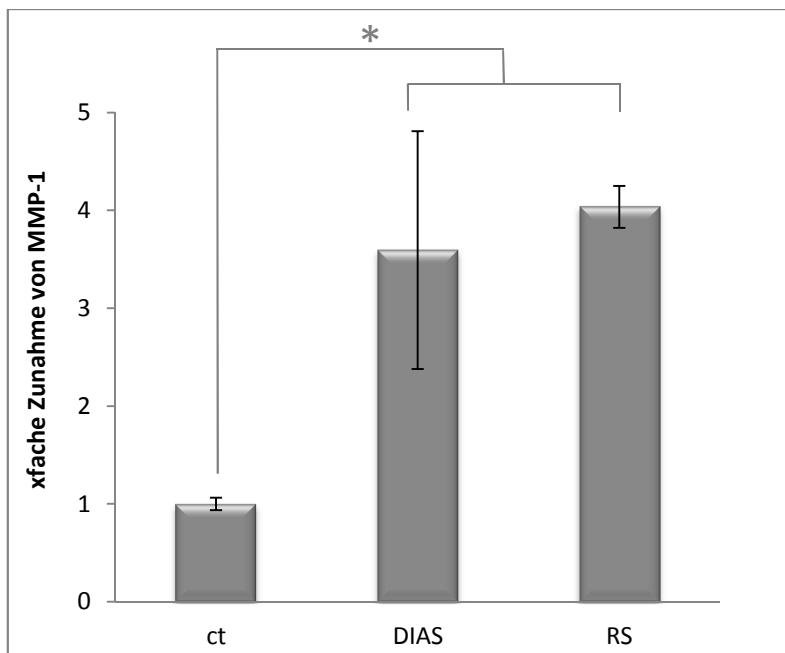


Abbildung 3.11: Freisetzung von Pro-MMP-1 in Fibroblasten Subkonfluente Fibroblasten wurden mit 200 nM Mitomycin-C (2 x 24 h) behandelt (DIAS) und die Konzentration an extrazellulärem MMP-1 fünf Tage nach der Behandlung mit Hilfe eines ELISA's im Vergleich zu replikativ seneszenten Fibroblasten (RS) untersucht. Unbehandelte mitotische Fibroblasten dienten als Kontrolle (ct). Die Konzentration an Pro-MMP-1/Zelle der Kontrollzellen wurde auf 1 normiert und die der seneszenten Zellen darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen ($n=3$). (* $p<0,05$; One-way-Anova)

Abbildung 3.11 zeigt eine signifikante Zunahme der Freisetzung von Pro-MMP-1, sowohl bei den replikativ gealterten Fibroblasten (RS), als auch bei den DIAS-Fibroblasten. Bei den DIAS-Fibroblasten konnte eine 3,6-fache ($\pm 1,2$) und bei den RS-Fibroblasten eine 4-fache ($\pm 0,2$) Erhöhung der Expression von MMP-1 gemessen werden. Diese Ergebnisse bestätigen die vorherigen Ergebnisse, dass durch die Behandlung mit Mitomycin-C eine beschleunigte und dauerhafte Seneszenz in den Fibroblasten induziert werden kann, welche die replikative Seneszenz imitiert.

3.2.7 Zusammenfassung der Untersuchungen zur Alterung im Zeitraffer

Durch die Langzeitkultivierung der Fibroblasten ging die Verdopplungsrate kontinuierlich zurück und es kam nach etwa 170 Tagen bei einer CPD von 60 zu einem Stillstand der Proliferation und einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase, welcher mit einer veränderten Morphologie der Zelle und einer erhöhten Aktivität der SA- β -Galaktosidase einherging. Parallel zum Rückgang der Proliferation veränderte sich der Fibroblast von einer

spindelförmigen mitotischen Zelle hin zu einer stark vergrößerten Zellform, welche den seneszenten Phänotyp darstellt. Der Rückgang der Proliferation ging ebenfalls mit einem Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies, einer erhöhten Aktivität des Proteins p53 und einer Steigerung der Expression an Matrix-Metalloproteinase-1 einher. Aufgrund der Tatsache, dass die replikative Seneszenz ein sehr zeitaufwendiger Prozess ist, wurde untersucht, inwiefern durch die Behandlung mit Mitomycin-C eine beschleunigte Seneszenz induziert werden konnte, welche sich durch gemeinsame Merkmale zwischen RS und DIAS auszeichnet und so eine Möglichkeit bietet, den Alterungsprozess im Zeitraffer zu untersuchen.

Die Behandlung der Fibroblasten mit Mitomycin-C führte ebenfalls zu einer dauerhaften Inhibition des Zellzyklus, im Gegensatz zu replikativ seneszenten Fibroblasten (G1-Arrest) zeigten die MMC-behandelten Zellen jedoch einen Zellzyklusstop in der G2-Phase. Ebenso wie bei den replikativ seneszenten Fibroblasten, konnte durch die MMC-Behandlung neben einer veränderten Morphologie auch eine erhöhte SA- β -Galaktosidase-Aktivität, sowie ein Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen werden. Gleichzeitig mit der Zellzyklusinhibition kam es außerdem zu einer vergleichbaren Zunahme der p53-Aktivität und der Konzentration an Pro-MMP-1 in den DIAS-Fibroblasten.

Die Ergebnisse machen deutlich, dass durch die Behandlung mit Mitomycin-C wesentliche Merkmale replikativer Seneszenz induziert werden konnten, und somit Mitomycin-C ein geeignetes Mittel darstellt, um eine beschleunigte und dauerhafte Seneszenz zu induzieren, welche die replikative Seneszenz imitiert.

Tabelle 3.2: Übersicht der analysierten Merkmale replikativer und MMC-induzierter Seneszenz

Merkmal	RS	DIAS
Proliferationsstop	✓	✓
Vergrößerte Morphologie	✓	✓
Erhöhter ROS-Gehalt	✓	✓
SA-β-Galaktosidase-Aktivität	✓	✓
Aktives p53	✓	✓
Zellzyklusstop	✓	✓
Erhöhte [MMP-1]	✓	✓

3.3 Untersuchungen zum Aufbau eines Hautalterungsmodells

3.3.1 Histologische Veränderungen *in vivo* gealterter Haut

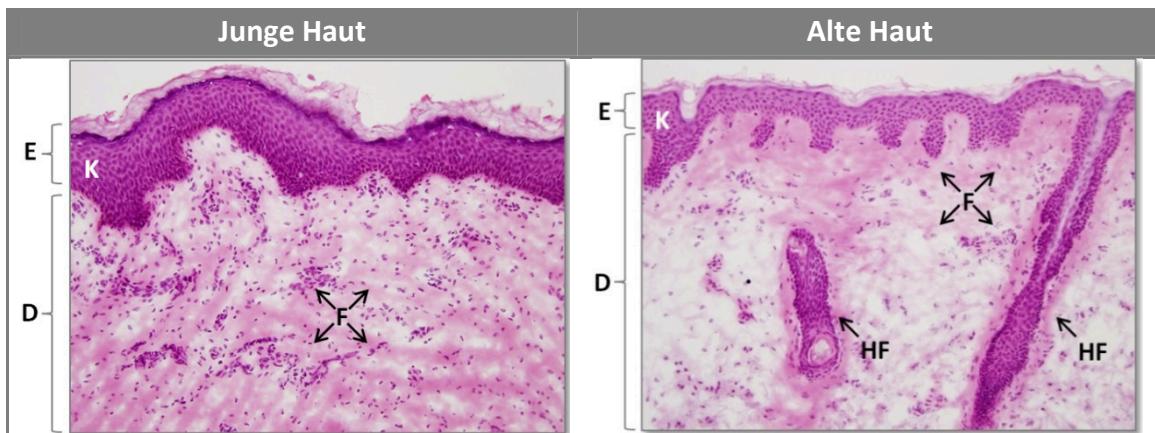


Abbildung 3.12: Histologische Veränderungen *in vivo* gealterter Haut Paraffinschnitte einer jungen Haut (Vorhaut eines Dreijährigen) und einer alten Haut (Facelift einer 67-Jährigen) wurden für die histologische Begutachtung mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch begutachtet. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme (20-fache Vergrößerung) aus drei unabhängigen Versuchen ($n=3$). E: Epidermis, D: Dermis, F: Fibroblasten, K: Keratinozyten, HF: Haarfollikel

Alternde Haut zeigt im Laufe des Lebens eine Abnahme der Dicke aller Hautschichten. Die Gesamtdicke der Epidermis beispielsweise nimmt bei gealterter Haut ab, wobei das *stratum corneum* unverändert bleibt. Die dermoepidermale Junctionzone (Reteleiste) ist abgeflacht, wodurch es zu einer Ablösung der Epidermis von der Dermis kommen kann, sodass die Verletzlichkeit der Haut im Alter zunimmt (Gilchrest & Krutmann, 2006). Die Dicke der Dermis nimmt aufgrund von Veränderungen der Matrixproteine ebenfalls ab. Eine der Hauptursachen dafür ist die veränderte Zusammensetzung von Kollagen- und Elastinfasern. Das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von Kollagen und Elastin verschiebt sich mit zunehmendem Alter zum Abbau hin. Als Folge davon ist das Kollagen weniger stark quervernetzt, wodurch die Haut weniger straff ist. Abbildung 3.12 zeigt deutlich einige dieser charakteristischen Veränderungen *in vivo* gealterter Haut. Die Dicke der Epidermis (E) der gealterten Haut ist verringert und die Kollagenstruktur der Dermis (D) ist aufgelockert und weniger stark organisiert im Vergleich zur jungen Haut. Diese zeigt eine wesentlich dicke Epidermis und eine kompakte Kollagenstruktur. Außerdem ist der Anteil an Fibroblasten (F) in der gealterten Dermis deutlich geringer als in der jungen Dermis.

3.3.2 Entwicklung eines dreidimensionalen Hautalterungsmodells

Ziel der Entwicklung eines Hautalterungsmodells war es, aus humanen dermalen Fibroblasten und Keratinozyten *in vitro* ein mehrschichtiges Hautäquivalent aufzubauen, welches typische Merkmale einer *in vivo* gealterten Haut zeigt. Der erste Versuchsaufbau beschäftigte sich damit, senescente Fibroblasten in die Matrix einzusäen, um so ein Hautmodell mit gealterten Fibroblasten aufzubauen. Die histologischen Ergebnisse sind in Abbildung 3.13 dargestellt.

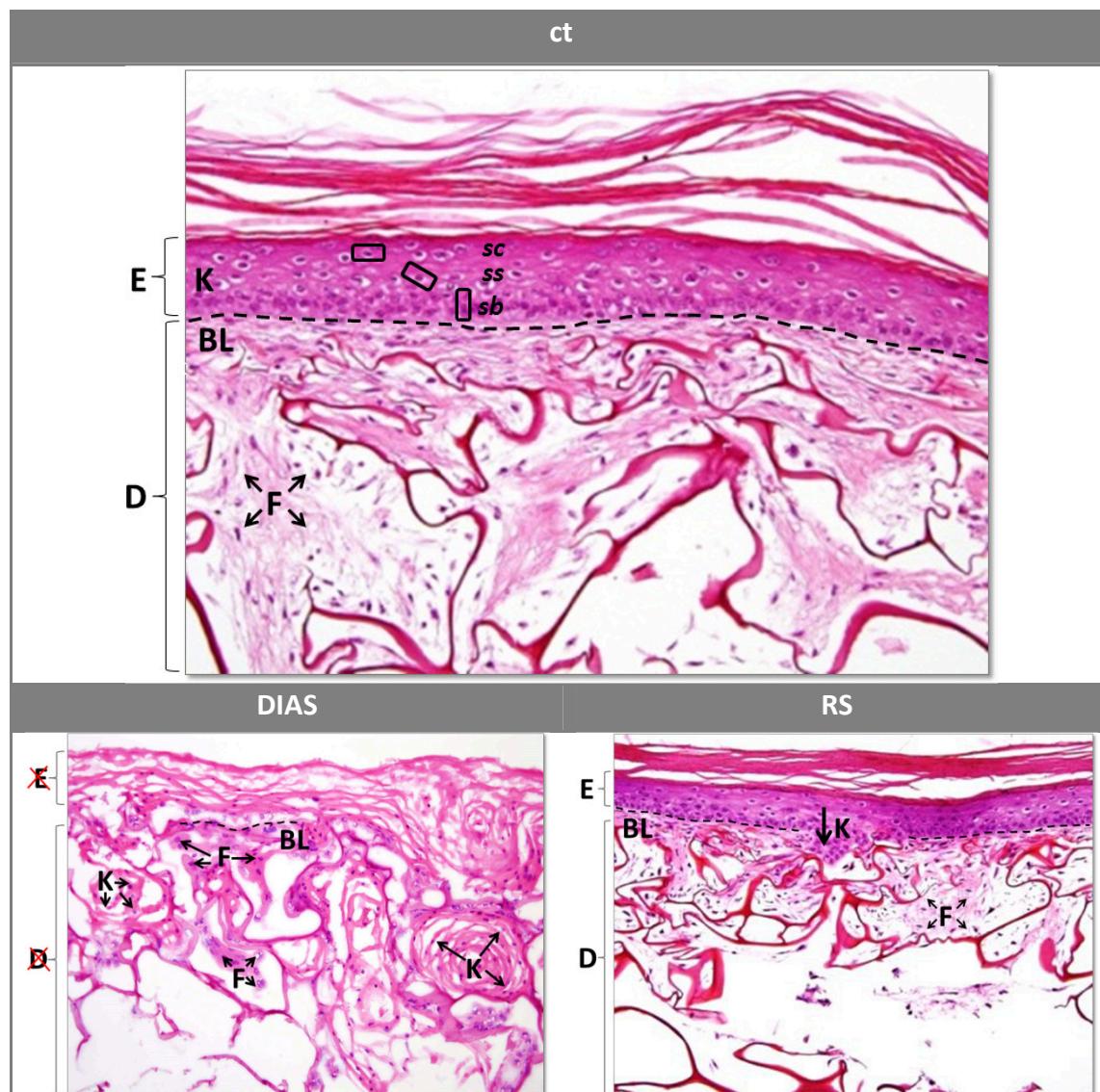


Abbildung 3.13: Histologische Schnittpräparate Nach der direkten Einsaat mitotischer (ct) bzw. senescenter Fibroblasten (DIAS + RS) wurden Paraffinschnitte nach 21 Tagen in der ALI-Phase für die histologische Begutachtung mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch begutachtet. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme (20-fache Vergrößerung) von drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). E: Epidermis, D: Dermis, F: Fibroblasten, K: Keratinozyten, BL: Basallamina, sb: stratum basale, ss: stratum spinosum, sc: stratum corneum

Abbildung 3.13 zeigt die histologischen Schnittpräparate von Ganzhautmodellen, die mit mitotischen (ct) und seneszenten (DIAS und RS) Fibroblasten hergestellt wurden. Das

junge Hautmodell mit den mitotischen Fibroblasten (ct) zeigt den typischen zweischichtigen Aufbau der Haut bestehend aus Epidermis (E) und Dermis (D). Es ist eine klare Trennung dieser beiden Hautkompartimente durch eine Basallamina (BL) erkennbar. Die Epidermis zeichnet sich durch den charakteristischen mehrschichtigen Aufbau aus, welcher beginnend mit dem *stratum basale (sb)* im unteren Bereich, über das *stratum spinosum (ss)* hin zum *stratum corneum (sc)* im oberen Bereich der Epidermis ausdifferenziert. Ein derartiger Aufbau ist weder bei der Einsaat von MMC-induziert seneszenten Fibroblasten (DIAS), noch bei der Einsaat von replikativ seneszenten Fibroblasten (RS) zu erkennen. In beiden Modellen (s. Abbildung 3.14, Abbildung 3.13) sind die Hautkompartimente Epidermis und Dermis nicht durch eine Basallamina voneinander getrennt. Die Matrix wurde nicht ausreichend von Fibroblasten bewachsen, sodass die aufgesäten Keratinozyten bis in den dermalen Bereich eindringen konnten und dort stratifizierten. Der mehrschichtige Aufbau der Epidermis ist somit nicht gegeben und die Histologie spiegelt nicht die *in vivo* Situation wieder. Die direkte Einsaat von seneszenten Fibroblasten (s. Kapitel 2.2.20) stellt somit keine Möglichkeit dar, um ein Hautalterungsmodell aufzubauen. Aufgrund der Tatsache, dass ein Ganzhautmodell *in vitro* lediglich über einen Zeitraum von maximal sechs Wochen kultiviert werden kann, stellt eine Langzeitkultivierung der Fibroblasten innerhalb der Matrix bis zum Erreichen der replikativen Seneszenz nach rund 200 Tagen (s. Abbildung 3.5) keine Option zum Aufbau eines Hautalterungsmodells dar. Die Entwicklung eines Hautalterungsmodells auf Grundlage replikativ gealterter Fibroblasten ist somit nicht möglich.

Da wesentliche Merkmale replikativer Seneszenz jedoch durch die Behandlung mit Mitomycin-C im Zeitraffer induziert werden konnten (s. Kapitel 3.2), wurde in den nächsten Versuchsansätzen überprüft, ob durch die Behandlung mit Mitomycin-C das Hautmodell vorzeitig gealtert werden kann. Dazu wurden zunächst exponentiell wachsende, mitotische Fibroblasten in die Matrix eingesät und in der Matrix mit Mitomycin-C behandelt (s. Kapitel 2.2.20). Um einen negativen Effekt der MMC-Behandlung auf die Keratinozyten auszuschließen, wurden die Fibroblasten zunächst für zwölf Tage mit Medium überdeckt (submerse Bedingungen) kultiviert und anschließend zweimal für 24 Stunden mit Mitomycin-C (200 nM) behandelt, bevor die Keratinozyten auf die Fibroblasten gesät wurden. Während der zwölfjährigen Kultivierung hatten die Fibroblasten ausreichend Zeit, um sich zu vermehren und einen gleichmäßigen Abschluss der Dermis zu bilden, sodass die Keratinozyten nicht in die Matrix eindringen und die Basallamina als Grenzschicht zwischen Epidermis und Dermis aufbauen konnten. Nach der Aufsaat der Keratinozyten wurden diese für 48 Stunden submers kultiviert und anschließend an die Luft-Medium-Grenze (**Air-Liquid-Interphase = ALI**) angehoben. Durch die Kultivierung für 21 Tage an der Luft-Medium-Grenze wurde die Differenzierung der Keratinozyten gewährleistet, sodass sich eine komplett ausdifferenzierte Epidermis aufbauen konnte.

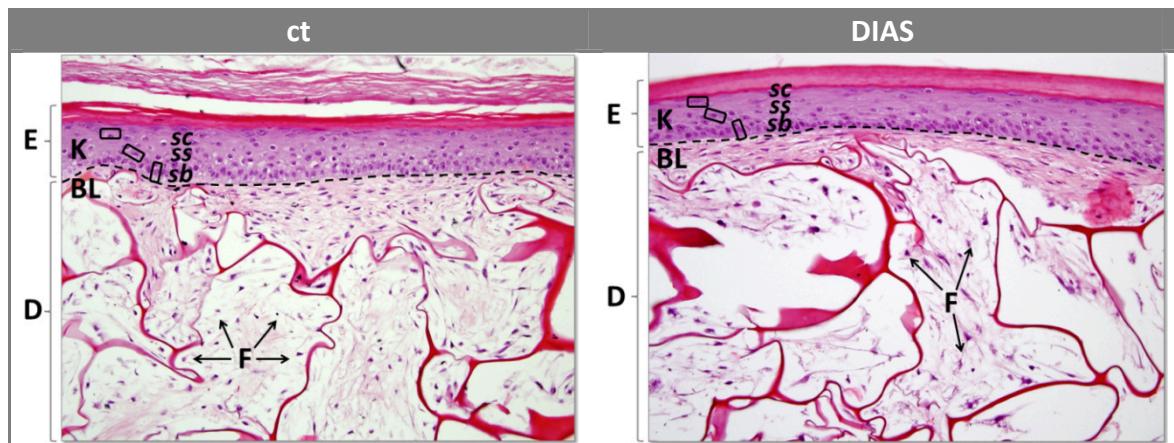


Abbildung 3.14: Histologie der optimierten Herstellung eines Hautalterungsmodells Nach der Einsaat mitotischer Fibroblasten wurden diese entweder mit Mitomycin-C behandelt (DIAS) oder nicht behandelt (ct). Die Paraffinschnitte wurden nach 21 Tagen an der Luft-Medium-Grenze angefertigt und für die histologische Begutachtung mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (HE-Färbung) und lichtmikroskopisch begutachtet. Aus drei unabhängigen Ansätzen mit je drei unbehandelten (ct) und drei MMC-behandelten (DIAS) Modellen ($n=3$), wurde eine repräsentative Aufnahme (20-fache Vergrößerung) abgebildet. E: Epidermis, D: Dermis, K: Keratinozyten, F: Fibroblasten, BL: Basallamina, sb: stratum basale, ss: stratum spinosum, sc: stratum corneum

Die histologischen Ergebnisse in Abbildung 3.14 zeigten deutlich, dass durch die Einsaat mitotischer Fibroblasten in die Matrix mit anschließender MMC-Behandlung, die wichtigsten Hautschichten bestehend aus Epidermis (E) und Dermis (D) ausgebildet wurden. Die Epidermis beider Modelle zeichnet sich durch ihren mehrschichtigen Aufbau, bestehend aus *stratum basale* (sb), *stratum spinosum* (ss), *stratum granulosum* und *stratum corneum* (sc) aus und ist durch die gebildete Basallamina (BL) räumlich von der Dermis getrennt. Die Dermis der jungen Hautmodelle mit mitotischen Fibroblasten (ct) ist nahezu komplett mit Fibroblasten (F) besiedelt, sodass keine freien Zwischenräume erkennbar sind. Die Dermis der alten Hautmodelle mit MMC-induziert seneszenten Fibroblasten (DIAS) hingegen zeigt eine deutlich weniger dichte Besiedlung der Matrix mit freien Zwischenräumen. Die MMC-induziert seneszenten Fibroblasten sind deutlich weniger dicht gepackt und weisen eine vergrößerte Morphologie auf. Des Weiteren ist die Kollagenstruktur bei den MMC-behandelten Hautmodellen aufgelockert im Vergleich zu einer sehr kompakten Kollagenstruktur bei den unbehandelten Hautmodellen. Somit sind bereits wesentliche histologische Merkmale einer *in vivo* gealterten Haut vorzufinden. In den weiteren Untersuchungen wurde analysiert, inwiefern durch die Behandlung mit Mitomycin-C der Zellen innerhalb der Matrix die gleichen Seneszenz-Marker induziert wurden, welche bereits in Monolayer-Experimenten im Vergleich zu replikativ seneszenten Fibroblasten etabliert wurden (s. Kapitel 3.2).

3.3.3 Überprüfung von Seneszenz-Markern an Fibroblasten aus dem Hautmodell

Um feststellen zu können, ob die Behandlung der Fibroblasten mit Mitomycin-C in der Matrix ebenfalls zu einer beschleunigten Induktion von Seneszenz-Markern geführt hat, wie es in Monolayer-Experimenten beobachtet werden konnte, wurden die Fibroblasten durch Kollagenaseverdau aus der Dermis herausgelöst (s. Kapitel 2.2.21) und unterschiedliche Seneszenzmarker wie z.B. die Abnahme der Proliferation, eine veränderte Zellmorphologie, ein Anstieg an ROS, sowie eine erhöhte Aktivität von SA- β -Galaktosidase, p53 und MMP-1 untersucht.

3.3.3.1 Vergleich des Proliferationsverhaltens isolierter Fibroblasten

Bereits die histologischen Schnittpräparate (s. Abbildung 3.14) deuten auf einen Proliferationsstop der Fibroblasten hin, da die Anzahl der Fibroblasten in der Dermis der MMC-behandelten Hautmodelle deutlich verringert war. Um genauer zu untersuchen, ob die Fibroblasten ihre Proliferation eingestellt haben, wurden sie mit Hilfe des Kollagenaseverdaus (s. Kapitel 2.2.21) aus der Dermis isoliert und die Proliferationsfähigkeit mit Hilfe des BrdU-Einbaus und der Ki67-Färbung überprüft.

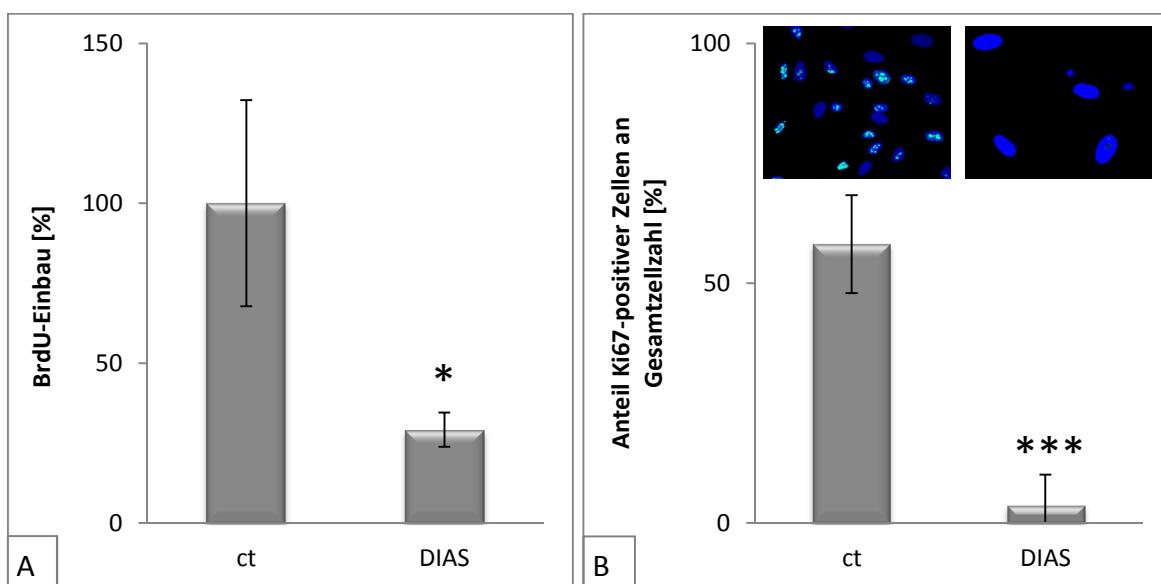


Abbildung 3.15: Proliferationsverhalten isolierter Fibroblasten Durch den Kollagenaseverdau wurden unbehandelte (ct) bzw. MMC-behandelte (DIAS) Fibroblasten nach 21 Tagen in der ALI-Phase aus dem Hautmodell isoliert und anschließend bei gleicher Zellzahl die proliferative Kapazität mit Hilfe des BrdU-Assays (A) und der Ki67-Färbung (B) analysiert. **(A)** Die Extinktion der unbehandelten Fibroblasten wurden auf 100% gesetzt und die Messwerte der MMC-behandelten Fibroblasten darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung drei voneinander unabhängig durchgeführter Experimente ($n=3$). **(B)** In Bezug auf die Gesamtzellzahl wurde der Anteil proliferierender Zellen anhand einer positiven Ki67-Färbung ermittelt. Mitotische Fibroblasten dienten als Kontrolle (ct). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung drei voneinander unabhängig durchgeführter Experimente ($n=3$), sowie repräsentative Aufnahmen. (* $p<0,05$; ** $p<0,001$; Student's t-Test)

In Abbildung 3.15 ist der Proliferationsstopp sowohl im BrdU-Assays, als auch durch die Fluoreszenzfärbung des Proteins Ki67 deutlich zu erkennen. Für den BrdU-Assay wurde die gemessene Extinktion der unbehandelten Fibroblasten, welche aus der Dermis isoliert wurden auf 100% normiert und die der MMC-behandelten Fibroblasten (DIAS) darauf bezogen. Die Proliferation der DIAS-Fibroblasten verringerte sich signifikant im BrdU-Assay auf $25\% \pm 7\%$. Für die Auswertung der Fluoreszenzfärbung wurde der Anteil proliferierender Zellen (Ki67-positiv) in Bezug auf die Gesamtzahl der DAPI-gefärbten Zellkerne bestimmt. Dadurch ergab sich eine proliferative Aktivität der unbehandelten Fibroblasten von $58\% \pm 10\%$ und ein signifikanter Rückgang der Proliferation der DIAS-Fibroblasten auf $4\% \pm 6\%$. Sowohl der BrdU-Einbau als auch die Ki67-Expression machen deutlich, dass der Proliferationsstopp als wichtigstes Merkmal einer seneszenten Zelle ebenfalls durch die Behandlung der Fibroblasten mit Mitomycin-C in der Matrix erreicht wird. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen bezüglich des Proliferationsstopps senescenter Fibroblasten in Monolayerkulturen überein (s. Abbildung 3.6).

3.3.3.2 Auswirkung von Mitomycin-C auf die Morphologie isolierter Fibroblasten

Mit dem Erreichen der replikativen Seneszenz bei Fibroblasten ist eine Zunahme der Zellgröße beschrieben (Mitsui & Schneider, 1976). In Kapitel 3.2.2 konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit MMC im Monolayer eine 10-fache Vergrößerung der Zellfläche bei MMC-induziert seneszenten Fibroblasten gleichermaßen induziert werden konnte, wie bei replikativ seneszenten Fibroblasten. Für die erfolgreiche vorzeitige Induktion eines seneszenten Charakters, müssten die Fibroblasten, welche im 3D-Hautmodell mit Mitomycin-C behandelt wurden, ebenfalls eine starke Zunahme der Zellgröße zeigen. Für die Analyse der Zellmorphologie wurden die Fibroblasten mit Hilfe des Kollagenaseverdaus aus der Matrix isoliert, mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt und vermessen (s. Kapitel 2.2.12). Zur Auswertung wurden von jedem unabhängigen Versuch jeweils drei Bildausschnitte pro Zelltyp ausgewertet, von denen jeweils die Größe von fünf Zellen exemplarisch mit Hilfe der Software *ImageJ* vermessen wurde.

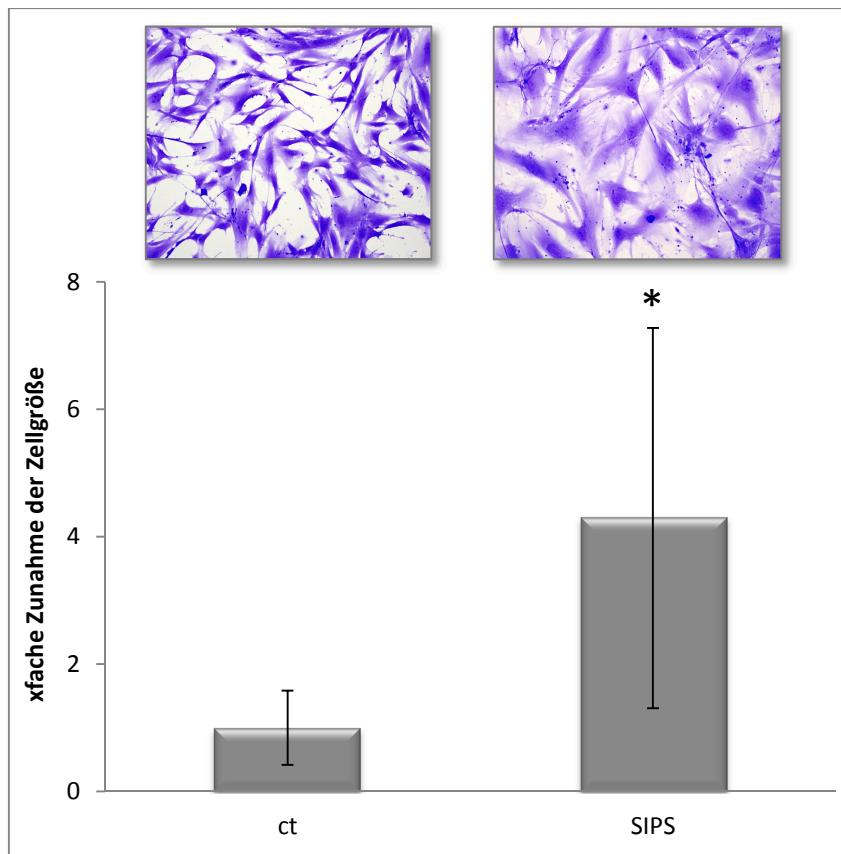


Abbildung 3.16: Zellgröße und Morphologie der isolierten Fibroblasten Durch Kollagenaseverdau wurden unbehandelte (ct) bzw. MMC-behandelte (DIAS) Fibroblasten nach 21 Tagen an der ALI-Phase aus dem Hautmodell isoliert und mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Anschließend wurde die Zellgröße mit Hilfe der Software *ImageJ* vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Hautmodellen ($n=3$), sowie repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen (20-fache Vergrößerung). Die Zellgröße der unbehandelten Fibroblasten wurde auf 1 normiert und die Größe der behandelten Fibroblasten darauf bezogen. (* $p<0,05$; Student's t-Test)

In Abbildung 3.16 ist eine charakteristische Zunahme der Zellgröße von seneszenten Fibroblasten zu erkennen. Die seneszenten Zellen vergrößerten sich durch die Behandlung mit Mitomycin-C signifikant um den Faktor $4,3 \pm 2,8$ und besaßen einen großen, flachen und ovalen Zellkern im Vergleich zu den unbehandelten, mitotischen Fibroblasten, welche ebenfalls aus dem Hautmodell isoliert wurden. Die unbehandelten Fibroblasten (ct) zeichneten sich durch eine spindelförmige Zellform, mehrheitlich mit Ausbuchtungen rund um den Zellkern aus. Mit einer durchschnittlichen Vergrößerung der Zellfläche um den Faktor $4,3 \pm 2,8$ zeigten die MMC-behandelten Fibroblasten aus dem 3D-Hautmodell ein weiteres Merkmal replikativer Seneszenz, wie sie bereits an Monolayerkulturen gezeigt werden konnte (s. Abbildung 3.7).

3.3.3.3 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies an isolierten Fibroblasten

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen gemäß der Freien-Radikal-Therapie (Harman, 1956) eine zentrale Rolle in der Hautalterung. Daher ist ein weiterer Parameter seneszenter Zellen eine erhöhte Menge an ROS. Für die Analyse des ROS-Gehalts wurden die Zellen ebenfalls mit Hilfe des Kollagenaseverdaus aus dem Hautmodell isoliert und nach vier Tagen mit Hilfe der DCF-Messung der Gehalt an intrazellulären ROS gemessen und auf die Zellzahl bezogen. Durch die viertägige Subkultivierung nach dem Kollagenaseverdau konnten ein oxidativer Stress der Zellen aufgrund des Kollagenaseverdaus ausgeschlossen werden, sodass ein erhöhter ROS-Gehalt durch die Behandlung mit Mitomycin-C zu erklären ist.

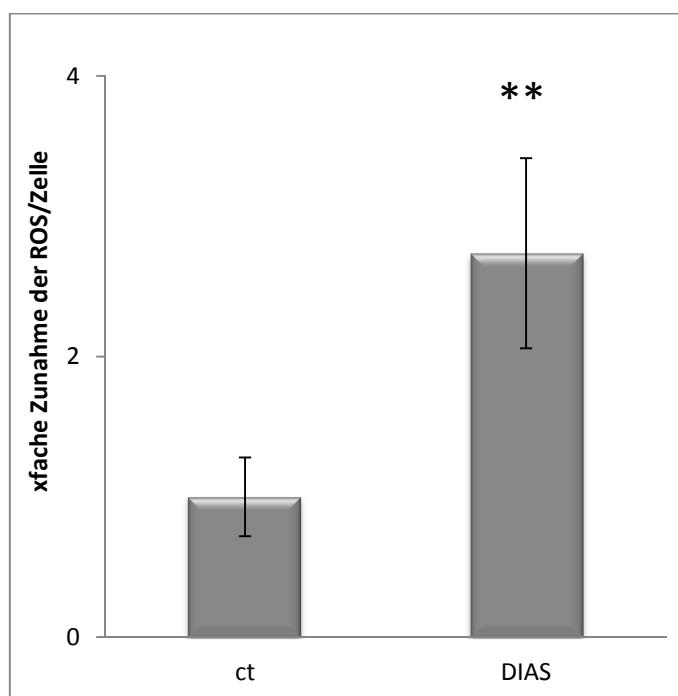


Abbildung 3.17: ROS-Gehalt in isolierten Fibroblasten Durch den Kollagenaseverdau wurden unbehandelte (ct) bzw. MMC-behandelte (DIAS) Fibroblasten nach 21 Tagen in der ALI-Phase aus dem Hautmodell isoliert und anschließend bei gleicher Zellzahl die Menge an intrazellulären ROS mit Hilfe der DCF-Messung analysiert. Die DCF-Messung erfolgte 28 Tage nach dem Beginn der MMC-Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Hautmodellen ($n=3$). Der ROS-Gehalt der unbehandelten isolierten Fibroblasten wurde auf 1 normiert und der ROS-Gehalt der behandelten Fibroblasten darauf bezogen. (** $p<0,01$; Student's t-Test)

Der Gehalt an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies ist bei den isolierten DIAS-Fibroblasten signifikant erhöht im Vergleich zu den isolierten unbehandelten Fibroblasten (ct). Durch den 2,1 bis 3,4-fachen Anstieg des ROS-Gehalts nach der MMC-Behandlung, ergibt sich ein weiterer Hinweis dafür, dass durch diese Behandlung der Fibroblasten im 3D-Hautmodell ebenfalls eine beschleunigte Seneszenz induziert werden kann, welche vergleichbar mit der replikativen Seneszenz und der *drug induced accelerated senescence* (DIAS) in Monolayerkulturen ist (s. Abbildung 3.8).

3.3.3.4 SA- β -Galaktosidase-Aktivität isolierter Fibroblasten aus dem Hautmodell

Für die zelluläre Seneszenz einzelner Fibroblasten wird die intrazelluläre Erhöhung der Aktivität des Enzyms β -Galaktosidase als Indikator beschrieben (Dimri et al., 1995). Für die Überprüfung der SA- β -Galaktosidase-Aktivität, wurden die Fibroblasten mit Hilfe des Kollagenaseverdaus aus dem Hautmodell isoliert und gefärbt (s. Kapitel 2.2.21 und 2.2.11).

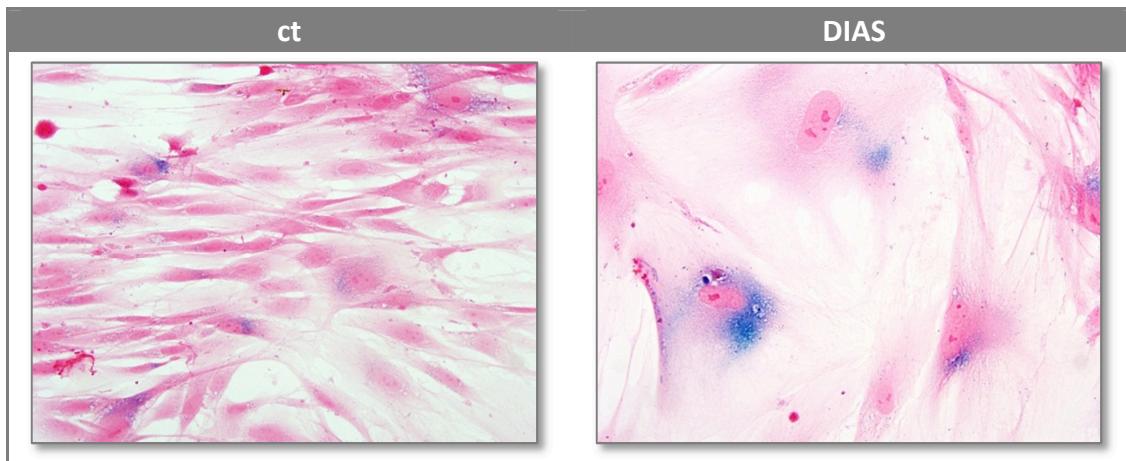


Abbildung 3.18: SA- β -Galaktosidase-Aktivität isolierter Fibroblasten Durch Kollagenaseverdau wurden unbehandelte (ct) bzw. MMC-behandelte (DIAS) Fibroblasten nach 21 Tagen in der ALI-Phase aus dem Hautmodell isoliert und mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion die Aktivität der β -Galaktosidase bei pH 6 untersucht. Eine positive Aktivität zeigt sich durch einen blauen Farbniederschlag. Die Zellen wurden mit Eosin (rot) gegenfärbt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen (40-fache Vergrößerung) aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Neben einer Vergrößerung der Zellfläche (s. Kapitel 3.3.3.2) ist in diesen Bildern zu erkennen, dass es zu einer Akkumulation von β -Galaktosidase in den Mitomycin-C behandelten Fibroblasten (DIAS) gekommen ist. Diese Akkumulation zeigt sich als blauer Niederschlag, welcher intensiver in den DIAS-Fibroblasten zu beobachten war. Die unbehandelten isolierten Fibroblasten zeigten vereinzelt einen leichten blauen Niederschlag, jedoch deutlich weniger intensiv als bei den DIAS. Die Bilder zeigen deutlich, dass es neben einer Vergrößerung der Zellfläche zusätzlich zu einer Akkumulation der SA- β -Galaktosidase gekommen ist, wodurch zwei wichtige Merkmale replikativer Seneszenz ebenfalls durch die MMC-Behandlung der Fibroblasten im Hautmodell induziert werden konnten.

3.3.3.5 Aktivität von p53 in isolierten Fibroblasten aus dem Hautalterungsmodell

Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Fibroblasten nach dem Erreichen der replikativen Seneszenz in der G0/G1-Phase des Zellzyklus befinden (Stein & Dulic, 1995). Der Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus wird unter anderem durch das Tumorsuppressorprotein p53 reguliert (s. Kapitel 1.1.2.1). Mit Hilfe des Westernblots wurde untersucht, ob die Inhibition der Proliferation von einer veränderten Aktivität des Proteins p53 begleitet wurde.

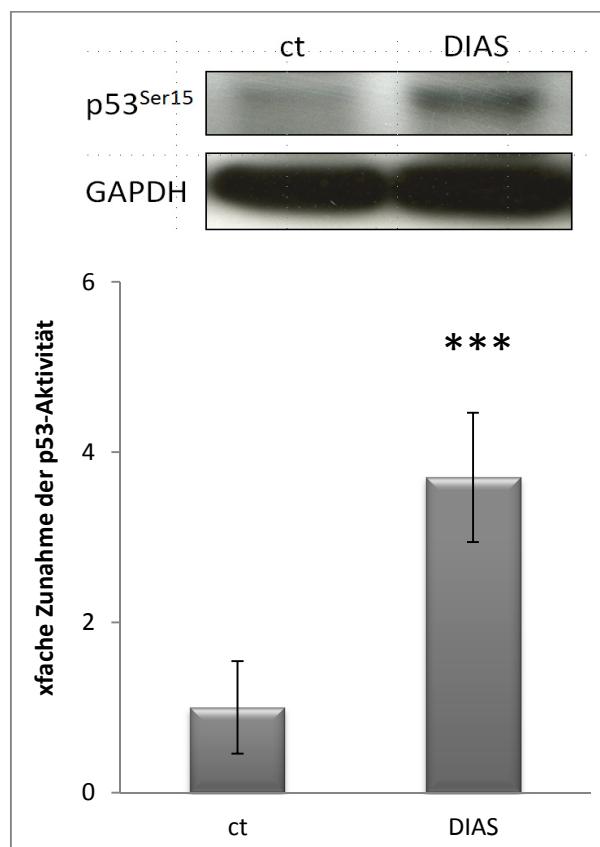


Abbildung 3.19: p53-Aktivität in isolierten Fibroblasten aus dem Hautmodell Durch Kollagenaseverdau wurden unbehandelte (ct) bzw. MMC-behandelte (DIAS) Fibroblasten nach 21 Tagen in der ALI-Phase aus dem Hautmodell isoliert und die Aktivität von p53 mit Hilfe des Westernblots untersucht. Unbehandelte mitotische Fibroblasten dienten als Kontrolle (ct). Für die densitometrische Auswertung wurde auf GAPDH normiert, die p53-Aktivität der Kontrolle auf 1 normiert und die der DIAS darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Hautmodellen (n=3), sowie eine repräsentative Aufnahme des Westernblots. (***)p<0,001; Student's t-Test)

Die p53-Aktivität wurde durch die Behandlung mit Mitomycin-C signifikant erhöht. Durchschnittlich ergab sich bei den DIAS eine 3,7-fache Erhöhung des an Serin-15 phosphorylierten Proteins, wie es auch schon in den Monolayer-Experimenten gezeigt werden konnte (s. Abbildung 3.10). Die Ergebnisse machen deutlich, dass der Zellzyklusstop durch die Behandlung der Fibroblasten im 3D-Hautmodell ebenfalls über einen p53-abhängigen Signalweg induziert werden kann.

3.3.3.6 Einfluss von MMC auf MMP-1 in isolierten Fibroblasten

Um festzustellen, ob durch die Behandlung mit Mitomycin-C der Fibroblasten im 3D-Hautmodell ebenfalls ein Anstieg der Expression von Matrix-Metalloproteinase-1 induziert wurde, so wie es für replikativ senescente Fibroblasten beschrieben ist, wurden die Überstände der isolierten Fibroblasten mit Hilfe der ELISA „*Quantakine ELISA Human Pro-MMP1*“ und „*Fluorokine E Human active MMP1*“ analysiert. Dazu wurden zunächst die Fibroblasten wiederum aus dem Hautmodell isoliert und anschließend sowohl die Gesamtkonzentration an basalem Pro-MMP-1 als auch die Aktivität von MMP-1 in den Überständen analysiert und auf die jeweilige Zellzahl bezogen.

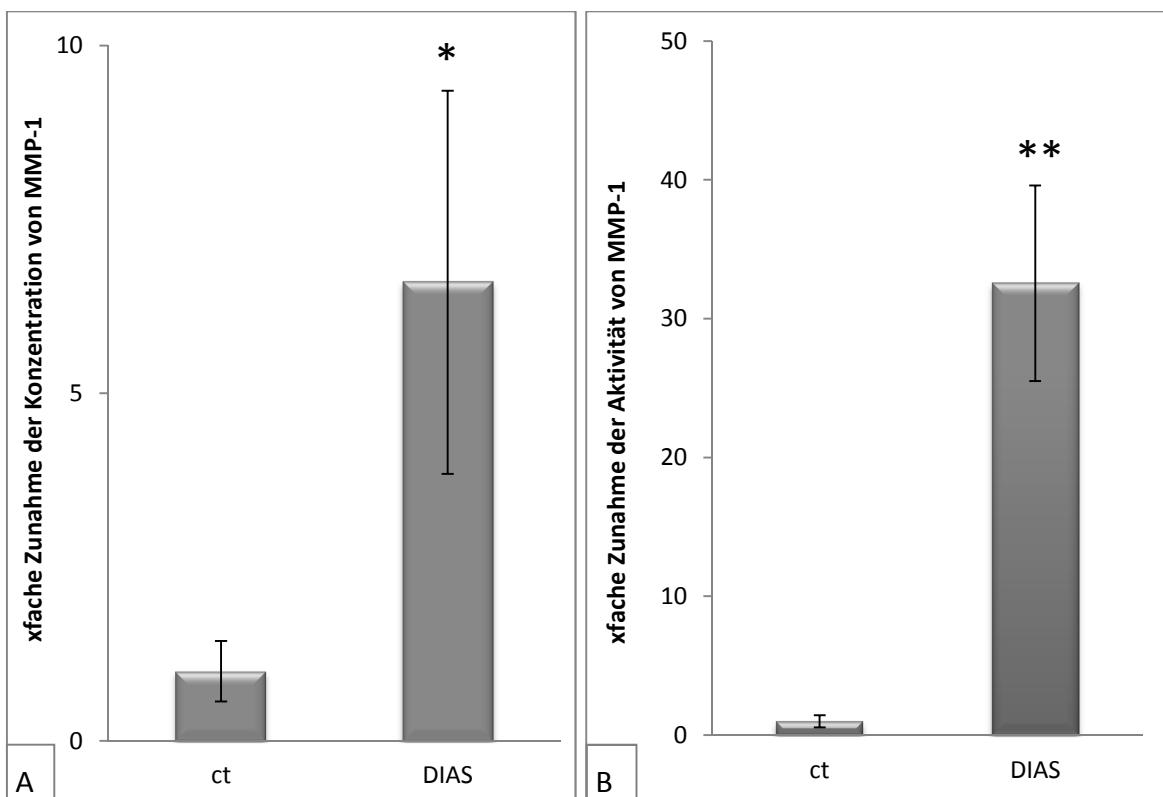


Abbildung 3.20: Konzentration und Aktivität von MMP-1 bei isolierten Fibroblasten Durch Kollagenaseverdau wurden unbehandelte (ct) bzw. MMC-behandelte (DIAS) Fibroblasten aus dem Hautmodell isoliert und die Überstände bezüglich der Gesamtkonzentration (A) sowie der Aktivität (B) an Matrix-Metalloproteinase-1 pro Zelle analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Messungen mit jeweils drei Hautmodellen ($n=3$). Die Menge bzw. Aktivität von MMP-1 der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 normiert und die Messwerte der isolierten DIAS-Fibroblasten darauf bezogen. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; Student's t-Test)

Die Gesamtkonzentration an basalem MMP-1 war in den Untersuchungen am Monolayer bei den replikativ seneszenten Fibroblasten 4-fach und bei den vorzeitig induziert seneszenten 3,5-fach (Abbildung 3.11) erhöht. Die Analyse der Überstände von den isolierten Fibroblasten aus dem Hautmodell ergab vergleichbare Werte. Durch die MMC-Behandlung der Zellen im 3D-Hautmodell wurde die Konzentration an MMP-1 signifikant um den Faktor $6 \pm 2,7$ erhöht im Vergleich zu den unbehandelten, isolierten Fibroblasten. Zusätzlich zu dieser Erhöhung an basalem MMP-1 konnte außerdem eine signifikante

Steigerung der Aktivität von MMP-1 um den Faktor 32 ± 7 in Bezug auf die unbehandelten Fibroblasten nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.20). Diese Steigerung bezüglich der Konzentration und der Aktivität von MMP-1 verdeutlicht einmal mehr, dass die Behandlung mit Mitomycin-C der Zellen im 3D-Hautmodell erfolgreich dazu geführt hat, das eine beschleunigte Seneszenz in den Fibroblasten induziert werden konnte.

3.3.3.7 Zusammenfassung der Seneszenz-Marker in isolierten Fibroblasten

Durch die Isolierung der Fibroblasten sowohl aus dem unbehandelten Hautmodell, als auch aus dem Hautmodell welches mit Mitomycin-C behandelt wurde, konnten die Seneszenz-Marker der Zellen direkt mit den Ergebnissen aus den Versuchen am Monolayer verglichen werden. Alle untersuchten Merkmale einer replikativ seneszenten Zelle konnten ebenfalls bei den Fibroblasten gefunden werden, welche im Hautmodell mit Mitomycin-C behandelt wurden. Die Behandlung führte gleichermaßen zu einer dauerhaften Inhibition des Zellzyklus, einer Erhöhung an intrazellulären ROS, einer Vergrößerung der Zellfläche, einem Anstieg der SA- β -Galaktosidase-Aktivität sowie zu einer Steigerung an aktivem p53. Außerdem wurde sowohl die Konzentration an MMP-1, als auch dessen Aktivität erhöht. Somit lässt sich abschließend feststellen, dass die Behandlung mit Mitomycin-C sowohl im Monolayer, als auch im Hautmodell erfolgreich eine beschleunigte Seneszenz induzieren und die replikative Seneszenz imitieren konnte.

Tabelle 3.3:Übersicht der Merkmale replikativer Seneszenz (RS) im Vergleich zur MMC-induzierten Seneszenz (DIAS)

Merkmal	RS		DIAS
	In vitro Monolayer	In vitro Monolayer	In vitro Hautmodell
Proliferationsstopp	✓	✓	✓
Vergrößerte Morphologie	✓	✓	✓
Erhöhter ROS-Gehalt	✓	✓	✓
SA- β -Galaktosidase-Aktivität	✓	✓	✓
Aktives p53	✓	✓	✓
Zellzyklusstopp	✓	✓	Nicht gemessen
Erhöhte Konzentration von MMP-1	✓	✓	✓
Erhöhte Aktivität von MMP-1	✓	Nicht gemessen	✓

3.3.4 Charakteristika des Hautalterungsmodells

In Kapitel 3.3.3 konnte gezeigt werden, dass die isolierten Fibroblasten aus dem MMC-behandelten Hautmodell alle wesentlichen Merkmale seneszenter Zellen zeigen, sodass diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass der Aufbau eines Hautalterungsmodells durch die Behandlung der Fibroblasten mit MMC möglich ist. Zur Charakterisierung eines Hautalterungsmodells ist es jedoch notwendig, direkt am Modell Veränderungen zu untersuchen, welche für die *in vivo* Hautalterung beschrieben sind. Die folgenden Untersuchungen sollen derartige Veränderungen des Hautalterungsmodells auf histologischer, biochemischer und molekularbiologischer Ebene aufzeigen. Als Hautalterungsmodell oder „gealterte Haut“ ist in den folgenden Kapiteln immer das Hautmodell gemeint, welches mit Mitomycin-C behandelt wurde. Als Kontrolle (ct) oder „junge Haut“ wird das unbehandelte Hautmodell betrachtet.

3.3.4.1 Histologische Veränderungen der Strukturproteine

Mit Hilfe der HE-Färbung konnten in Abbildung 3.14 wichtige strukturelle Veränderungen des gealterten Hautmodells im Vergleich zu dem jungen Hautmodell festgestellt werden. Da der Prozess der Hautalterung überwiegend von den Fibroblasten in der Dermis ausgeht (Farage et al., 2010), konnten in diesem Bereich auch die größten Veränderungen beobachtet werden. Die Dermis der jungen Hautmodelle wurde nahezu komplett mit Fibroblasten besiedelt, sodass nur wenige nicht besiedelte Bereiche erkennbar waren. Die Dermis der alten Hautmodelle hingegen zeigte eine deutlich weniger dichte Besiedlung der Matrix mit Fibroblasten sowie zahlreiche nicht besiedelte Bereiche und eine gelockerte Kollagenstruktur. Somit konnten bereits wesentliche histologische Merkmale einer *in vivo* gealterten Haut gefunden werden. Im Bereich der Epidermis hingegen konnten mit Hilfe der HE-Färbung keine strukturellen Veränderungen beobachtet werden. Da es sich bei der HE-Färbung jedoch ausschließlich um eine Übersichtsfärbung handelt, welche nicht geeignet ist, um Veränderungen einzelner Proteine nachzuweisen, wurde für die Analyse der epidermalen Differenzierung die Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung können einzelne Proteine wie z.B. Filaggrin untersucht werden, welche charakteristisch für die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Epidermis sind. Dadurch können Veränderungen im epidermalen Bereich sichtbar gemacht werden, welche mit der HE-Färbung nicht detektiert werden können.

3.3.4.1.1 Der Filaggringehalt in alter Haut *in vivo* und *in vitro*

Filaggrin ist ein charakteristischer Marker für die fortschreitende Differenzierung der Epidermis, der überwiegend im *stratum corneum* gebildet wird (Dale et al., 1985) und notwendig für die Aggregation von Keratinfilamenten ist. Dadurch spielt Filaggrin eine wichtige Rolle in der veränderten Barrierefunktion *in vivo* gealterter Haut. Die immunhistologischen Färbungen in Abbildung 3.21 zeigen deutlich, dass *in vivo* eine Abnahme der Filaggrin-Expression in alter Haut auftritt, welche in der Literatur für den zunehmenden Wasserverlust und die daraus resultierende Trockenheit verantwortlich gemacht wird (Seguchi et al., 1996; Takahashi & Tezuka, 2004; Gilchrest & Krutmann, 2006).

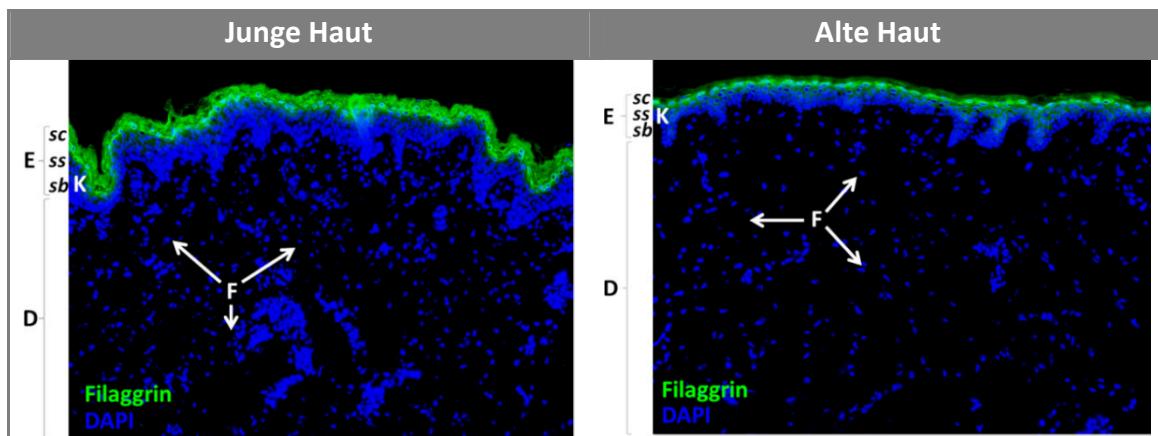


Abbildung 3.21: Filaggrin-Expression *in vivo* Kryoschnitte einer jungen Haut (Vorhaut eines Dreijährigen) und einer alten Haut (Facelift einer 67-Jährigen) wurden für die immunhistologische Analyse zunächst mit dem Primärantikörper (monoclonal mouse anti human filaggrin) und anschließend mit dem Sekundärantikörper (AlexaFlour488 rabbit anti mouse IgG) inkubiert. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Bei einer Extinktion von 492 nm und einer Emission von 520 nm kann Filaggrin (grün) im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme (20-fache Vergrößerung) von drei unabhängigen Ansätzen ($n=3$). E: Epidermis, D: Dermis, K: Keratinozyten, F: Fibroblasten, sb: stratum basale, ss: stratum spinosum, sc: stratum corneum

Abbildung 3.22 zeigt deutlich, dass die Epidermis des Hautalterungsmodells (DIAS) deutlich weniger stark differenziert ist, als bei dem jungen Hautmodell (ct, Ansatz 1 – 3). Bei dem Hautalterungsmodell ist das Filaggrin ausschließlich im unteren Bereich des *stratum corneums* zu finden, wohingegen es beim jungen Hautmodell im gesamten *stratum corneum* detektiert werden kann. Außerdem erscheint die Expression bei dem gealterten Hautmodell weniger intensiv als bei dem jungen Hautmodell. Das Hautalterungsmodell *in vitro* (DIAS) zeigt somit bezüglich der Filaggrin-Expression ein vergleichbares Bild wie die *in vivo* gealterte Haut.

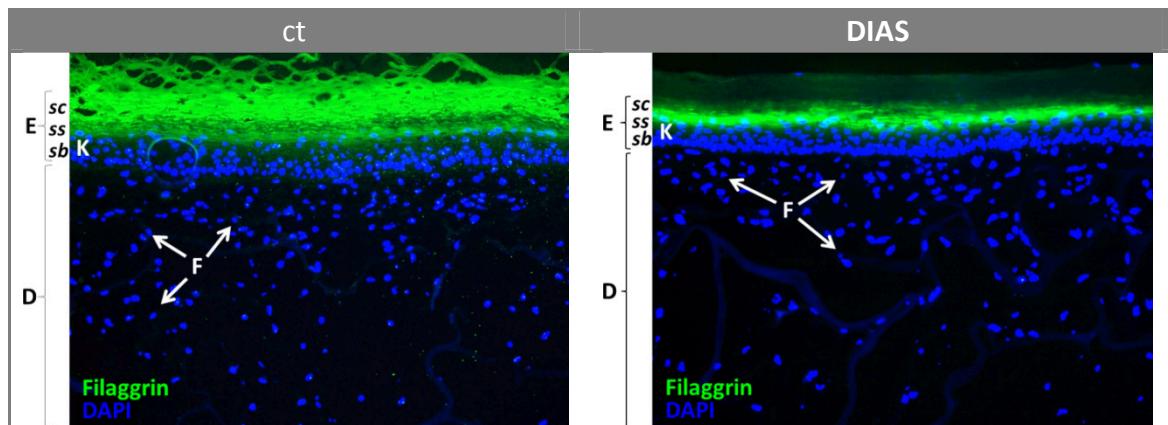


Abbildung 3.22: Filaggrin-Expression im Hautmodell Kryoschnitte unbehandelter (ct) und MMC-behandelter (DIAS) Hautmodelle wurden nach 21 Tagen in der ALI-Phase angefertigt, auf Objekträgern fixiert und zunächst mit dem Primärantikörper (monoclonal mouse anti human Filaggrin) und anschließend mit dem Sekundärantikörper (AlexaFlour488 rabbit anti mouse IgG) inkubiert. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Bei einer Extinktion von 492 nm und einer Emission von 520 nm kann Filaggrin (grün) im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme (20-fache Vergrößerung) von drei unabhängigen Ansätzen mit je drei Hautmodellen ($n=3$). E: Epidermis, D: Dermis, K: Keratinozyten, F: Fibroblasten, sb: stratum basale, ss: stratum spinosum, sc: stratum corneum

3.3.4.1.2 Der Elastingehalt in alter Haut *in vivo* und *in vitro*

Die *in vivo* gealterte Haut ist besonders durch Veränderungen auf der Dermis-Ebene charakterisiert. Die Elastizität und Festigkeit der menschlichen Haut wird im Wesentlichen durch Kollagen und Elastin als Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix bestimmt. Insbesondere der Elastizitätsverlust und die Faltenbildung bei gealterter Haut gehen auf Veränderungen dieser beiden Strukturproteine zurück (Sherratt, 2009).

Als histologisches Charakteristikum einer *in vivo* gealterten Haut konnte eine signifikante Veränderung des elastischen Fasernetzwerkes bis hin zur fast vollständigen Zerstörung beobachtet werden. Abbildung 3.23 zeigt ein dichtes Fasernetzwerk aus Elastinfasern, welches kompakt den gesamten dermalen Bereich der jungen Haut ausfüllt. Bei der *in vivo* gealterten Haut zeigte sich dieses Fasernetzwerk aufgelockert und die langen Elastinfasern wurden zerstört, wodurch sich eine poröse Struktur ergab (s. Abbildung 3.23).

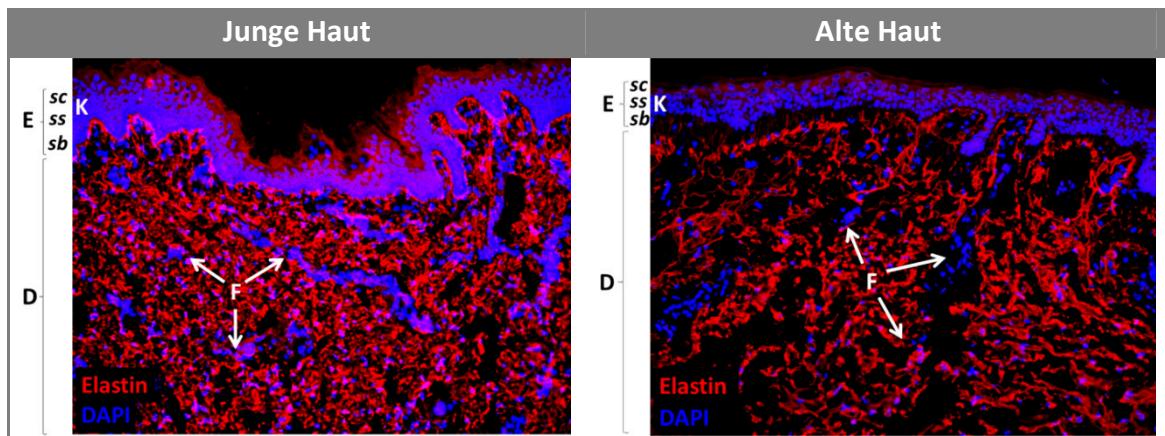


Abbildung 3.23: Elastin-Expression *in vivo* Kryoschnitte einer jungen Haut (Vorhaut eines Dreijährigen) und einer alten Haut (Facelift einer 67-Jährigen) wurden für die immunhistologische Analyse zunächst mit dem Primärantikörper (polyclonal rabbit anti human elastin) und anschließend mit dem Sekundärantikörper (AlexaFlour568 goat anti rabbit IgG) inkubiert. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Bei einer Extinktion von 550 nm und einer Emission von 570 nm kann Elastin (rot) im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme (20-fache Vergrößerung) von drei unabhängigen Ansätzen ($n=3$). E: Epidermis, D: Dermis, K: Keratinozyten, F: Fibroblasten, sb: stratum basale, ss: stratum spinosum, sc: stratum corneum

Die verminderte Elastin-Expression wie sie für *in vivo* gealterte Haut beschrieben ist, konnte auch bei dem *in vitro* gealterten Hautmodell beobachtet werden (s. Abbildung 3.24). Durch die Behandlung mit Mitomycin-C der Fibroblasten in der Matrix ging die Expression des Elastins in der Dermis deutlich zurück. Abbildung 3.24 zeigt außerdem, dass das Elastin in dem jungen Hautmodell (ct) in der gesamten Dermis nachweisbar ist, wohingegen sich die Elastin-Expression im Hautalterungsmodell (DIAS) auf den oberen Bereich der Dermis beschränkte und dadurch die Charakteristika bezüglich der Elastin-Expression *in vivo* gealterter Haut wiederspiegelt.

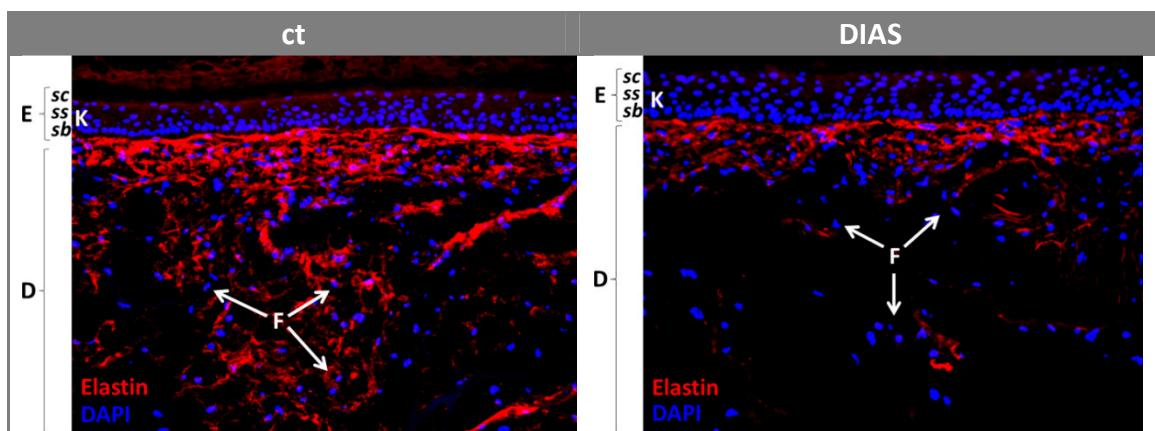


Abbildung 3.24: Elastin-Expression im Hautmodell Kryoschnitte unbehandelter (ct) und MMC-behandelter (DIAS) Hautmodelle wurden nach 21 Tagen in der ALI-Phase angefertigt, auf Objektträgern fixiert und zunächst mit dem Primärantikörper (polyclonal rabbit anti human elastin) und anschließend mit dem Sekundärantikörper (AlexaFlour568 goat anti rabbit IgG) inkubiert. Für die Kernfärbung wurde DAPI verwendet. Bei einer Extinktion von 550 nm und einer Emission von 570 nm kann Elastin (rot) im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme von drei unabhängigen Ansätzen mit je drei Hautmodellen ($n=3$). E: Epidermis, D: Dermis, K: Keratinozyten, F: Fibroblasten, sb: stratum basale, ss: stratum spinosum, sc: stratum corneum

3.3.4.1.3 Der Kollagengehalt in alter Haut *in vitro*

Als weiteres Strukturprotein spielt das Kollagen in der Hautalterung eine zentrale Rolle. In der *in vivo* gealterten Haut ist zum einen eine Desorganisation des Kollagens zu beobachten und zum anderen ist das Gleichgewicht von Synthese und Abbau zum Abbau hin verschoben (Gilchrest & Krutmann, 2006). Mit Hilfe der AZAN-Färbung können bestimmte Zell- bzw. Gewebestrukturen angefärbt werden. So werden beispielsweise die Zellkerne durch das Azocarmine leuchtend rot und durch das Anilinblau die Kollagenfasern blau gefärbt.

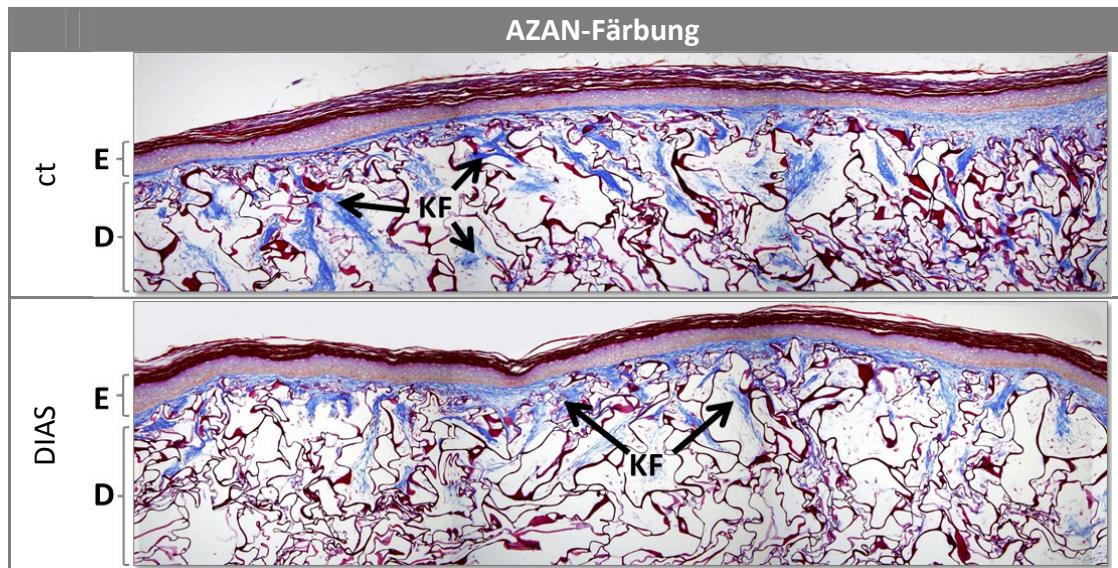


Abbildung 3.25: Kollagengehalt im Hautmodell Mit Hilfe der AZAN-Färbung wurden saure Strukturen wie z.B. Zellkerne oder die Matrix rot und das Kollagen blau angefärbt. Die Färbung erfolgte an Paraffinschnitten un behandelter (ct) und MMC-behandelter (DIAS) Hautmodelle nach 21 Tagen in der ALI-Phase. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme (20-fache Vergrößerung) von drei unabhängigen Ansätzen mit je drei Hautmodellen (n=3). D: Dermis, E: Epidermis, KF: Kollagenfasern

Abbildung 3.25 zeigt in einer Übersichtsaufnahme die verminderte Menge an Kollagenfasern (KF) im gealterten Hautmodell (DIAS) im Vergleich zu dem jungen Hautmodell (ct). Im Hautalterungsmodell beschränkt sich die Kollagenexpression auf den oberen Bereich der Dermis (D), wohingegen die Kollagenfasern in der jungen Haut bis weit unten in der Dermis nachgewiesen werden konnten. Mit Hilfe des Programms *Adobe Photoshop* wurden die blauen Strukturen herausgefiltert (s. Abbildung 3.26), sodass die Bilder anschließend mit Hilfe des Auswerteprogramms *ImageJ* bezüglich ihres Kollagengehaltes quantifiziert werden konnten.

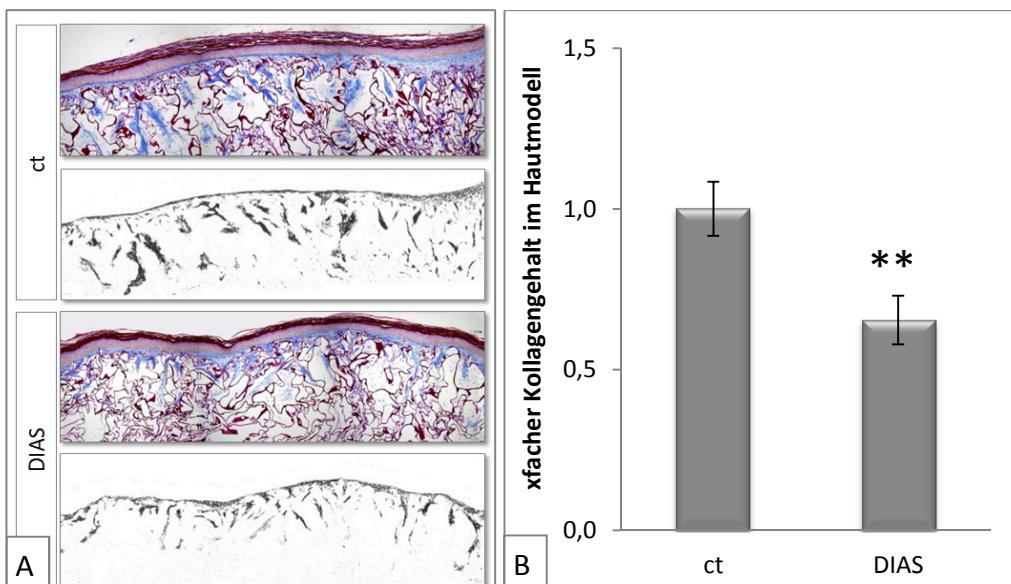


Abbildung 3.26: Quantitative Auswertung der AZAN-Färbung Für die Auswertung wurden die blauen Strukturen mit Hilfe von Adobe Photoshop herausgefiltert (**A**). Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme (20-fache Vergrößerung) von drei unabhängigen Ansätzen mit je drei Hautmodellen ($n=3$). Anschließend wurden die Bilder mit ImageJ quantitativ ausgewertet (**B**). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Hautmodellen. Die Messwerte der quantitativen Auswertung der behandelten Modelle (ct) wurden auf 1 normiert, sodass die Färbung der behandelten Modelle (DIAS) darauf bezogen werden konnten. (** $p<0,01$; Student's t-Test) Der histologische Eindruck einer verminderten Kollagenmenge im Hautalterungsmodell konnte durch die quantitative Auswertung der AZAN-Färbung bestätigt werden. Insgesamt verringerte sich der Kollagengehalt signifikant auf $65\% \pm 8\%$ im Vergleich zu dem jungen Hautmodell. Um weitere Anhaltspunkte für die Ursachen des Rückgangs der Kollagenmenge zu erhalten, wurde in den folgenden Versuchen geprüft, ob eine verminderte Neusynthese oder der vermehrte Abbau des Kollagens ursächlich für den Kollagenverlust ist. Dazu wurden die Überstände der Hautmodelle zum einen bezüglich der Synthese von P1NP (Prokollagen Typ-1 N-terminales Propeptid) als Vorläufer des Kollagens untersucht, zum anderen folgte eine Analyse der Überstände auf den Gehalt an Matrix-Metalloproteinase-1, sowie dessen Aktivität.

3.3.4.2 Einfluss von MMC auf den Kollagengehalt im Hautalterungsmodell

Die Veränderungen in der Dermis werden durch ein Ungleichgewicht zwischen dem Kollagenabbau durch Matrix-Metalloproteinasen und der Neusynthese hervorgerufen. Normalerweise liegt in junger Haut ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau vor, welches jedoch bei *in vivo* gealterter Haut deutlich zum Abbau hin verschoben ist (Gilchrest & Krutmann, 2006). Für die Charakterisierung des Hautalterungsmodells und potentieller Anti-Aging-Strategien ist der Kollagengehalt somit besonders zu berücksichtigen. Zunächst einmal wurde mit Hilfe von P1NP die Neusynthese von Kollagen im Hautmodell untersucht.

P1NP ist ein Vorläufermolekül des Kollagens. Nach der Translation der mRNA wird zunächst ein Präprokollagen erzeugt, welches ein aminoterminales Signalpeptid besitzt. Anschließend folgt die Freisetzung des Präprokollagens aus den Ribosomen in das endoplasmatische Retikulum, wo Proteasen das Signalpeptid abspalten. Dadurch wird das Präprokollagen zum Prokollagen, welches an C- und N-Terminus (P1NP) ein sogenanntes Propeptid besitzt (Müller-Esterl, 2010). Das Prokollagen wird in den extrazellulären Raum sezerniert und durch weitere strukturelle Veränderungen, an denen unter anderem Hydroxylasen und Peptidasen beteiligt sind, zum Tropokollagen umgebaut, welches anschließend zu Kollagenfibrillen assoziiert und letztendlich Kollagenfasern ausbildet (Fratzl, 2008). Da P1NP somit eine Vorstufe der Kollagenfasern bildet, kann durch den Nachweis von P1NP ein indirekter Beleg für die Kollagensynthese gewonnen werden.

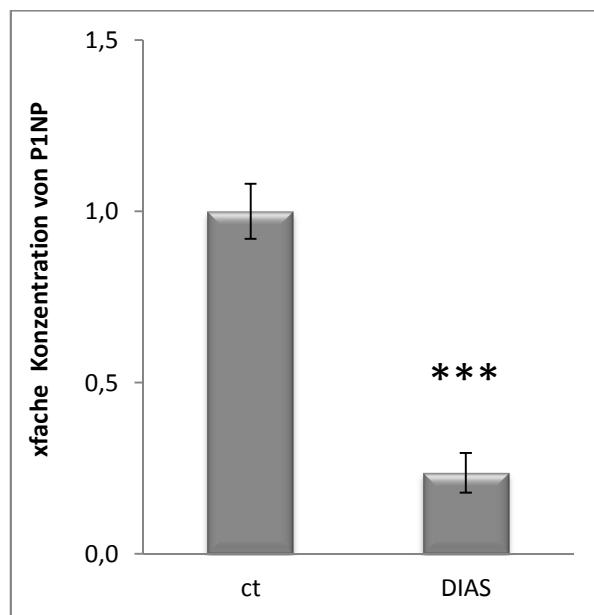


Abbildung 3.27: P1NP-Konzentration in den Überständen der Hautmodelle Für die Analyse der Kollagensynthese am Hautmodell wurden die gleichen Volumina von den Überständen der unbehandelten (ct) und MMC-behandelten (DIAS) Hautmodelle mit Hilfe des P1NP-ELISA auf die Menge an sezerniertem P1NP als Vorläufer des Kollagens untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Hautmodellen ($n=3$). Die P1NP-Konzentration der unbehandelten Modelle (ct) wurde auf 1 normiert und die Konzentration der behandelten Modelle (DIAS) darauf bezogen. (***) $p<0,001$; Student's t-Test)

Abbildung 3.27 zeigt eine signifikante Abnahme der P1NP-Menge in den Überständen des Hautalterungsmodells auf $76\% \pm 5\%$ im Vergleich zum jungen Hautmodell. Die Messung belegt, dass durch die Behandlung mit Mitomycin-C die Konzentration des Kollagenvorläufers P1NP um dreiviertel verringert wurde, was übereinstimmt mit der verminderten Kollagenmenge in der AZAN-Färbung.

Des Weiteren wurde die Konzentration an Pro-MMP-1 und dessen Aktivität in den Überständen der Hautmodelle analysiert. Dazu wurden die Überstände drei voneinander

unabhängiger Versuchsansätze mit jeweils drei Hautmodellen mit Hilfe der ELISA „Quantakine ELISA Human Pro-MMP1“ und „Fluorokine E Human active MMP1“ analysiert. Die Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt Abbildung 3.28.

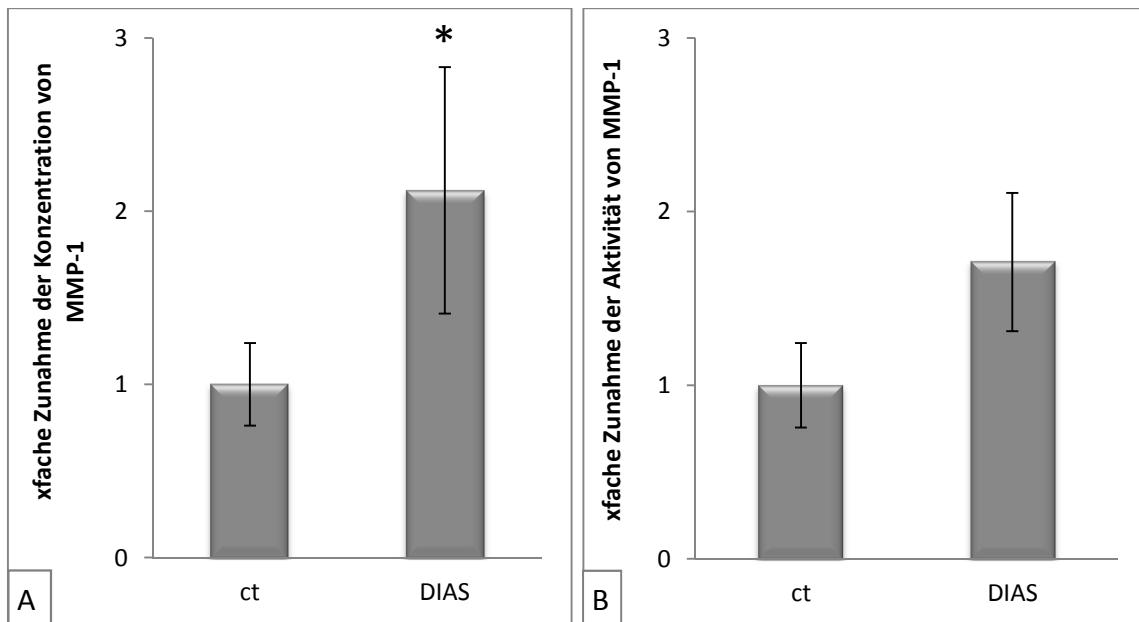


Abbildung 3.28: Konzentration und Aktivität von MMP-1 im Hautmodell Die gleichen Volumina von den Überständen der unbehandelten (ct) und MMC-behandelten (DIAS) Hautmodelle wurden auf die Gesamtmenge an Pro-MMP-1 **(A)** und die Aktivität von MMP-1 untersucht **(B)**. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Hautmodellen ($n=3$). Die Konzentration bzw. Aktivität der unbehandelten Kontrolle wurde auf 1 normiert und die der behandelten Modelle darauf bezogen. (* $p<0,05$; Student's t-Test)

Die isolierten Zellen aus dem Hautalterungsmodell zeigten bereits erste Hinweise auf eine erhöhte Produktion an MMP-1 (s. Kapitel 3.3.3.6). Die Analyse der Überstände der alten Hautmodelle ergab sowohl eine signifikante Zunahme der Konzentration von MMP-1 um den Faktor $2,0 \pm 0,7$, als auch eine signifikante Steigerung der Aktivität um den Faktor $1,7 \pm 0,4$ im Vergleich zu den jungen Hautmodellen. Durch die Behandlung mit Mitomycin-C der Fibroblasten im Ganzhautmodell wurde somit nicht nur die Expression der Matrix-Metalloproteinase-1 verdoppelt, sondern auch deren Aktivität um 70% gesteigert. Für die in Kapitel 3.3.4.1 beobachtete Verringerung der Kollagenmenge im Hautalterungsmodell lassen sich somit zwei Ursachen feststellen: Zum einen ist die Konzentration an P1NP als Kollagenvorläufer bei den MMC-behandelten Modellen um 75% niedriger als in den unbehandelten Modellen und zum anderen steigt sowohl die Konzentration, als auch die Aktivität des kollagenabbauenden Enzyms MMP-1 signifikant an. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die gesteigerte Produktion und Aktivität von MMP-1 neben fibrillärem Kollagen auch P1NP vermehrt abgebaut wird, wurde mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) kontrolliert, ob auf mRNA-Ebene eine verringerte Kollagensynthese im Hautmodell nachgewiesen werden kann.

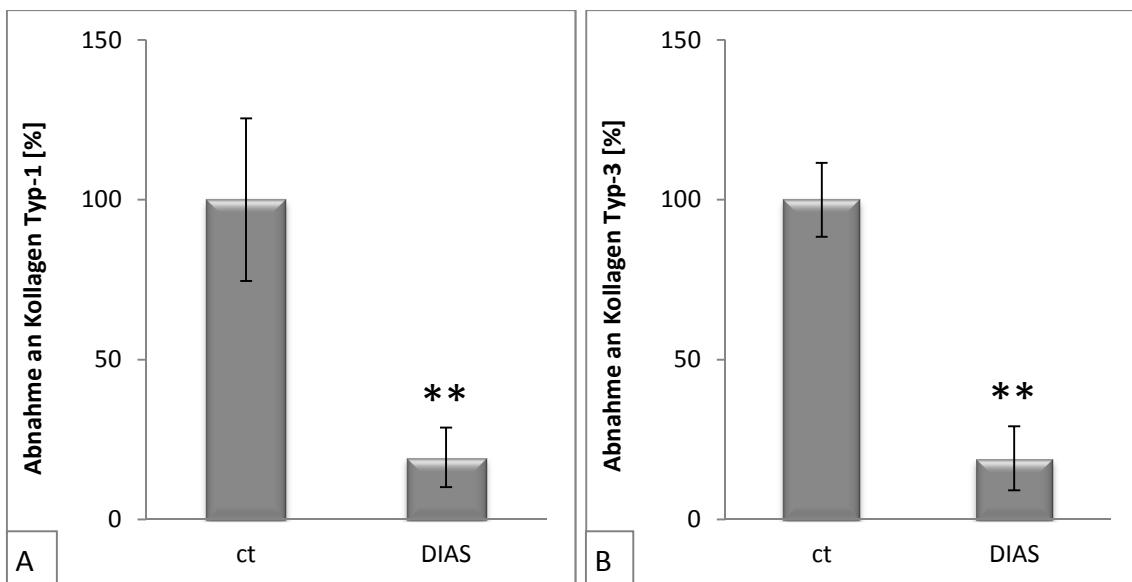


Abbildung 3.29: Kollagensynthese auf mRNA-Ebene im Hautmodell Die mRNA wurde aus den Hautmodellen isoliert und die Expression an (A) Kollagen Typ-1 und (B) Kollagen Typ-3 mit Hilfe der Realtime-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus der Messung von drei Hautmodellen nach dem Bezug auf die 18S-RNA als Housekeeping-Gen ($n=3$). Die unbehandelten Modelle dienten als Kontrolle (ct). Die Ergebnisse der unbehandelten Modelle wurden auf 1 normiert und die Menge an Kollagen Typ-1 bzw. Typ-3 der behandelten Modelle darauf bezogen. (** $p<0,01$; Student's t-Test)

Durch die PCR konnte ein signifikanter Unterschied der mRNA-Expression für Kollagen Typ-1 und Kollagen Typ-3 auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden. Die behandelten Modelle (DIAS) zeigten eine verringerte Expression an Kollagen Typ-1 (80% \pm 9%) und Kollagen Typ-3 (81% \pm 10%) in Bezug auf die unbehandelten Modelle (100% \pm 25% bzw. \pm 11%). Die Ergebnisse der P1NP-Analyse und der Genexpression machen deutlich, dass sowohl auf Proteinebene, als auch auf mRNA-Ebene die Kollagensynthese in den alten Hautmodellen stark verringert ist und somit die *in vivo* Situation widerspiegelt.

Histologisch, biochemisch und molekularbiologisch konnte eine Abnahme der Kollagenmenge im gealterten Hautmodell nachgewiesen werden. Es wurde sowohl eine signifikante Abnahme des Kollagenvorläufers P1NP gemessen, als auch eine signifikante Abnahme der Kollagenexpression auf RNA-Ebene. In Folge dessen wurde mit Hilfe der AZAN-Färbung deutlich weniger Kollagen im gealterten Hautmodell detektiert. Zusätzlich zu einer verminderten Kollagensynthese, zeigte sich eine signifikante Zunahme an kollagenabbauenden Enzymen. Mit Hilfe der ELISA-Technik konnte in den alten Hautmodellen im Vergleich zu den jungen Hautmodellen sowohl ein Anstieg der Konzentration an Pro-MMP-1, als auch eine erhöhte Aktivität von MMP-1 nachgewiesen werden. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Kollagenauf- und abbau, welches ein wesentliches Charakteristikum *in vivo* gealterter Haut ist (Boni & Burg, 2000) und als Ziel für zahlreiche Anti-Aging-Strategien dient.

3.4 Anti-Aging

Anti-Aging-Maßnahmen haben zum Ziel, das biologische Altern und deren sichtbare Zeichen zu stoppen, zu verzögern oder umzukehren. Als äußeres Zeichen des Alterns ist die Haut betroffen, welche etwa ab dem 25. Lebensjahr mit dem Prozess der Hautalterung beginnt, welche sich vor allem durch Falten sichtbar wird. Die Ursache dafür liegt in einem Ungleichgewicht zwischen Kollagenauf- und abbau, welcher teilweise zu einem Abbau der dermalen Strukturproteine führt. Da gerade in westlichen Kulturkreisen sichtbare Falten als Zeichen des Älterwerdens als nicht erstrebenswert gelten, gibt es zahlreiche Kosmetikprodukte, die einen Anti-Aging-Effekt beschreiben. Da der Begriff Anti-Aging nicht gesetzlich geschützt ist, kann er beliebig benutzt werden und wird vor allem in Gesichtscremes verwendet. Die verschiedenen Inhaltsstoffe der Gesichtscremes umfassen zum Beispiel Vitamin-C, Vitamin-A-Derivate, Coenzym Q10 oder Hyaluronsäure (s. Kapitel 1.4.1).

3.4.1 Anti-Aging-Effekte durch Vitamin-A

Die Wirksamkeit der Vitamin-A-Derivate wird in mehreren Publikationen dokumentiert (Varani et al., 2000; Griffiths, 2001; Quan et al., 2011). Durch den Einsatz von Retinsäure können zum Beispiel typische Zeichen der UV-induzierten vorzeitigen Hautalterung, wie Falten oder Elastizitätsverlust, deutlich verringert werden (Varani et al., 2000). Des Weiteren sind Effekte zur Steigerung der Kollagensynthese und zur Verminderung der Synthese von kollagenabbauenden Matrix-Metalloproteinasen beschrieben (Quan et al., 2011). Für die vorliegende Arbeit war es von besonderem Interesse, ob die beschriebenen Effekte der Retinsäurebehandlung, ebenfalls bei der beschleunigten Alterung von Fibroblasten durch Mitomycin-C beobachtet werden konnten. Erste Versuche wurden an Monolayerkulturen durchgeführt und werden in weiterführenden Arbeiten auf das Hautalterungsmodell ausgedehnt.

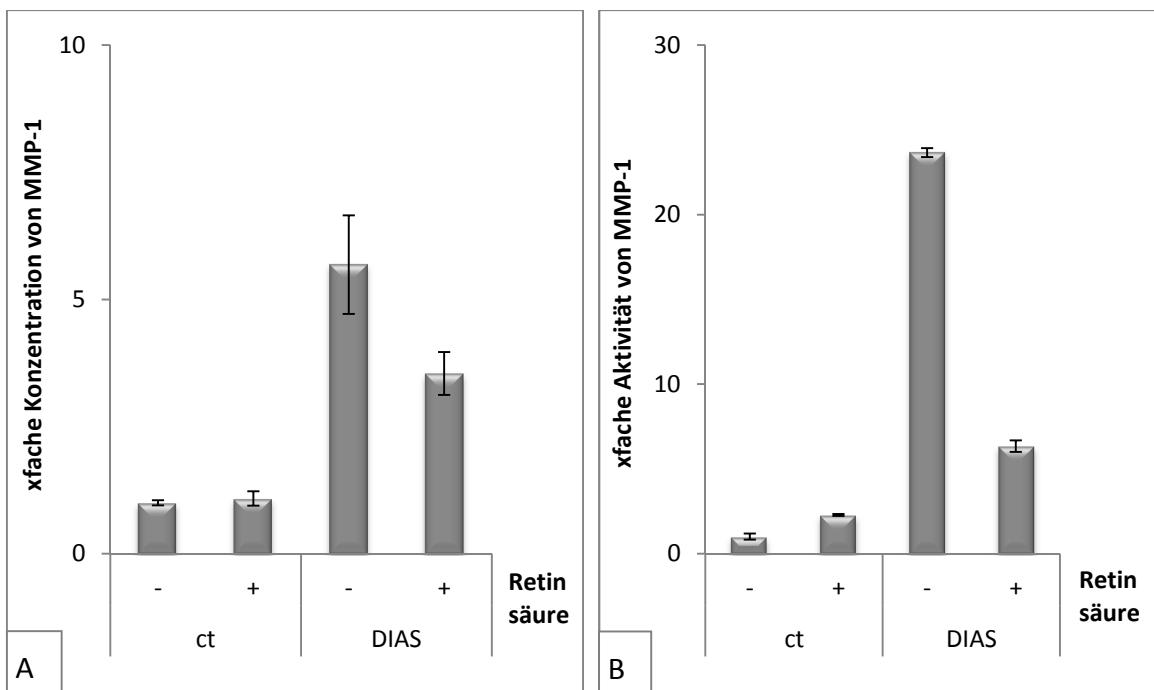


Abbildung 3.30: Einfluss von Retinsäure auf MMP-1 Subkonfluente Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit 10 nM Retinsäure vorinkubiert und anschließend entweder nicht weiter behandelt (ct) oder mit 200 nM Mitomycin-C (2 x 24 h) behandelt (DIAS). Eine Woche nach Beginn der Retinsäure-Behandlung wurden für 48 Stunden die Überstände gesammelt und anschließend die gleichen Volumina auf die Gesamtmenge an basalem Pro-MMP-1 (**A**) und auf die Aktivität von MMP-1 (**B**) untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung einer ausgewählten Messung aus zwei unabhängigen Versuchen (n=2).

Durch die Vorinkubation mit Retinsäure konnte sowohl die Konzentration als auch die Aktivität von MMP-1 bei den MMC-induziert seneszenten Fibroblasten (DIAS) verringert werden. Bei den mitotischen Fibroblasten (ct) hatte die Vorinkubation mit Retinsäure keinen signifikanten Effekt auf die Konzentration von MMP-1 (s. Abbildung 3.30 A, ct). Bei den MMC-induziert seneszenten Fibroblasten hingegen stieg die Konzentration an MMP-1 im Vergleich zu den unbehandelten Fibroblasten an (s. Abbildung 3.30 A, DIAS (-) Retinsäure). Dieser Anstieg der Konzentration an MMP-1 konnte jedoch durch die Vorinkubation mit Retinsäure um 40% verringert werden (s. Abbildung 3.30 A, DIAS (+) Retinsäure), im Vergleich zu den DIAS-Fibroblasten ohne Vorinkubation mit Retinsäure. Während die Aktivität von MMP-1 bei den mitotischen Fibroblasten durch die Vorinkubation mit Retinsäure leicht erhöht wurde (s. Abbildung 3.30 B, ct), konnte sie bei den DIAS-Fibroblasten um 75% verringert werden, im Vergleich zu den DIAS- Fibroblasten ohne Vorinkubation mit Retinsäure (s. Abbildung 3.30 B, DIAS). Durch die Vorinkubation replikativ gealterter Fibroblasten mit Retinsäure, konnte ebenfalls die Aktivität von MMP-1 um 50% verringert werden (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse machen deutlich, dass die MMC-induziert seneszenten Fibroblasten zugänglich für Anti-Aging-Effekte basierend auf einer Verringerung der Konzentration und der Aktivität an MMP-1 sind.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Induktion und Charakterisierung einer beschleunigten und dauerhaften Seneszenz in Hautfibroblasten und der Vergleich gemeinsamer Merkmale dieser induzierten Seneszenz mit der replikativen Seneszenz. Hayflick beschrieb 1961 erstmals die replikative Seneszenz (Hayflick & Moorhead, 1961), welche durch das Beenden der Teilungsaktivität charakterisiert und von morphologischen, biochemischen und molekularbiologischen Veränderungen begleitet wird (Cristofalo & Pignolo, 1993). Mit Hilfe der replikativen Seneszenz kann auf zellulärer Ebene der Prozess des Alterns untersucht werden, sodass auf Grundlage der Substanz-induzierten, beschleunigten und dauerhaften Seneszenz ein dreidimensionales Hautalterungsmodell entwickelt werden sollte, welches charakteristische Merkmale *in vivo* gealterter Haut zeigt.

4.1 ROS induziert nur in Kombination mit DNA-Schäden dauerhafte Seneszenz

In der Literatur sind zahlreiche Substanzen beschrieben, die eine vorübergehende vorzeitige Seneszenz induzieren können (s. Tabelle 1.1). Gemäß der von Harman formulierten Theorie der freien Radikale, würde Altern hauptsächlich durch Schäden hervorgerufen, die durch reaktive Sauerstoffspezies in den Zellen entstehen (Harman, 1956). Die Freie-Radikal-Theorie des Alterns ist in der Wissenschaft weit verbreitet, allerdings wird sie zunehmend kritisch diskutiert.

Die Befürworter beschreiben eine erhöhte Menge an reaktiven Sauerstoffspezies in replikativ gealterten Fibroblasten (Hutter et al., 2002), Keratinozyten (Bernard et al., 2004) oder Endothelzellen (Haendeler et al., 2004) und eine verlängerte Lebensdauer *in vitro*, durch die Absenkung des Sauerstoffgehalts von 20% auf 3% (Packer & Fuehr, 1977). Außerdem konnten Antioxidantien *in vitro* den Beginn der Seneszenz hinaus zögern (Atamna et al., 2000) und den Telomerverlust verringern (Kashino et al., 2003), sodass durch die Behandlung mit Antioxidantien wie z.B. Aspirin, die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität in den Endothelzellen verringert und in Folge dessen die SA- β -Gal-Aktivität reduziert, sowie eine erhöhte Telomerase-Aktivität beobachtet werden konnten (Bode-Boger et al., 2005). NAD(P)H-Oxidase reduziert Sauerstoff zu Superoxidanion und spielt unter anderem bei der Regulation des Zellzyklus' eine wichtige Rolle, da sie den Übergang von der G1-Phase zur S-Phase und von der G2-Phase zur M-Phase reguliert. Durch Diphenyleneiodium (DPI) konnte ebenfalls die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität *in vitro* gehemmt werden, wodurch es zu einer Verzögerung beim Übergang von der G1- in die S-

Phase kam (Venkatachalam et al., 2008). Basierend auf der Freien-Radikal-Theorie und bestätigt von diesen Ergebnissen, gibt es zahlreiche Veröffentlichungen, die durch oxidativen Stress in Form von H₂O₂ eine vorzeitige Seneszenz (SIPS) beschreiben (Chen et al., 1998; Toussaint et al., 2000; Frippiat et al., 2001). Durch die Behandlung von Fibroblasten mit subtoxischen Konzentrationen an H₂O₂ wurde in den genannten Veröffentlichungen eine vorzeitige Seneszenz über einen Zeitraum von drei Tagen induziert. Es wird beschrieben, dass sich ein Teil der Fibroblasten innerhalb von 16-32 Stunden nach der Behandlung ablöste und nur die verbliebenen Fibroblasten seneszent wurden. Diese Seneszenz wurde jedoch lediglich über einen Zeitraum von drei Tagen nach der Behandlung beobachtet, sodass nicht bekannt ist, wie sich diese Fibroblasten über den genannten Zeitraum hinaus verhalten. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigten deutlich, dass durch H₂O₂ eine vorzeitige Seneszenz induziert werden konnte, welche in den ersten drei Tagen nach der Behandlung von charakteristischen Merkmalen wie z.B. einem Proliferationsstopp, dem Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies und einer veränderten Zellmorphologie begleitet wurde. 14 Tage nach der Behandlung waren jedoch sowohl der Proliferationsstopp, als auch die veränderte Zellmorphologie aufgehoben und die Zellen entwickelten wieder ihren mitotischen Charakter. Da dieser Rückgang des seneszenten Status der Zelle parallel mit der Abnahme an reaktiven Sauerstoffspezies stattfand, wurde deutlich, dass es sich bei der H₂O₂-induzierten Seneszenz um eine transiente, ROS-abhängige Seneszenz handelt. Die Abhängigkeit von reaktiven Sauerstoffspezies zur vorzeitigen Induktion einer Seneszenz mit H₂O₂ wurde ebenfalls von Duan et. al beschrieben. Dieser induzierte zwar durch die Behandlung mit H₂O₂ eine Seneszenz über 14 Tage, allerdings nur unter der Bedingung, dass die Fibroblasten über den gesamten Zeitraum mit H₂O₂ behandelt wurden und somit permanent oxidativem Stress ausgesetzt waren (Duan et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass oxidativer Stress alleine nicht ausreicht, um eine dauerhafte Seneszenz zu induzieren und stehen im Einklang mit vielen Veröffentlichungen, die sich kritisch über die Relevanz von oxidativem Stress als alleinige Ursache des Alterungsprozesses äußern. Gems und Doonan inaktivierten beispielsweise die Superoxiddismutase (SOD) als zentrales antioxidatives Enzym der Mitochondrien in *C. elegans*, konnten jedoch keine verlängerte Lebensdauer feststellen (Gems & Doonan, 2009). Außerdem wurde trotz zahlreicher Studien mit Antioxidantien kein Erfolg bezüglich einer verlängerten Lebensdauer bei Säugetieren beobachtet (Huang et al., 2000). Gene für antioxidative Enzyme wie SOD1, SOD2 oder Katalase verringerten in diesen Studien zwar die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies, zeigten jedoch keinen Einfluss auf die Lebensdauer der Mäuse (Perez et al., 2009; Salmon et al., 2010). Des Weiteren produziert der Nacktmull als das langlebigste Nagetier große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies, wodurch nachweislich vermehrt oxidative Schäden an Proteinen, Lipiden und der DNA auftreten (Sanz & Stefanatos, 2008) und lebt trotzdem mit einem durchschnittlichem

Alter von 35 Jahren extrem lang, im Vergleich zu anderen Nagetieren seiner Größe (Pérez et al., 2009). Der oxidative Stress steigt zweifelsfrei im Alter an, aber die grundlegende Idee, dass oxidativer Stress allein ursächlich für den Alterungsprozess verantwortlich ist, kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, sodass oxidativer Stress allein nicht für die Induktion einer beschleunigten und dauerhaften Seneszenz geeignet ist. Vielmehr sollte eine Kombination aus verschiedenen Alterungstheorien in Betracht gezogen werden, um die Mechanismen des Alterns zu klären. Da neben dem oxidativen Schaden auch DNA-Schäden als wesentliche Ursache für den Alterungsprozess angesehen werden, wurden DNA alkylierende Substanzen auf die Fähigkeit hin untersucht, eine beschleunigte Seneszenz induzieren zu können.

Alkylierende Substanzen gehören zu den häufigsten Umweltgiften in unserer Umgebung, vor denen sich der Organismus nur in geringem Maße schützen kann. Die Alkylierung der DNA führt am Häufigsten zur Anlagerung einer Methylgruppe an der siebten Position des Guanins (N^7 -meGua) oder an das Phosphatrückgrat der DNA. Weniger häufig, dafür aber umso toxischer ist der Einbau einer Methylgruppe an der sechsten Position des Guanins (O^6 -meGua). Diese Form wird oft durch Sekundärreaktionen der DNA mit Metaboliten oder anderen Toxinen, wie z.B. Zigarettenrauch ausgelöst. In Zellkulturexperimenten konnte durch die Inkubation mit Zigarettenrauch ein senescenter Status in Lungenfibroblasten induziert werden (Nyunoya et al., 2006). Zusätzlich zu *in vitro* Studien wurden Lungenfibroblasten von Emphysem-Patienten im Vergleich zu gesunden Rauchern vermehrt positiv auf SA- β -Galaktosidase angefärbt (Muller et al., 2006) und zeigten eine erhöhte Expression an p21 und p16 (Tsuji et al., 2006). Neben dem Zigarettenrauch als exogenes Gift, gibt es eine Vielzahl von Publikationen, die eine vorzeitige Seneszenz durch die Behandlung mit alkylierenden Substanzen induzieren konnten (Meng et al., 2003; Jaiswal et al., 2004; Probin et al., 2007). Darmkrebszellen wurden durch die Behandlung mit Methylnitronitrosoguanin, welches Methylgruppen an der sechsten Position des Guanins einbaut, in eine vorzeitige Seneszenz überführt (Jaiswal et al., 2004) und Fibroblasten zeigten zahlreiche Seneszenzmarker nach der Behandlung mit Methylmethansulfonat (Suh et al., 2001) oder Busulfan (Meng et al., 2003; Probin et al., 2007). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass nicht nur oxidativer Stress in der Lage ist, eine vorzeitige Seneszenz zu induzieren, sondern dass die Alkylierung der DNA ein wesentlicher Mechanismus auf dem Weg zu einer seneszenten Zelle zu sein scheint. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Busulfan und Mitomycin-C ausgewählt, um herauszufinden, ob eine dauerhafte Seneszenz mit Hilfe dieser DNA alkylierenden und ROS-produzierenden Substanzen induziert werden kann.

Sowohl durch die Behandlung mit Busulfan, als auch mit Mitomycin-C konnte ein dauerhafter Proliferationsstop und eine stabile Veränderung der Zellmorphologie als Merkmale einer seneszenten Zelle auch noch nach 14 Tagen beobachtet werden, obwohl

der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies nach 14 Tagen nicht mehr signifikant erhöht war. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass ROS alleine nicht ausreichen um eine dauerhafte Seneszenz zu induzieren. Vielmehr ist ein zweiter Stimulus wie z.B. ein DNA-Schaden durch alkylierende Substanzen wie Busulfan oder Mitomycin-C notwendig, um den seneszenten Charakter der Fibroblasten dauerhaft aufrecht zu erhalten. Inwiefern diese induzierte und beschleunigte Seneszenz mit der replikativen Seneszenz vergleichbar ist, wurde in den nächsten Experimenten untersucht.

4.2 Mitomycin-C induziert eine dauerhafte Seneszenz im Zeiträffer

Allgemein ist die Annahme akzeptiert, dass verschiedene hochkomplexe und vielfach noch ungeklärte Mechanismen für das Altern verantwortlich sind. Daher ist es sinnvoll, für die beschleunigte Induktion des Alterungsprozesses eine Substanz zu verwenden, die mehrere mögliche Ursachen des Alterns gleichzeitig umfasst. Da Mitomycin-C (MMC) sowohl zu einer Alkylierung der DNA führen kann, als auch oxidativen Stress induziert (Tomasz & Palom, 1997) und somit zwei wesentliche Ursachen des Alterungsprozesses einbezieht, wurde das Potential von MMC zur Induktion einer beschleunigten und dauerhaften Seneszenz untersucht (DIAS). Diese MMC-induzierte Seneszenz wurde anhand verschiedener Marker mit der replikativen Seneszenz verglichen. Einer der wichtigsten Marker von seneszenten Zellen ist der Proliferationsstopp, welcher von morphologischen, biochemischen und molekularbiologischen Veränderungen begleitet wird (Cristofalo & Pignolo, 1993; Serrano & Blasco, 2001).

4.2.1 Aktivierung von p53 durch Mitomycin-C führt zu einem Proliferationsstopp

Der Zellzyklusstopp und die Unfähigkeit auf Wachstumsstimulatoren zu reagieren sind die ersten und markantesten Merkmale für eine senescente Zelle (Hayflick, 1965; Cristofalo & Pignolo, 1993). Der normal ablaufende Zellzyklus setzt die Synthese neuer DNA voraus, welche mit Hilfe des BrdU-Einbaus quantifiziert werden kann. In replikativ seneszenten Zellen findet keine DNA-Synthese statt, sodass die Zellen nicht in der Lage sind, BrdU einzubauen (Honda et al., 2002). Die Analyse des BrdU-Einbaus in dieser Arbeit zeigte, dass die Proliferation der Fibroblasten nach der Behandlung mit Mitomycin-C genauso gestoppt wurde wie bei replikativ gealterten Fibroblasten. Dieser Proliferationsstopp konnte sowohl durch die Behandlung mit Mitomycin-C im Monolayer, als auch durch die Behandlung der Fibroblasten im 3D-Hautmodell nachgewiesen werden. Des Weiteren werden replikative Marker wie z.B. PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) oder Ki67,

welche ausschließlich in teilungsaktiven, nicht aber in seneszenten Zellen exprimiert werden, genutzt, um senescente Zellen *in vivo* und *in vitro* zu identifizieren (Fenton et al., 2001). Die Immunfluoreszenzfärbung des Kernproteins Ki67 in der vorliegenden Arbeit zeigte ebenfalls deutlich, dass sowohl nach der Behandlung mit Mitomycin-C im Monolayer, als auch im 3D-Hautmodell, ein Proliferationsstopp induziert wurde, wie er bei replikativ gealterten Fibroblasten vorzufinden ist. Mit Hilfe einer Wachstumskurve wurde außerdem beobachtet, dass der Proliferationsstopp sowohl bei replikativ seneszenten (RS) als auch bei MMC-induziert seneszenten Fibroblasten (DIAS) dauerhaft stabil war und von einer erhöhten p53-Aktivität begleitet wurde. Die erhöhte Aktivität von p53 konnte sowohl bei den DIAS-Fibroblasten aus dem Hautmodell, als auch bei den im Monolayer mit MMC behandelten Fibroblasten nachgewiesen werden, sodass möglicherweise induzierte DNA-Schäden für den Zellzyklusarrest verantwortlich sind. DNA-Schäden aktivieren ein komplexes regulatorisches Netzwerk an den Kontrollpunkten des Zellzyklus, sodass dieser angehalten und die DNA gegebenenfalls repariert werden kann oder der natürliche Zelltod eingeleitet wird (Weinert, 1998). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnte beobachtet werden, dass die Ausprägung des Arrests zwischen replikativ seneszenten und durch MMC-Behandlung induziert seneszenten Fibroblasten unterschiedlich war. Die DIAS wurden in der G2-Phase des Zellzyklus arretiert, wohingegen sich replikativ gealterte Fibroblasten in der G1-Phase befanden. In der Literatur wird beschrieben, dass aktiviertes p53 aufgrund unterschiedlicher Cyclinexpressionen sowohl für einen Arrest in der G1-Phase, als auch für einen G2-Arrest verantwortlich sein kann (Agarwal et al., 1995).

Für die Kontrolle des Zellzyklus werden hauptsächlich p53, p21 und das Retinoblastom-Protein (Rb) verantwortlich gemacht. Das Rb kontrolliert den Übergang von der G1 in die S-Phase, nachdem es durch cyclinabhängige Kinasen (CDK2/4/6) über eine Phosphorylierung aktiviert wurde. Replikativ gealterte Fibroblasten besitzen deutlich weniger CDK2, wodurch das Rb nicht aktiviert werden kann und somit der Übergang von der G1 in die S-Phase nicht eingeleitet wird (Alcorta et al., 1996). Es ist erwiesen, dass die Unfähigkeit zur Phosphorylierung des Rb's den Übergang von der G1 in die S-Phase verhindert und die Zellen über einen G1-Arrest in die replikative Seneszenz geführt werden (Stein et al., 1990). Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit überein, bei der mit Hilfe der Durchflusszytometrie ebenfalls ein G1-Arrest für replikativ gealterte Fibroblasten nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wird beschrieben, dass p53-defiziente Mäuse nicht seneszent werden (Harvey et al., 1993) und Mäuse mit einer Überexpression von p53 Symptome vorzeitiger Alterung entwickeln (Tyner et al., 2002). Neben dem Rb scheint also auch p53 eine zentrale Rolle beim Alterungsprozess zu spielen. Es wird vermutet, dass ein kritisch verkürzter 3'-Überhang der Telomere für die Aktivierung von p53 bei der replikativen Seneszenz verantwortlich ist (Stewart et al., 2003). Andere Studien haben gezeigt, dass DNA-

Schäden auf den Telomeren für die Aktivierung von ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) verantwortlich sind (Herbig et al., 2004), welches p53 direkt über Phosphorylierung oder indirekt über die Phosphorylierung von Chk1/2 aktivieren kann (s. Abbildung 4.1) (Chehab et al., 2000).

Mitomycin-C ist ein S-Phase abhängiges Mutagen und wirkt direkt auf die DNA indem sie quervernetzt wird. Die daraus resultierenden DNA-Doppelstrangbrüche aktivieren dauerhaft einen p53-abhängigen Signalweg (Islaih et al., 2005), welcher über verschiedene Mechanismen (s. Abbildung 4.1), wie z.B. die Aktivierung von ATM und ATR, zu einem Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase führt (Franchitto et al., 1998; Bae et al., 2008). In nicht gestressten Zellen ist der CyclinB-CDK1-Komplex für den Übergang von der G2 in die Mitosephase verantwortlich. Da Mitomycin-C ein S-Phase abhängiges Mutagen ist, erreicht geschädigte DNA die G2-Phase des Zellzyklus und stellt damit ein hohes Risiko für den Organismus dar. Die Zelle hat jedoch unterschiedliche Mechanismen entwickelt (s. Abbildung 4.1), durch die sie eine Aktivierung des CyclinB-CDK1-Komplex verhindert und den Übergang in die Mitosephase blockiert (Taylor et al., 1999). Das zentrale Protein dieser Abwehrmechanismen ist genauso wie beim G1-Arrest der replikativen Seneszenz p53. Durch die Behandlung mit Mitomycin-C wurde p53 in der vorliegenden Arbeit aktiviert, sodass es möglicherweise über die Inaktivierung des CyclinB-CDK1-Komplexes zu dem beobachteten Zyklusarrest in der G2-Phase gekommen ist.

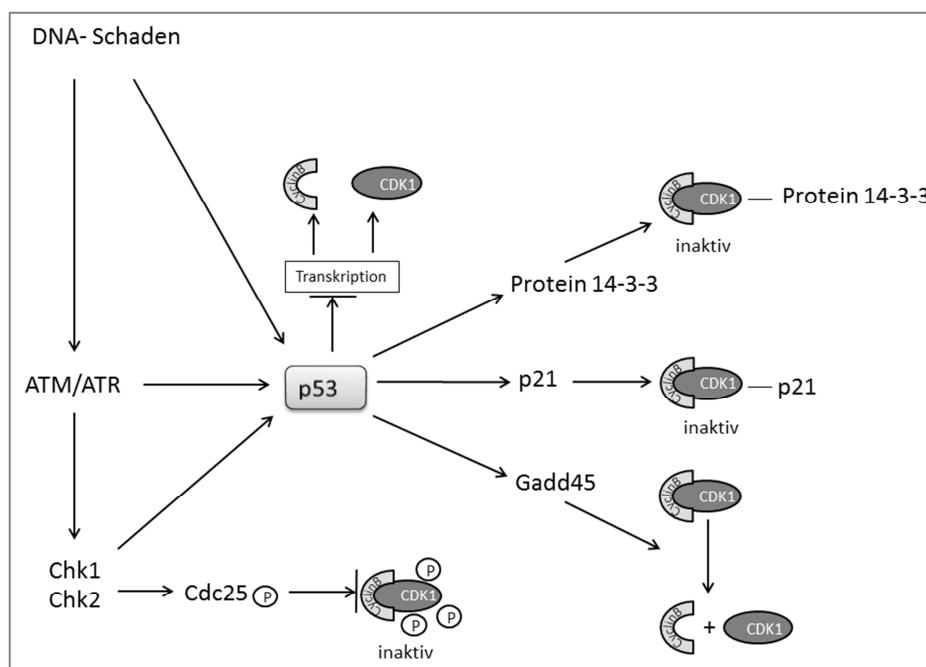


Abbildung 4.1: Regulation des G2/M-Übergangs durch p53 nach DNA-Schädigung In Folge eines DNA-Schadens werden über die Aktivierung von p53 als zentrales Protein einer DNA-Schadens-Antwort unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert, welche den Zellzyklus stoppen können. Der Übergang von der G2- in die Mitose-Phase wird dabei durch den CyclinB-CDK1-Komplex gesteuert, welcher in Folge der p53-Aktivierung über unterschiedliche Folgereaktionen inaktiviert werden kann, wodurch der Übergang in die Mitosephase verhindert wird.

p53 nimmt bei der Regulation des Zellzyklus die zentrale Rolle ein und kann auf der einen Seite sowohl zum G1-Arrest bei den replikativ seneszenten Fibroblasten, als auch zu einem G2-Arrest bei den MMC-induziert beschleunigt seneszenten Fibroblasten führen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Angaben der Literatur, in der aufgrund unterschiedlicher Cyclinexpressionen für replikativ senescente Zellen ein G1-Arrest beschrieben ist (Stein & Dulic, 1995; McConnell et al., 1998; Pignolo et al., 1998) und durch die Behandlung mit Mitomycin-C die Induktion eines G2-Arrests beobachtet werden konnte (Tomasz et al., 1988; Feilotter et al., 1992; Paz et al., 1999).

4.2.2 Induktion von morphologischen Veränderungen durch Mitomycin-C

Auf zellulärer Ebene ist ein weiteres wichtiges Kennzeichen senescenter Fibroblasten die morphologische Veränderung der Zelle. Die auffälligste Modifikation ist die sichtbare Zunahme der Zellgröße, welche durch ein abgeflachtes Aussehen des Zytosplasmas begleitet wird, dessen Ursache in einer Reorganisation des Zytoskeletts liegt (Nishio et al., 2001). In replikativ seneszenten Fibroblasten ist die Synthese von Vimentin 4-fach erhöht, im Vergleich zu mitotischen Fibroblasten, (Nishio et al., 2001). Außerdem sind die Vimentin-Filamente in seneszenten Fibroblasten zu dicken Faserbündeln verknüpft, während sie in mitotischen Fibroblasten dünne Fasern bilden. Dadurch entstehen unter anderem die morphologischen Veränderungen, die zu einer vergrößerten Zellform führen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten ebenfalls, dass die Zellgröße sowohl bei den replikativ gealterten Fibroblasten (RS), als auch bei den MMC-induziert seneszenten Fibroblasten (DIAS) im Vergleich zu den mitotischen Fibroblasten um ein 10-faches erhöht wurde. Diese Zunahme der Zellgröße konnte sowohl bei den DIAS-Fibroblasten im Monolayer beobachtet werden, als auch bei den isolierten Fibroblasten aus dem MMC-behandelten Hautmodell. Die morphologischen Veränderungen äußern sich neben der vergrößerten Zellform durch ein stark vakuolisiertes Zytoplasma (Kurz et al., 2000), einen zunehmend zentral lokalisierten, stark vergrößerten Zellkern (Mitsui & Schneider, 1976; Mehta et al., 2007) und eine pleiomorphe Zellform. Die Zellmorphologie der mitotischen Fibroblasten die in dieser Arbeit verwendet wurden, zeichnete sich durch eine spindelförmige Zellform, mehrheitlich mit Ausbuchtungen rund um den Zellkern aus. Typische morphologische Kennzeichen der seneszenten Fibroblasten dieser Arbeit waren neben der Vergrößerung der Zelloberfläche ein flacher, ovaler Zellkern, welcher ebenfalls stark vergrößert war. Diese Veränderungen konnten sowohl bei den replikativ seneszenten (RS), als auch bei den DIAS-Fibroblasten beobachtet werden. Die seneszenten Fibroblasten zeigten diese Merkmale sowohl durch die Behandlung mit MMC im Monolayer, als auch im dreidimensionalen Hautmodell. Es wird diskutiert, dass Caveolin-1 eine wichtige Rolle bei den morphologischen Veränderungen in seneszenten Zellen spielt, da Caveolin-1 in der Lage ist, signalübertragende Proteine der fokalen

Adhäsion wie z.B. FAK (*focal adhesion kinase*) oder die Ausbildung von Aktinfilamenten zu regulieren. Durch eine Hemmung der Caveolinexpression wurden fokale Adhäsionskomplexe und Aktinfilamente zerstört und in Folge dessen die morphologischen Veränderungen einer seneszenten Zelle aufgehoben (Cho et al., 2003; Cho et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass durch die Behandlung mit Mitomycin-C anhand einer starken Vergrößerung der Zellfläche und einer veränderten Morphologie ergänzend zum Wachstumsarrest, sowohl im Monolayer, als auch im 3D-Hautmodell weitere zelluläre Merkmale replikativer Seneszenz induziert werden konnten.

4.2.3 Positiver SA- β -Gal-Nachweis in MMC-behandelten Fibroblasten

Der am weitesten verbreitete Biomarker für senescente Zellen ist der SA- β -Gal-Assay (*senescence-associated- β -galactosidase-assay*), welcher einen blauen perinuklearen Niederschlag in positiven Zellen zeigt (Dimri et al., 1995). β -Galaktosidase ist eine ubiquitäre Hydrolase der Lysosomen, welche die Hydrolyse der glykosidischen Bindung katalysiert und dadurch endständige β -D-Galaktose abbaut. Die maximale Aktivität der β -Galaktosidase liegt im sauren pH-Bereich (pH 3-5). Der SA- β -Gal-Assay wurde 1995 zum ersten Mal zur Identifizierung senescenter Zellen beschrieben. Bei optimalen pH-Bedingungen (pH 4) zeigten sowohl mitotische, als auch senescente Fibroblasten einen blauen Niederschlag, bei nicht optimalen Bedingungen (pH 6) konnte lediglich in seneszenten Zellen, nicht aber in immortalisierten Zellen ein blauer Niederschlag detektiert werden (Dimri et al., 1995). In dieser Arbeit konnte sowohl bei replikativ seneszenten, als auch bei MMC-behandelten Fibroblasten im Monolayer ein blauer Niederschlag bei pH 6.0 nachgewiesen werden, nicht jedoch bei den mitotischen Fibroblasten. Durch Isolierung der Fibroblasten aus dem Hautmodell konnte im Vergleich zu den isolierten, unbehandelten Fibroblasten ebenfalls eine stärkere Blaufärbung bei den Fibroblasten detektiert werden, welche im 3D-Hautmodell mit MMC behandelt wurden. Letztere zeigten jedoch vereinzelt SA- β -Gal-positive Zellen, was darauf hin deutet, dass die in einer dreidimensionalen Struktur kultivierten mitotischen Fibroblasten bereits eine Art Differenzierung vollzogen. Diese wurde von Bayreuther bereits in Zellkulturexperimenten beschrieben (Bayreuther, 1988) und ähnelt einem seneszenten Phänotyp, sodass es bei diesen Zellen vereinzelt zu einer Aktivität von SA- β -Galaktosidase mit anschließender Blaufärbung kommen kann. Mit zunehmender Kultivierungsdauer der seneszenten Zellen im Monolayer kam es zu einer Akkumulation der β -Galaktosidase (Daten nicht gezeigt (Diekmann, 2013)) und die Blaufärbung der Zellen wurde intensiver. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Theorie von Dimri, welcher den Anstieg der lysosomalen Masse und Aktivität in seneszenten Zellen für die Aktivitätsbestimmung im suboptimalen pH-Bereich verantwortlich gemacht hat (Dimri et al., 1995). Die Autoren vermuteten, dass der Anstieg der lysosomalen Masse und Aktivität in seneszenten Zellen

die Menge an β -Galaktosidase erhöht, wodurch die Aktivität im suboptimalen pH-Bereich detektiert werden konnte. Seit der ersten Beschreibung 1995 wird die Verwendung des Assays kontrovers diskutiert (Severino et al., 2000; Cristofalo, 2005). Verschiedene Arbeitsgruppen berichteten, dass sie mit Hilfe des SA- β -Gal-Assays seneszente Zellen *in vivo* identifizieren konnten (van der Loo et al., 1998; Sigal et al., 1999), gleichzeitig berichteten Krishna et al. über die Aktivität von SA- β -Gal in Lungenkarzinom-, Kolonkarzinom-, Leukämie- und Leberkrebs-Zellen (Krishna et al., 1999). Außerdem konnte eine TGF- β -induzierte Expression von SA- β -Gal-Aktivität in Epithelzellen beobachtet werden, welche nicht von einem Wachstumsarrest begleitet wurde (Untergasser et al., 2003). Es wird deutlich, dass die SA- β -Gal-Aktivität kein spezifischer Marker für Seneszenz ist, jedoch in Kombination mit anderen Hinweisen auf eine senescente Zelle durchaus unterstützend betrachtet werden kann.

Durch den Nachweis der SA- β -Gal-Aktivität in RS und in DIAS konnte ein weitere Hinweis gefunden werden, welcher in Kombination mit dem Wachstumsarrest und der vergrößerten Zellform, auf einen seneszenten Status der Zelle nach der Behandlung mit Mitomycin-C schließen lässt.

4.2.4 Mitomycin-C induziert oxidativen Stress und steigert die MMP-1-Expression

Reaktive Sauerstoffspezies können in der Zelle zahlreiche Folgereaktionen auslösen, sodass durch die Behandlung mit Mitomycin-C ein Redoxstatus induziert werden sollte, wie er auch bei den replikativ gealterten Fibroblasten in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. MMC produziert während der metabolischen Aktivierung Superoxidanion (s. Abbildung 1.5), in Folge dessen konnte in den ersten fünf Tagen nach der Behandlung ein vergleichbarer Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in den MMC-behandelten Zellen nachgewiesen werden, wie bei den replikativ gealterten Fibroblasten. Der Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies zeigte sich sowohl nach der MMC-Behandlung der Fibroblasten im Monolayer, als auch im dreidimensionalen Hautmodell. Reaktive Sauerstoffspezies lösen in der Zelle zahlreiche Folgereaktionen, wie z.B. die Induktion entzündungsfördernder Proteine aus, welche von einer veränderten Wundheilung und Geweberneuerung in alter Haut begleitet werden (Millis et al., 1992). Bei der Wundheilung sind die Entwicklung, das Wachstum und die Erneuerung des Gewebes von der Produktion extrazellulärer Matrixproteinen abhängig (Roy et al., 2006). Fibroblasten spielen dabei eine besondere Rolle, da sie die wesentlichen Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM), wie z.B. Kollagen oder Fibronectin produzieren und das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau kontrollieren. Für den Erhalt dieses Gleichgewichts ist es wichtig, dass es neben der Produktion auch zu einem Abbau der EZM kommt, wofür die Zelle zwei Möglichkeiten entwickelt hat: die intrazelluläre

Phagozytose, welche abhängig von der $\alpha 2$ -Integrin-Expression ist (Riikonen et al., 1995) und der extrazelluläre Abbau durch Matrix-Metalloproteinasen (Ravanti et al., 1999). Aufgrund der Tatsache, dass Matrix-Metalloproteinasen durch reaktive Sauerstoffspezies induziert werden können (Brenneisen et al., 2002), und zahlreiche Studien einen verminderten Kollagengehalt in alter Haut beobachten konnten (Montagna & Carlisle, 1979; Schmiegelow et al., 1986; Mays et al., 1990), wäre es besonders für den Aufbau eines Hautalterungsmodells wichtig, dass durch die MMC-Behandlung ebenfalls die Produktion von Matrix-Metalloproteinasen induziert wird. Matrix-Metalloproteinasen sind zinkabhängige Endopeptidasen, die zu einem umfassenden proteolytischen System gehören, dessen Regulation sowohl auf Proteinebene durch Aktivatoren und Inhibitoren, als auch auf transkriptioneller Ebene erfolgt (Sternlicht & Werb, 2001).

Bei *in vivo* gealterter Haut führt UV-Licht überwiegend durch die Aktivierung der stressaktivierten *Janus Proteinkinase* (JNK) zu einer verstärkten Expression von MMP's (Korzu et al., 1997). Diese Beobachtung konnte durch Zellkulturexperimente bestätigt werden, in denen Brenneisen et al. herausfanden, dass Fibroblasten als Reaktion auf UV-Strahlung vermehrt *c-Jun* produzieren, welches in Kombination mit *c-Fos* den aktivierte AP-1 Komplex bilden, der in Folge dessen an den Promotor verschiedener MMP's bindet und deren Transkription induziert (Brenneisen et al., 2002). Aktuelle Studien zeigen, dass alte Zellen weniger antioxidative Fähigkeiten besitzen als junge, mitotische Zellen, wodurch es zu einem erhöhten ROS-Level und in Folge dessen ebenfalls über den AP-1 Komplex, zu einer erhöhten MMP-Produktion kommt (Sohal et al., 1993; Barnett & King, 1995; Koch et al., 2009). Neben der Aktivierung von MMP's über ROS, belegten Dong et al., dass auch DNA-Schäden in der Lage sind, die Freisetzung von MMP's zu induzieren (Dong et al., 2008). Dong bestrahlte menschliche Haut mit UV-B und wies in Folge dessen eine erhöhte Expression an MMP-1 nach, welche durch die Zugabe von DNA-Reparatur-Enzymen verringert werden konnte. Dadurch belegte er, dass DNA-Schäden ebenfalls in der Lage sind, die Freisetzung von MMP's zu veranlassen. Die MMC-Behandlung der Fibroblasten im Monolayer und im Hautmodell induzierte eine signifikante Steigerung der Expression an MMP-1 und erhöhte diese in gleichem Maße, wie es bei den replikativ seneszenten Fibroblasten gemessen werden konnte. Diese Steigerung kann sowohl eine Folge des erhöhten ROS-Gehalts, als auch des alkylierenden DNA-Schadens in der Zelle sein (Kim et al., 2004; Dasgupta et al., 2010; Johnson et al., 2012). Die Sekretion der Matrix-Metalloproteinasen erfolgt in einer latenten Proenzymform, welche extrazellulär durch die Zerstörung einer Cystein-Zink-Wechselwirkung aktiviert wird. Die Zerstörung dieser Cystein-Zink-Wechselwirkung kann z.B. über oxidiertes Glutathion, pH-Veränderungen, Hitze oder reaktive Sauerstoffspezies eingeleitet werden (Amalinei et al., 2007). Die Analyse der Überstände von den isolierten Fibroblasten aus dem Hautmodell zeigte deutlich, dass die Aktivität von MMP-1 nach der MMC-Behandlung der Hautmodelle deutlich höher war, als die der unbehandelten Hautmodelle. Diese

Aktivitätssteigerung kann durch den erhöhten ROS-Gehalt in den MMC-behandelten Fibroblasten erklärt werden, da ROS in der Lage sind, die Cystein-Zink-Verbindung zu zerstören (Ranganathan et al., 2001). Durch die Behandlung mit Mitomycin-C konnte folglich sowohl im Monolayer, als auch im Hautmodell die Produktion an MMP-1 gesteigert werden, sodass ein weiteres Merkmal replikativ gealterter Fibroblasten induziert werden konnte, welches vor allem für den Aufbau eines dreidimensionalen Hautalterungsmodells sehr wichtig ist (s. Kapitel 4.3.3).

4.3 Hautalterungsmodell: Kennzeichen einer *in vivo* gealterten Haut

Alterung gewinnt aufgrund der steigenden Lebenserwartung immer mehr an gesellschaftlicher Bedeutung. Der Alterungsprozess ist ein komplexer Mechanismus, der eine Akkumulation von Mutationen und toxischen Metaboliten, die Bildung freier Radikale, sowie chemische Veränderungen diverser Makromoleküle beinhaltet. Die Haut eignet sich besonders gut, um den Prozess der Alterung zu studieren, da sie sowohl intrinsischen, als auch extrinsischen Faktoren ausgesetzt ist. Durch die Isolierung von Hautzellen aus Biopsien ist es möglich, diese zu kultivieren und für die Rekonstruktion eines dreidimensionalen Hautmodells *in vitro* zu nutzen. Diese rekonstruierten Hautmodelle stellen zunehmend eine Alternative zu *in vivo* Studien dar und werden erfolgreich für Untersuchungen von löslichen Substanzen, wie z.B. Retinsäure eingesetzt (Asselineau et al., 1989). Der Einsatz von dreidimensionalen Hautmodellen hat den großen Vorteil, dass gleichzeitig die Reaktion von Fibroblasten und Keratinozyten untersucht werden kann und auch deren Interaktion berücksichtigt wird. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Fortschritte bei der Entwicklung dreidimensionaler Hautmodelle gemacht (Boyce, 1996), dennoch ist es immer noch nicht gelungen, ein Hautalterungsmodell zu etablieren. Derzeit werden hauptsächlich zwei Ansätze verfolgt. Eine Möglichkeit besteht darin, das Hautmodell mit jungen, mitotischen Fibroblasten anzufertigen und anschließend einem potentiellen Hautalterungsmechanismus wie z.B. UV-Strahlung auszusetzen (Methode A). Der Vorteil dieser Herangehensweise ist, dass man auch frühe Veränderungen der Alterung beobachten kann, ein Nachteil besteht allerdings darin, dass die UV-Schäden nur vorübergehend induziert werden konnten und die rekonstruierte Haut in der Lage war, diese Schäden mit der Zeit zu kompensieren (Bernerd & Asselineau, 1997). Außerdem spiegelt die UV-Strahlung nicht den kontinuierlichen Alterungsprozess wieder, wie er bei *in vivo* gealterter Haut vorzufinden ist. Um einen kontinuierlichen Prozess im Hautmodell zu simulieren, wurde ein potentieller Mechanismus der Hautalterung künstlich induziert und zwar über die gesamte Kultivierungsdauer des Hautmodells (Methode B). Der Nachteil dieser Methode

ist, dass lediglich ein spezieller Mechanismus der Alterung herausgegriffen wird, obwohl der Alterungsprozess von einer Vielzahl komplexer Mechanismen ausgeht. Ein Beispiel für diese kontinuierliche Veränderung in einem Hautmodell zur Induktion von Alterung ist die Glykierung. Die Glykierung, oder auch Glycation, ist ein Prozess, bei dem freie Aminogruppen ohne die Beteiligung von Enzymen mit Kohlenhydraten reagieren. Bei der Glykierung entstehen *Advanced Glycation Endproducts* (AGE's), wodurch Makromoleküle quervernetzt werden können, was wiederum eine Ursache der Alterung zu sein scheint (Frye et al., 1998). In der Haut betrifft die Glykierung hauptsächlich Makromoleküle wie Kollagen oder Elastin, wodurch mechanische Veränderungen der Haut im Alter erklärt werden können. Auf dieser Grundlage wurde ein Hautmodell entwickelt, bei dem die Kollagenmatrix vor der Einsaat der Fibroblasten glykiert wurde. Die Morphologie dieser Hautmodelle veränderte sich im Vergleich zu den Hautmodellen ohne glykiertes Kollagen und es konnten einige Marker gefunden werden, die charakteristisch für *in vivo* gealterte Haut sind. So stieg beispielsweise die Konzentration von MMP-1 an und die Verteilung der Integrine in der Epidermis veränderte sich (Pageon et al., 2007). Die Veränderungen in der Epidermis machen deutlich, dass die dermal-epidermale Interaktion beeinflusst wird, wenn die Fibroblasten in Kontakt mit glykiertem Kollagen kommen. Der große Nachteil dieses Modells ist jedoch, dass es lediglich die Glykierung als Mechanismus für die Alterung umfasst und damit nicht die *in vivo* Situation wieder spiegeln kann. Dafür wäre es sinnvoll, eine Kombination aus dem vorübergehenden akuten Altern, wie es durch die UV-Bestrahlung fertiger Hautmodelle induziert werden konnte und dem kontinuierlichen Altern zu etablieren.

Mitomycin-C induziert sowohl DNA-Schäden als auch oxidativen Stress und ist in der Lage eine dauerhafte Seneszenz auszulösen. Mitomycin-C stellt somit eine Kombination aus den beiden bisher beschriebenen Ansätzen dar. Auf der einen Seite handelt es sich um eine induzierte beschleunigte Alterung, sodass die anfänglichen Veränderungen untersucht werden können (Methode A). Auf der anderen Seite wurden die Veränderungen dauerhaft induziert (Modell B) und waren nicht reversibel, sodass die dermal-epidermale Kommunikation ständig unter modifizierten Bedingungen stattfand. Der Ansatz kombiniert somit die bisherigen Möglichkeiten, greift die jeweiligen Vorteile auf und verringert die Nachteile, da die induzierte Alterung durch MMC nicht reversibel ist und verschiedene Alterstheorien (DNA-Schadenstheorie und Freie-Radikal-Theorie) kombiniert.

Tabelle 4.1: Strategien zur Rekonstruktion eines *in vitro* Hautalterungsmodells

	Methode A	Methode B	Neue Methode
Vorteil	<ul style="list-style-type: none"> frühe Veränderungen können beobachtet werden 	<ul style="list-style-type: none"> spiegelt eine kontinuierliche Alterung wieder 	<ul style="list-style-type: none"> Frühe Veränderung nicht reversibel Mehrere Alterstheorien impliziert
Nachteil	<ul style="list-style-type: none"> keine kontinuierliche Alterung reversibel 	<ul style="list-style-type: none"> betrachtet nur <u>einen</u> möglichen Mechanismus 	
Beispiel	UV-Bestrahlung	Kollagen-Glykierung	Mitomycin-C

Durch die Isolierung der Fibroblasten sowohl aus dem unbehandelten Hautmodell, als auch aus dem Hautmodell welches mit Mitomycin-C behandelt wurde, konnten die Merkmale der Zellen direkt mit den Ergebnissen aus Monolayer-Experimenten verglichen werden. Alle untersuchten Merkmale einer replikativ seneszenten Zelle konnten ebenfalls bei den Fibroblasten gefunden werden, welche in der Matrix mit Mitomycin-C behandelt wurden. Die Behandlung führte gleichermaßen zu einer dauerhaften Inhibition des Zellzyklus, einer Erhöhung an intrazellulären ROS, einer Zunahme der Zellgröße, einer Veränderung des Differenzierungsmusters, einem Anstieg der Aktivität von SA- β -Galaktosidase, p53 und MMP-1 (s. Kapitel 3.3.3 und 3.3.4). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Behandlung mit Mitomycin-C sowohl im Monolayer, als auch im Gewebeverband erfolgreich eine beschleunigte Seneszenz induzieren und die replikative Seneszenz imitieren konnte, sodass der Aufbau eines dreidimensionalen Hautalterungsmodells mit Hilfe der Behandlung mit Mitomycin-C vielversprechend erscheint.

4.3.1 Verminderte Filaggrinexpression in MMC-behandelten Hautmodellen

Für den Aufbau eines dreidimensionalen Hautalterungsmodells ist es entscheidend, dass das Hautmodell selbst morphologische und biochemische Veränderungen zeigt, wie sie bei *in vivo* gealterter Haut beobachtet wurden. Insgesamt nimmt die Schichtdicke *in vivo* gealterter Haut ab, da sowohl die Epidermis als auch die Dermis dünner werden. Die Anzahl an Keratinozyten in der Epidermis und die *epidermale turnover rate* (= die Zeit, die von der Epidermis benötigt wird, um sich einmal komplett zu erneuern) nehmen im Alter ab (Fenske & Lober, 1986). Insgesamt steigt zwar die durchschnittliche Zellgröße der Keratinozyten, sie werden jedoch kürzer und dafür breiter (Grove, 1989), wodurch die Epidermis insgesamt dünner wird. Diese Veränderung konnte bei dem *in vitro*

Hautalterungsmodell nicht beobachtet werden. Anhand der HE-Färbung zeigten sich ähnliche Schichtdicken der Epidermis bei den MMC-behandelten Hautmodellen, wie die unbehandelten Modelle. Außerdem konnte *in vivo* beobachtet werden, dass der dermal-epidermal-Grenzbereich dünner wird und die Anzahl an papillären Fibroblasten von $40/\text{mm}^2$ auf $15/\text{mm}^2$ sinkt (Sudel et al., 2005). Die Folge davon ist ebenfalls eine dünnere Epidermis, sowie eine höhere Anfälligkeit für Verletzungen. Außerdem verringert sich die Kommunikation zwischen Dermis und Epidermis aufgrund einer geringeren Kontaktfläche, da sich die Reteleisten zurück bilden. Dadurch verschlechtert sich die Nährstoffversorgung der Epidermis, sodass die Keratinozyten weniger proliferieren und die *epidermale turnover rate* steigt (Sudel et al., 2005). Da die Reteleisten bei *in vitro* Hautmodellen nicht so stark ausgeprägt sind wie *in vivo*, bleibt die Kontaktfläche zwischen Dermis und Epidermis nahezu unverändert, sodass die Nährstoffversorgung der Epidermis konstant ist, woraus sich erklären lässt, weshalb die Epidermis bei dem Hautalterungsmodell *in vitro* nicht dünner wird. Zusätzlich zu einer geringeren Nährstoffversorgung sinkt auch der Wassergehalt des *stratum corneum* bei *in vivo* gealterter Haut. Diese Veränderung ist auf eine wechselhafte Zusammensetzung der Aminosäuren zurück zu führen, welche den *natural moisturizing factor* (NMF) verringert und dadurch die Fähigkeit zur Wasserspeicherung minimiert (Jackson et al., 1993). Der NMF setzt sich aus freien Aminosäuren zusammen und ist in der Lage, Wasser aus der Umgebung in der Haut zu binden. Die freien Aminosäuren entstehen zu 70% aus dem Abbau von Filaggrin (Scott et al., 1982). Filaggrin wird als Profilaggrin im *stratum granulosum* gebildet und wird während der Differenzierung der Keratinozyten zu aktivem Filaggrin degradiert. Aktives Filaggrin verknüpft über Disulfidbrücken Keratinfilamente und ist damit für die Strukturbildung der Epidermis mit verantwortlich. Wenn der Wasserhaushalt im *stratum corneum* zu gering ist, wird Filaggrin sofort in seine Aminosäuren abgebaut, wodurch der NMF steigt und die Haut mehr Wasser binden kann. In alter Haut konnte auf RNA-Ebene kein Abfall der Filaggrin-Expression nachgewiesen werden, in histologischen Schnitten zeigte sich jedoch deutlich, dass die Filaggrin-Konzentration in alter Haut abnimmt (Takahashi & Tezuka, 2004). Dieser Rückgang an Filaggrin konnte durch die immunfluoreszenz Färbung an den MMC-behandelten Hautmodellen ebenfalls nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Wassergehalt in dem Hautalterungsmodell unter einer kritischen Konzentration liegen könnte, sodass direkt der Abbau des Filagrins eingeleitet wird, so wie es auch für die *in vivo* gealterte Haut beschrieben ist. Dadurch würde der NMF wieder erhöht. Neben der Regulation der Hautfeuchtigkeit ist der NMF ebenfalls für die Elastizität der Haut mit verantwortlich. Hydratisierte NMF bilden ionische Bindungen zwischen Keratinfasern und reduzieren dadurch die intermolekularen Kräfte zwischen den einzelnen Fasern, wodurch die Elastizität in junger Haut steigt (Jokura et al., 1995). Bei *in vivo* gealterter Haut

hingegen sinkt die Elastizität und es wird vermutet, dass die verringerte Filaggrin-Konzentration dabei eine Rolle spielt (Seguchi et al., 1996).

4.3.2 Veränderung des elastischen Fasernetzwerks durch Mitomycin-C

Die Feuchtigkeit und Elastizität der Haut wird jedoch nicht nur von der Epidermis bestimmt. Die drei Hauptbestandteile der dermalen extrazellulären Matrix (EZM) sind Proteoglykane, Elastin und Kollagen, welche auf der einen Seite für die mechanische Festigkeit und auf der anderen Seite für die Elastizität der Haut mitverantwortlich sind. Proteoglykane haben einen Anteil von 0,1-0,3% am Trockengewicht der Haut und bilden eine heterogene Gruppe von Makromolekülen, bestehend aus jeweils einem Kernprotein mit kovalent gebundenen Glykosaminoglykanen (GAG's). Die GAG's werden sowohl von Keratinozyten, als auch von Fibroblasten gebildet und treten entweder gebunden als Proteoglykane oder frei als Hyaluronsäure auf. GAG's und Proteoglykane bilden starre Strukturen und sind negativ geladen. Dadurch sind sie in der Lage, eine große Menge an Kationen mit deren Wasserhülle an sich zu binden (Feuchtigkeit) und bilden so die gelartige Grundsubstanz der extrazellulären Matrix, in die die Faserproteine Kollagen und Elastin eingelagert werden (Elastizität) (Vuillermoz et al., 2005). Außerdem wirken sie aufgrund ihres polyanionischen Charakters beim Austausch positiv geladener Proteine mit und bilden dadurch ein Reservoir an Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Iozzo, 2000). Diese vielfältigen Funktionen der Proteoglykane verdeutlichen, dass altersbedingte Veränderungen die Haut-Homöostase stören und zu Hautbildern wie der „senilen Atrophie“ oder der „senilen Elastose“ führen können (Farage et al., 2010). Bei der Elastose kommt es zu einer Akkumulation von elastotischem Material (Gilchrest & Krutmann, 2006), welches aus einer Vielzahl extrazellulärer Matrixkomponenten besteht, die jedoch in ihrer molekularen Organisation und Funktion stark gestört sind. Bei lichtgealterter Haut *in vivo* konnte als Teil des elastotischen Materials die Ansammlung von fragmentierten Elastinfasern beobachtet werden (Gilchrest & Krutmann, 2006). Elastin ist extrem langlebig im Vergleich zu anderen intrazellulären Proteinen. Die Halbwertszeit von Enzymen wird in der Regel in Stunden angegeben und besonders stabile Proteine wie die Histone besitzen mit einer Halbwertszeit von 18 Tagen eine vergleichbar kurze Lebensdauer in Bezug auf extrazelluläre Matrixproteine wie z.B. Elastin, deren Halbwertszeit in Jahren angegeben wird (Jennissen, 1995). Aufgrund dieser Langlebigkeit akkumulieren die Proteine der extrazellulären Matrix besonders viele Schäden, welche letztendlich zu deren Abbau führen. Der Abbau erfolgt beispielsweise durch Matrix-Metalloproteininasen, von denen bisher acht verschiedene beschrieben wurden, die in der Lage sind, Elastinfasern *in vitro* zu löslichem Tropoelastin zu degradieren (Taddese et al., 2008). Neben dem enzymatischen Abbau wird der Abbau durch oxidativen Stress diskutiert. Es ist bewiesen, dass reaktive Sauerstoffspezies die

Bildung von MMP-2 fördern, wodurch Elastin zu Tropoelastin degradiert und die Elastin-Homöostase gestört wird (Wlaschek et al., 2001). Ob ROS in der Lage sind, direkt die Struktur von Elastinfasern zu zerstören ist noch nicht geklärt. Derzeit existieren zwei Studien, welche die Anfälligkeit von Elastinfasern gegenüber ROS untersuchen. Umeda et al. zeigten die Oxidation und Solubilisierung von Elastin durch H₂O₂ (Umeda et al., 2001) und Cantor et al. wiesen einen höheren Anfälligkeit für den enzymatischen Abbau des Elastins nach, nachdem die EZM mit H₂O₂ behandelt wurde (Cantor et al., 2006). Diese beiden Studien deuten an, dass eine vermehrte Oxidation für den Rückgang der Elastinfasern, wie sie bei *in vivo* gealterter Haut beobachtet wurde, verantwortlich sein könnte (Umeda et al., 2001). Durch den immunhistologischen Nachweis der Elastinfasern im dreidimensionalen Hautmodell konnte ebenfalls eine Abnahme an elastischen Fasern bei dem MMC-behandelten Modellen im Vergleich zu dem unbehandelten Hautmodell nachgewiesen werden. Inwiefern es sich dabei um einen vermehrten Abbau des Elastins durch MMP's oder eine Fragmentierung durch ROS handelt, kann anhand der bisherigen histologischen Untersuchung nicht ermittelt werden. Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Ursachen für den Verlust eines funktionsfähigen Elastinnetzwerkes in alter Haut, wird in der Literatur der Einfluss von exogenen Noxen wie z.B. Tabakrauch diskutiert. *In vitro* konnte bei Fibroblasten ein signifikanter Anstieg der inaktiven Proform des Elastins durch Zigarettenrauch induziert werden, wodurch es zu einer Akkumulation an elastotischem Material kam (Boyd et al., 1999). Zigarettenrauch bildet neben dem UV-Licht eines der häufigsten Umweltgifte und führt über Sekundärreaktionen unter anderem zur Alkylierung der DNA. *In vivo* wird die vorzeitige Hautalterung bei Rauchern der DNA-Alkylierung durch Zigarettenrauch zugeschrieben (Tubbs et al., 2009). Da Mitomycin-C sowohl ROS induziert, als auch die DNA alkyliert, wurden zwei wesentliche Mechanismen der *in vivo* Hautalterung aufgegriffen, welche zu einer Zerstörung der Elastinfasern führten und somit die *in vivo* Hautalterung diesbezüglich imitiert werden konnte.

4.3.3 MMP-vermittelter Abbau des Kollagens durch senescente Fibroblasten

Die Ansammlung elastotischen Materials in alter Haut wird *in vivo* von einer Degeneration des umgebenden Netzwerks aus kollagenen Faserbündeln begleitet. Die Kollagenfasern bilden mit einem Anteil von 25% der Gesamtproteinmenge das häufigste Protein des menschlichen Organismus. Bis heute wurden 20 verschiedene Kollagentypen entdeckt, von denen 14 in der menschlichen Haut vorkommen. Kollagen Typ-1 bildet mit einem Anteil von 80% das häufigste Kollagen der menschlichen Haut (Fritsch, 1983). Kollagen Typ-1 ist hauptsächlich für die Stabilität und Festigkeit der Haut verantwortlich, wohingegen Kollagen Typ-3, mit einem Anteil von 15% das zweit häufigste Kollagen der

Haut, die hohe Elastizität gewährleistet (Heckmann, 1999). Mit Hilfe von morphologischen Vermessungen der Kollagenfasern in Hautbiopsien konnte beobachtet werden, dass ab dem 30. Lebensjahr die Dichte der Kollagenfasern bei *in vivo* gealterter Haut abnimmt (Vitellaro-Zuccarello et al., 1994). Dieser Rückgang der Kollagenfasern konnte ebenfalls bei dem *in vitro* Hautalterungsmodell mit Hilfe der AZAN-Färbung nachgewiesen werden. Durch die MMC-Behandlung sank der Gehalt an Kollagenfasern signifikant um 35%, im Vergleich zu dem unbehandelten Modell. Die histologischen Veränderungen bezüglich der verringerten Kollagenmenge *in vivo* gealterter Haut konnten somit durch die MMC-Behandlung bei dem *in vitro* Hautalterungsmodell ebenso induziert werden. Es ist beschrieben, dass der Kollagengehalt der Haut *in vivo* um durchschnittlich 2% pro Jahr sinkt (Fenske & Lober, 1986) und zwar weil sich mit zunehmendem Alter auf der einen Seite die Kollagensynthese verringert (Talwar et al., 1995) und auf der anderen Seite die Produktion an kollagenabbauenden Enzymen steigt (Bailey, 2001).

Durch Radioimmunassays, Westernblots und immunhistologische Färbungen an Hautbiopsien, konnte ein signifikant verringelter Gehalt des kollagenen Vorläufers Prokollagen Typ-1 (P1NP) und Typ-3 (P3NP) beobachtet werden (Talwar et al., 1995). Diese Abnahme der P1NP-Konzentration konnte mit Hilfe der Analyse der Hautmodell-Überstände bestätigt werden, da sich die P1NP-Konzentration der MMC-behandelten Hautmodelle signifikant um 75% verringerte im Vergleich zu den unbehandelten Hautmodellen. Varani et al. beobachteten ebenfalls mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen an Hautbiopsien eine Abnahme von Prokollagen Typ-1 und entdeckten, dass der Anteil an degradiertem Kollagen in lichtgealterter Haut 3,6-fach höher war als in lichtgeschützten Hautbereichen des gleichen Spenders (Varani et al., 2001). Er isolierte die Fibroblasten sowohl aus der lichtgealterten als auch aus der lichtgeschützten Haut, konnte jedoch keinen Unterschied mehr bezüglich der Kollagensynthese nachweisen. Dies änderte sich, nachdem die isolierten Fibroblasten auf degradiertem Kollagen kultiviert wurden. Dadurch fiel die Prokollagensyntheserate um 80% ab im Vergleich zu der Syntheserate von Fibroblasten, welche auf einem intakten Kollagengel kultiviert wurden. Die Ergebnisse machen deutlich, dass degradiertes Kollagen ursächlich für eine verminderte Kollagensynthese sein kann. Durch die Anwesenheit von degradierten Kollagenfasern wird die Kommunikation zwischen Fibroblasten und der extrazellulären Matrix beeinträchtigt, sodass die Kollagen-Homöostase gestört wird. Der genaue Mechanismus, wie degradiertes Kollagen die Funktionsfähigkeit von Fibroblasten beeinflusst ist noch nicht bekannt, es wird jedoch vermutet, dass Veränderungen der Zellform eine wichtige Rolle spielen. Die Interaktion von Fibroblasten mit Kollagen hängt von der Primär-, Sekundär- und Tertiär-Struktur des Kollagens ab. Wenn die dreidimensionale Struktur des Kollagens beispielsweise durch MMP's zerstört wird, ist das Kollagengel nicht mehr im Stande, den Kontraktionskräften der Fibroblasten

standzuhalten und fällt in sich zusammen. Dadurch verändern die Fibroblasten ihre langgezogene Zellform zu einer runden Zelle (Varani et al., 2001). Zahlreiche Studien belegen jedoch, dass eine optimale Funktion der Fibroblasten von dem Erhalt der langgezogenen Zellform abhängt und die Kollagensynthese durch morphologische Veränderungen beeinträchtigt werden kann (Nakagawa et al., 1989; Lin & Grinnell, 1993). Diese Beeinträchtigung der Kollagensynthese zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, nach der Isolation der RNA aus dem Hautmodell auf molekularbiologischer Ebene. Durch die Behandlung der Fibroblasten mit Mitomycin-C im dreidimensionalen Hautmodell, fiel die mRNA-Expression für Kollagen Typ-1 und Typ-3 um 80% im Vergleich zu den unbehandelten Modellen. Es wird vermutet, dass die verminderte Kollagensynthese nicht nur durch die veränderte Zellform ausgelöst wird, sondern auch aufgrund einer gestörten Interaktion zwischen Fibroblasten und der EZM beruht (Varani et al., 2001). Fibroblasten interagieren über verschiedene Integrine mit dem Kollagennetzwerk., sodass durch einen speziellen Integrin-Gendefekt bei *in vivo*-Studien mit Mäusen eine verringerte Kollagensynthese nachgewiesen werden konnte (Gardner et al., 1999). Bei *in vivo* gealterter Humanhaut konnte außerdem gezeigt werden, dass $\alpha 2\beta 1$ -Integrin erhöht war (Fisher et al., 2009), was wiederum zu einer erhöhten Expression von c-Jun und MMP-1 führte (Mechanismus s. Abbildung 4.2).

Neben der Induktion von MMP's durch aktivierte Integrine (Fisher et al., 2009), ist eine weitere wichtige Quelle die UV-Strahlung, der einige Bereiche der Haut dauerhaft ausgesetzt sind. Brenneisen et al. zeigten, dass Fibroblasten auf die Bestrahlung mit UV-B durch eine Reihe biochemischer Veränderungen reagieren, die als UV-Antwort bezeichnet werden (Brenneisen et al., 2002). Durch die UV-Strahlung werden im Wesentlichen zwei verschiedene Signalwege eingeleitet. Auf der einen Seite entstehen im Zellkern Pyrimidindimere als direkte Folge der UV-Strahlung. Es konnte ein UV-Dosis-abhängiger Anstieg an Pyrimidindimeren in Fibroblasten nachgewiesen werden, welcher über den Weg der FRAP-Kinasen mit einer Zunahme an MMP-1 und MMP-3 mRNA korrelierte (Brenneisen et al., 2002). Auf der anderen Seite bilden reaktive Sauerstoffspezies ein zentrales Element der MMP-Regulation. Zusätzlich zur Bildung von ROS als Nebenprodukt des Metabolismus, konnte ein Anstieg an H₂O₂ in Fibroblasten nach der Bestrahlung mit UV-B gemessen werden (Brenneisen et al., 2002). Dieser Anstieg hatte zur Folge, dass der Transkriptionsfaktor c-Jun aktiviert wurde und in Kombination mit c-Fos den AP-1 Komplex bildete. Da die Promotoren von MMP-1 und MMP-3 Bindestellen für AP-1 besitzen, konnte der aktive AP-1 Komplex daran binden und die Transkription von MMP-1 und MMP-3 initiieren. In der Literatur ist beschrieben, dass durch die erhöhte Transkription von MMP's, welches zu einem verstärkten Kollagenabbau führt, wiederum der ROS-Gehalt in den Zellen steigt (Fisher et al., 2009). Dadurch verstärken sich MMP's und ROS gegenseitig, sodass es zu einer positiven Rückkopplung kommt. Außerdem wird diskutiert, dass ROS für die Aktivierung von MMP's mit verantwortlich sind, da sie in der

Lage sein könnten, die aktivitätshemmende Cystein-Zink-Verbindung zu zerstören (Amalinei et al., 2007). Die beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, dass der Anstieg an MMP's nach der UV-Bestrahlung sowohl durch den induzierten DNA-Schaden, als auch über die vermehrte Produktion an ROS erklärt werden kann. Da Mitomycin-C sowohl die DNA schädigt, als auch ROS induziert, konnte ebenfalls ein Anstieg der Konzentration an MMP-1 in den Überständen der MMC-behandelten Hautmodelle im Vergleich zu den unbehandelten Hautmodellen nachgewiesen werden. Neben der erhöhten Konzentration an MMP-1, wurde außerdem die Aktivität von MMP-1 signifikant gesteigert, was möglicherweise durch die Zerstörung der Cystein-Zink-Wechselwirkung durch ROS kommt. Außerdem wird diskutiert, dass DNA-Schäden zu Aktivierung von MMP's führen (Kim et al., 2004). Kim et al. inkubierten Lungenfibroblasten mit Zigarettenrauchextrakt (CSE), welcher über die Phosphorylierung des ERK-Signalweges zu einem Anstieg an aktivem MMP-1 sowohl auf RNA, als auch auf Proteinebene führte. Durch eine Blockade der Erk-Phosphorylierung konnte dieser Effekt signifikant verringert werden. Die verminderte Kollagensynthese, welche mit Hilfe der PCR untersucht werden konnte und der Anstieg an aktivem MMP-1 erklären, warum in der AZAN-Färbung in den MMC-behandelten Hautmodellen deutlich weniger Kollagen detektiert werden konnte, als in den unbehandelten Hautmodellen. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass das Hautalterungsmodell eines der wesentlichsten Charakteristika *in vivo* gealterter Haut besitzt und somit für weitere Untersuchungen altersspezifischer Veränderungen geeignet ist. Außerdem konnte dadurch eine Grundlage für die Entwicklung von Anti-Aging-Strategien gelegt werden, welche als Ziel haben, den Kollagengehalt in gealterter Haut (*in vivo* und im MMC-behandelten *in vitro* Hautalterungsmodell) zu steigern.

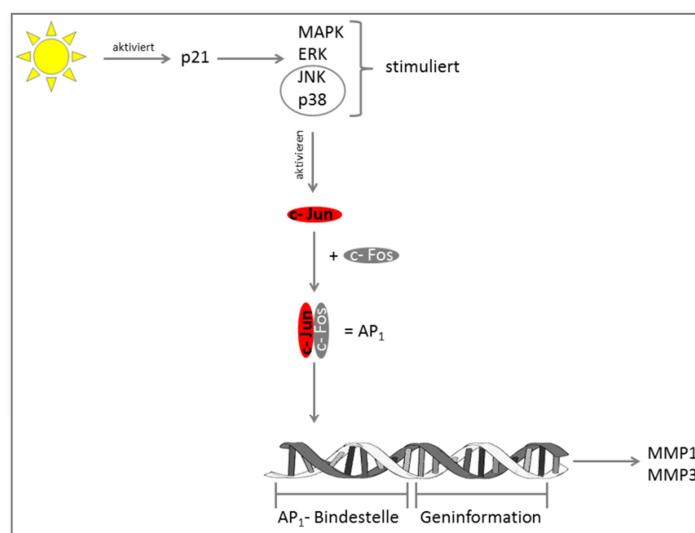


Abbildung 4.2: Signalkaskade zur Induktion von MMP's durch UV-Strahlung In Folge von UV-Licht wird in der Zelle p21 aktiviert, welches unterschiedliche Signalwege wie z.B. MAPK, ERK, JNK und p38 einleiten kann. JNK und p38 aktivieren daraufhin den Transkriptionsfaktor c-Jun, welcher in Kombination mit c-Fos den aktiven AP-1 Komplex bildet. AP-1 bindet daraufhin an die DNA-Bindestelle für AP-1 und initiiert die Transkription von MMP-1 und MMP-3.

4.4 Anti-Aging

Kosmetika werden weltweit benutzt, um das äußere Erscheinungsbild der Haut zu verbessern. Dabei spielen Anti-Aging-Maßnahmen eine zentrale Rolle, da gerade in westlichen Kulturkreisen sichtbare Falten als Zeichen des Älterwerdens nicht als erstrebenswert angesehen werden. Aufgrund der Tatsache, dass zahlreiche Inhaltsstoffe wie z.B. Vitamin-C, Vitamin-A-Derivate, Coenzym Q10 oder Hyaluronsäure einen Anti-Aging-Effekt versprechen und die Bedeutung von „Anti-Aging“ nicht klar definiert ist, wurde in dieser Arbeit die Gruppe der Vitamin-A-Derivate herausgegriffen, da deren Wirksamkeit bereits in unterschiedlichen Studien belegt wurde (Fisher & Voorhees, 1998; Griffiths, 2001; Quan et al., 2011), um zu überprüfen, ob die MMC gealterten Fibroblasten zugänglich für Anti-Aging-Strategien sind.

Vitamin-A wird in Kosmetika in Form von zahlreichen Derivaten wie z.B. Retinol, Retinylester oder Retinaldehyde verwendet. In der Haut werden diese Derivate durch enzymatische Reaktionen zu Retinsäure umgewandelt, welches die aktive Form von Vitamin-A darstellt. Diese aktive Form interagiert mit Kernrezeptoren, die wiederum mit speziellen DNA-Sequenzen interagieren und dadurch die Expression unterschiedlicher Proteine verändern (Draelos, 2008). Einige dieser Veränderungen betreffen die Schichtdicke der Haut (Epidermis und Dermis) und bilden somit eine Basis für Anti-Aging-Maßnahmen. Im Bereich der Epidermis kam es durch die Retinsäure-Behandlung zu einer Steigerung der Proliferation und Differenzierung der Keratinozyten. Außerdem wurde eine vermehrte Produktion der epidermalen Grundsubstanz (den Glukosaminoglykanen) beobachtet, wodurch die Hautfeuchtigkeit gesteigert werden konnte (Farage et al., 2010). Im dermalen Bereich wurde eine erhöhte Kollagenkonzentration nach der Behandlung mit Retinsäure beobachtet. Es ist beschrieben, dass durch die Vorinkubation von Fibroblasten mit Retinsäure die c-Jun-Proteinexpression nach UV-Bestrahlung um 70% verringert wurde, im Vergleich zu bestrahlten Fibroblasten ohne Vorinkubation mit Retinsäure (Fisher & Voorhees, 1998). Durch die verminderte Expression von c-Jun wurde deutlich weniger aktives AP-1 gebildet, wodurch sowohl 50% weniger MMP-1-mRNA, als auch 80% weniger MMP-1-Protein gebildet wurden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten ebenfalls, dass durch die Vorinkubation der Fibroblasten mit Retinsäure, die Konzentration und die Aktivität an MMP-1 nach der Behandlung mit Mitomycin-C signifikant verringert werden konnte, im Vergleich zu den MMC-behandelten Fibroblasten ohne Vorinkubation mit Retinsäure. Die MMC-behandelten Fibroblasten zeigten also in Bezug auf mögliche Anti-Aging-Effekte durch Retinsäure, eine ähnliche Reaktion, wie sie für die *in vivo* Hautalterung beschrieben sind. Bei *in vivo* gealterter Haut wurde ein erhöhter Gehalt an CCN1 (Cysteinreiches Protein 61) nachgewiesen, wodurch die

Kollagen-Homöostase gestört wurde, da die Synthese von Kollagen Typ-1 durch CCN1 gehemmt wird und die Produktion von MMP-1 angeregt wird (Quan et al., 2011). Durch die Inkubation von Fibroblasten mit CCN1 in Zellkulturexperimenten konnte ebenfalls eine verminderte Kollagensynthese und ein verstärkter Kollagenabbau beobachtet werden. Dieses Ungleichgewicht der Kollagen-Homöostase wurde durch Inkubation von Fibroblasten im Monolayer und von *in vitro* Hautmodellen mit Retinsäure verbessert, sodass die behandelten Fibroblasten und Hautmodelle weniger CCN1 bildeten und es dadurch zu einem Anstieg an Kollagen Typ-1 kam und die Produktion von MMP-1 im Vergleich zu unbehandelten Hautmodellen verringert wurde (Quan et al., 2011).

5 Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung von Fibroblasten mit Mitomycin-C (MMC) wesentliche Merkmale replikativer Seneszenz induziert werden konnten. Dadurch stellt die Behandlung mit MMC eine Möglichkeit dar, um den Alterungsprozess im Zeitraffer zu untersuchen. Generell gibt es noch einige Fragen bezüglich weiterer Gemeinsamkeiten zwischen der MMC-induzierten Seneszenz (DIAS) und der replikativen Seneszenz (RS), welche in Zukunft noch genauer untersucht werden sollten. Es wäre interessant, ob eine erhöhte Proteinoxidation in beiden seneszenten Zellen nachgewiesen werden kann und wie der Status der pro-und antioxidativen Enzyme ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob in Folge der p53-Aktivierung auch p21 aktiviert wird, sodass es zu unterschiedlichen Cyclinexpressionen kommt, welche zu einem G1- oder G2-Arrest führen (s. Abbildung 1.3).

Durch die Behandlung der Hautmodelle mit Mitomycin-C ist es erstmalig gelungen, ein stabiles Hautalterungsmodell zu entwickeln, welches viele gemeinsame Merkmale mit *in vivo* gealterter Haut besitzt. Die weitere Charakterisierung dieses *in vitro* Hautalterungsmodells sollte unter anderem die Barrierefunktion überprüfen, da diese bei *in vivo* gealterter Haut verringert ist (Elias & Ghadially, 2002). Möglich wäre z.B. ein Penetrationstest mit dem Farbstoff *Lucifer Yellow*, oder die Untersuchung der Zellverbindungen (*tight junctions*). Durch die Entwicklung eines dreidimensionalen *in vitro* Hautalterungsmodells wurde die Grundlage für weitere altersspezifische Untersuchungen gelegt. Für die Kosmetikindustrie besteht nun die Möglichkeit, die Hautreaktion auf diverse Substanzen, sowohl in junger Haut, als auch in alter Haut *in vitro* zu testen. Dadurch wird das Spektrum für das Substanzscreening um einen wichtigen Faktor erweitert, sodass in Zukunft nicht nur *in vivo* Studien an freiwilligen Probanden durchgeführt werden können, sondern zusätzlich zu den Zellkulturexperimenten, auch ein dreidimensionales Hautalterungsmodell für *in vitro* Studien zur Verfügung steht. Dadurch ist es möglich, gezielte Formulierungen zu entwickeln, die speziell auf die Bedürfnisse reifer Haut abgestimmt sind. Des Weiteren können durch Modifizierungen des Hautalterungsmodells altersbedingte Krankheiten wie z.B. Krebs genauer untersucht und die zugrundeliegenden Mechanismen noch besser zu verstehen werden. Es wäre beispielsweise möglich, sowohl ein junges, als auch ein altes Hautmodell mit Hautkrebszellen zu entwickeln. Dabei wäre es unter anderem interessant, die Invasion der Krebszellen im Hautalterungsmodell detailliert zu untersuchen und somit besser zu verstehen. Eine mögliche Ursache könnte in einem veränderten sekretorischen Phänotyp liegen, sodass die Analyse der sezernierten Stoffe interessant wäre, um nur ein Beispiel zu nennen.

6 Zusammenfassung

Dreidimensionale Ganzhautmodelle, bestehend aus einer Matrix mit nativen Fibroblasten und Keratinozyten bieten *in vitro* eine Alternative zu Tierversuchen und Probandenstudien. *In vitro* Hautmodelle kommen unter anderem in Metabolisierungsstudien, Toxizitätsprüfungen, Wundheilungsversuchen und in der kosmetischen Forschung zum Einsatz. Aufgrund der Tatsache, dass die Hautalterung ein komplexer Prozess ist, der von intrinsischen und extrinsischen Faktoren begleitet wird, können die molekularen und biochemischen Mechanismen, welche zu einem veränderten Erscheinungsbild und funktionellen Veränderungen führen, bisher nicht endgültig verstanden werden. Durch die Entwicklung eines Hautalterungsmodells können die molekularen Mechanismen, die zu alterstypischen Hauterkrankungen oder Krebs führen, besser untersucht und gezielt therapiert werden. Des Weiteren ist die gezielte Entwicklung von kosmetischen Formulierungen möglich, welche speziell auf die Bedürfnisse der gealterten Haut eingehen. Bisherige Hautmodelle werden aus jungen, mitotischen Fibroblasten hergestellt. Da gealterte Fibroblasten sich jedoch wesentlich in ihrer Stoffwechselaktivität und Zellantwort von jungen, mitotischen Fibroblasten unterscheiden, ist es sinnvoll, ein dreidimensionales Hautalterungsmodell mit gealterten Fibroblasten aufzubauen. Die Alterung von Fibroblasten *in vitro* wurde erstmals 1961 von Hayflick & Moorhead als replikative Seneszenz beschrieben und wird seitdem als Modell der zellulären Alterung genutzt. Die Untersuchung altersbedingter biochemischer, molekularbiologischer und zellulärer Veränderungen an isolierten Hautzellen hat wesentlich dazu beigetragen, grundlegende Aspekte der Hautalterung *in vivo* besser zu verstehen. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass durch die Behandlung mit Mitomycin-C (MMC), die zu einer MMC-induzierten, beschleunigten und dauerhaften Seneszenz (DIAS) führt, sowohl im Monolayer als auch im dreidimensionalen Hautmodell wesentliche Merkmale replikativer Seneszenz wie ein dauerhafter Zellzyklusarrest, die Vergrößerung der Zellmorphologie, eine erhöhte SA- β -Galaktosidase-Aktivität, der Anstieg an reaktiven Sauerstoffspezies, sowie eine Aktivitätssteigerung von p53 und MMP-1 induziert werden konnten. Dadurch stellt die Behandlung mit Mitomycin-C eine Möglichkeit dar, um den Alterungsprozess im Zeitraffer zu untersuchen. Durch die Behandlung der Hautmodelle mit Mitomycin-C ist es erstmals gelungen, ein stabiles Hautalterungsmodell zu entwickeln, welches viele gemeinsame Merkmale mit *in vivo* gealterter Haut besitzt wie z.B. eine Verringerung der dermalen Matrixproteine Elastin und Kollagen, sowie eine veränderte epidermale Differenzierung. Das Hautmodell bietet sowohl für die Kosmetikindustrie, als auch für die medizinische Forschung eine gute Grundlage, um altersbedingte Veränderungen *in vivo* nah zu untersuchen.

7 Summary

Aging is a very complex process, controlled by intrinsic as well as extrinsic factors, which makes it difficult to fully understand the underlying molecular and biochemical mechanisms that lead to changes in appearance as well as functionality of the skin. Development of models for skin-aging can help to understand those molecular mechanisms that lead to aging related skin-diseases as well as cancer, and may eventually lead to specific therapies. Furthermore, it is possible to develop cosmetic formulations for the specific needs of aged skin.

Three dimensional skin models, composed of a matrix with native fibroblasts and keratinocytes, provide a good in vitro alternative to animal experiments and patient studies. Such in vitro models are currently already in use for metabolic studies, toxicity test, wound-healing studies and cosmetic research. So far, skin models were made of young, mitotic fibroblasts. However, since aged fibroblasts differ immensely from young fibroblasts in terms of metabolic function and cell response, it would make more sense to develop a three-dimensional skin aging model with aged fibroblasts. The in vitro aging process of fibroblasts was first described in 1961 by Hayflick & Moorhead as replicative senescence and is since used as a model of cellular aging. The research on aging related biochemical, molecular and cellular changes on isolated skin cells has played an important role in understanding the basic principles of skin aging *in vivo*.

The result of this doctoral thesis indicates that the treatment with Mitomycin-C (MMC) in monolayer experiments, as well as in a three-dimensional skin model, leads to a drug-induced accelerated senescence (DIAS). These DIAS-Fibroblasts share common features with replicative senescence, such as constant cell cycle arrest, enlargement of the cell morphology, an increased SA- β -galactosidase activity, increased production of reactive oxygen species, as well as increased activity of p53 and MMP-1. Hence, the treatment with MMC provides a possibility to analyse the aging process in time-laps.

For the first time a stable three-dimensional skin aging model has now been developed, based on the treatment with MMC, showing comparable characteristics of *in vivo* conditions, such as reduction of the dermal matrix proteins elastin and collagen, as well as different epidermal differentiation. This model provides a great tool for the cosmetic industry as well as for medical research to study aging related changes more closely to the *in vivo* situation.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Einteilung der Wachstumskurve nach L. Hayflick	16
Abbildung 1.2: Regulation der Zellzyklusphasen durch Cycline.....	19
Abbildung 1.3: Zellzykluskontrolle durch p53 nach DNA-Schädigung	20
Abbildung 1.4: Aufbau der menschlichen Haut.....	21
Abbildung 1.5: Enzymatische Aktivierung von Mitomycin-C	35
Abbildung 1.6: Quervernetzung der DNA durch Mitomycin-C	36
Abbildung 2.1: Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT zum Formazansalz.....	50
Abbildung 3.1: Toxizität seneszenz-induzierender Substanzen.....	69
Abbildung 3.2: Zeitlicher Verlauf der Proliferation	70
Abbildung 3.3: Zeitlicher Verlauf des Auftretens von ROS.....	71
Abbildung 3.4: Morphologische Entwicklung der Zellform.....	73
Abbildung 3.5: Zeitliche Entwicklung der Populationsverdopplungen	76
Abbildung 3.6: Proliferatives Potential mitotischer und seneszenter Fibroblasten	77
Abbildung 3.7: Morphologie und Zellgröße mitotischer und seneszenter Fibroblasten....	79
Abbildung 3.8: Reaktive Sauerstoffspezies in seneszenten Zellen.....	80
Abbildung 3.9: SA- β -Galaktosidase-Aktivität seneszenter Fibroblasten.....	81
Abbildung 3.10: Zellzyklusregulation in seneszenten Fibroblasten	82
Abbildung 3.11: Freisetzung von Pro-MMP-1 in Fibroblasten	84
Abbildung 3.12: Histologische Veränderungen in vivo gealterter Haut.....	86
Abbildung 3.13: Histologische Schnittpräparate.....	87
Abbildung 3.14: Histologie der optimierten Herstellung eines Hautalterungsmodells.....	89
Abbildung 3.15: Proliferationsverhalten isolierter Fibroblasten	90
Abbildung 3.16: Zellgröße und Morphologie der isolierten Fibroblasten.....	92
Abbildung 3.17: ROS-Gehalt in isolierten Fibroblasten.....	93
Abbildung 3.18: SA- β -Galaktosidase-Aktivität isolierter Fibroblasten.....	94
Abbildung 3.19: p53-Aktivität in isolierten Fibroblasten aus dem Hautmodell.....	95
Abbildung 3.20: Konzentration und Aktivität von MMP-1 bei isolierten Fibroblasten	96
Abbildung 3.21: Filaggrin-Expression in vivo.....	99
Abbildung 3.22: Filaggrin-Expression im Hautmodell	100
Abbildung 3.23: Elastin-Expression in vivo.....	101
Abbildung 3.24: Elastin-Expression im Hautmodell	101
Abbildung 3.25: Kollagengehalt im Hautmodell.....	102
Abbildung 3.26: Quantitative Auswertung der AZAN-Färbung.....	103
Abbildung 3.27: P1NP-Konzentration in den Überständen der Hautmodelle	104
Abbildung 3.28: Konzentration und Aktivität von MMP-1 im Hautmodell.....	105
Abbildung 3.29: Kollagensynthese auf mRNA-Ebene im Hautmodell.....	106
Abbildung 3.30: Einfluss von Retinsäure auf MMP-1.....	108

Abbildung 4.1: Regulation des G2/M-Übergangs durch p53 nach DNA-Schädigung	114
Abbildung 4.2: Signalkaskade zur Induktion von MMP's durch UV-Strahlung	127

9 Literaturverzeichnis

Affinito, P., S. Palomba, C. Sorrentino, C. Di Carlo, G. Bifulco, M. P. Arienzo and C. Nappi (1999). "Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen." Maturitas **33**(3): 239-247.

Agarwal, M. L., A. Agarwal, W. R. Taylor and G. R. Stark (1995). "p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8493-8497.

Alcorta, D. A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach and J. C. Barrett (1996). "Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 13742-13747.

Amalinei, C., I. D. Caruntu and R. A. Balan (2007). "Biology of metalloproteinases." Rom J Morphol Embryol **48**(4): 323-334.

Ames, B. N., M. K. Shigenaga and T. M. Hagen (1993). "Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(17): 7915-7922.

Asselineau, D., B. A. Bernard, C. Bailly and M. Darmon (1989). "Retinoic acid improves epidermal morphogenesis." Dev Biol **133**(2): 322-335.

Atamna, H., A. Paler-Martinez and B. N. Ames (2000). "N-t-butyl hydroxylamine, a hydrolysis product of alpha-phenyl-N-t-butyl nitron, is more potent in delaying senescence in human lung fibroblasts." J Biol Chem **275**(10): 6741-6748.

Bae, J. B., S. S. Mukhopadhyay, L. Liu, N. Zhang, J. Tan, S. Akhter, X. Liu, X. Shen, L. Li and R. J. Legerski (2008). "Snm1B/Apollo mediates replication fork collapse and S Phase checkpoint activation in response to DNA interstrand cross-links." Oncogene **27**(37): 5045-5056.

Bailey, A. J. (2001). "Molecular mechanisms of ageing in connective tissues." Mech Ageing Dev **122**(7): 735-755.

Barnett, Y. A. and C. M. King (1995). "An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans." Mutat Res **338**(1-6): 115-128.

Bayreuther, K. (1988). "Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage." Cell Biology **85**.

Becker, V. and H. Schipperges (1993). Entropie und Pathogenese: interdisziplinäres Kolloquium der Heidelberger Akademie der Wissenschaften, Springer-Verlag.

Bell, E., H. P. Ehrlich, D. J. Buttle and T. Nakatsuji (1981). "Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness." Science **211**(4486): 1052-1054.

Bell, E., S. Sher, B. Hull, C. Merrill, S. Rosen, A. Chamson, D. Asselineau, L. Dubertret, B. Coulomb, C. Lapierre, B. Nusgens and Y. Neveux (1983). "The reconstitution of living skin." J Invest Dermatol **81**(1 Suppl): 2s-10s.

Ben-Porath, I. and R. A. Weinberg (2005). "The signals and pathways activating cellular senescence." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 961-976.

Bentley, J. P., R. M. Brenner, A. D. Linstedt, N. B. West, K. S. Carlisle, B. C. Rokosova and N. MacDonald (1986). "Increased hyaluronate and collagen biosynthesis and fibroblast estrogen receptors in macaque sex skin." J Invest Dermatol **87**(5): 668-673.

Bernard, D., K. Gosselin, D. Monte, C. Vercamer, F. Bouali, A. Pourtier, B. Vandenbunder and C. Abbadie (2004). "Involvement of Rel/Nuclear Factor- κ B Transcription Factors in Keratinocyte Senescence." Cancer Research **64**(2): 472-481.

Bernard, D., B. Quatannens, A. Begue, B. Vandenbunder and C. Abbadie (2001). "Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase." Cancer Res **61**(6): 2656-2664.

Berneburg, M., H. Plettenberg, K. Medve-Konig, A. Pfahlberg, H. Gers-Barlag, O. Gefeller and J. Krutmann (2004). "Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin." J Invest Dermatol **122**(5): 1277-1283.

Bernerd, F. and D. Asselineau (1997). "Successive alteration and recovery of epidermal differentiation and morphogenesis after specific UVB-damages in skin reconstructed in vitro." Dev Biol **183**(2): 123-138.

Bernstein, E. F., Y. Q. Chen, J. B. Kopp, L. Fisher, D. B. Brown, P. J. Hahn, F. A. Robey, J. Lakkakorpi and J. Uitto (1996). "Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy." J Am Acad Dermatol **34**(2 Pt 1): 209-218.

Bjelakovic G, N. D. G. L. S. R. G. C. (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: Systematic review and meta-analysis." JAMA **297**(8): 842-857.

Bode-Boger, S. M., J. Martens-Lobenhoffer, M. Tager, H. Schroder and F. Scalera (2005). "Aspirin reduces endothelial cell senescence." Biochem Biophys Res Commun **334**(4): 1226-1232.

Boni, R. and G. Burg (2000). "[Aging skin: physiological bases, preventive measures and therapeutic modalities]." Schweiz Med Wochenschr **130**(36): 1272-1278.

Bowen, R. L. and C. S. Atwood (2004). "Living and dying for sex. A theory of aging based on the modulation of cell cycle signaling by reproductive hormones." Gerontology **50**(5): 265-290.

Boyce, S. T. (1996). "Cultured skin substitutes: a review." Tissue Eng **2**(4): 255-266.

Boyd, A. S., T. Stasko, L. E. King, Jr., G. S. Cameron, A. D. Pearse and S. A. Gaskell (1999). "Cigarette smoking-associated elastotic changes in the skin." J Am Acad Dermatol **41**(1): 23-26.

Brenneisen, P., J. Gogol and K. Bayreuther (1994). "DNA synthesis and Fos and Jun protein expression in mitotic and postmitotic WI-38 fibroblasts in vitro." Exp Cell Res **211**(2): 219-230.

Brenneisen, P., J. Oh, M. Wlaschek, J. Wenk, K. Briviba, C. Hommel, G. Herrmann, H. Sies and K. Scharffetter-Kochanek (1996). "Ultraviolet B wavelength dependence for the regulation of two major matrix-metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in human dermal fibroblasts." Photochem Photobiol **64**(4): 649-657.

Brenneisen, P., H. Sies and K. Scharffetter-Kochanek (2002). "Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events." Ann N Y Acad Sci **973**: 31-43.

Brenneisen, P., J. Wenk, L. O. Klotz, M. Wlaschek, K. Briviba, T. Krieg, H. Sies and K. Scharffetter-Kochanek (1998). "Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts." J Biol Chem **273**(9): 5279-5287.

Brenneisen, P., J. Wenk, M. Wlaschek, T. Krieg and K. Scharffetter-Kochanek (2000). "Activation of p70 ribosomal protein S6 kinase is an essential step in the DNA damage-dependent signaling pathway responsible for the ultraviolet B-mediated increase in interstitial collagenase (MMP-1) and stromelysin-1 (MMP-3) protein levels in human dermal fibroblasts." J Biol Chem **275**(6): 4336-4344.

Brincat, M., C. F. Moniz, J. W. Studd, A. J. Darby, A. Magos and D. Cooper (1983). "Sex hormones and skin collagen content in postmenopausal women." Br Med J **287**(6402): 1337-1338.

Bürger, M. (1965). Altern und Krankheit als Problem der Biomorphose: Mit 388 Abb. sowie 3 farb. Taf, Ed. Leipzig.

Campisi, J. (2001). "Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism." Trends Cell Biol **11**(11): S27-31.

Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors." Cell **120**(4): 513-522.

Campisi, J. and F. d'Adda di Fagagna (2007). "Cellular senescence: when bad things happen to good cells." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 729-740.

Cantor, J. O., B. Shteyngart, J. M. Cerreta, S. Ma and G. M. Turino (2006). "Synergistic effect of hydrogen peroxide and elastase on elastic fiber injury in vitro." Exp Biol Med **231**(1): 107-111.

Carrel, A. and A. H. Ebeling (1921). "Age and Multiplication of Fibroblasts." J Exp Med **34**(6): 599-623.

Castella, M., R. Pujol, E. Callen, M. J. Ramirez, J. A. Casado, M. Talavera, T. Ferro, A. Munoz, J. Sevilla, L. Madero, E. Cela, C. Belendez, C. D. de Heredia, T. Olive, J. S. de Toledo, I. Badell, J. Estella, A. Dasi, A. Rodriguez-Villa, P. Gomez, M. Tapia, A. Molines, A. Figuera, J. A. Bueren and J. Surralles (2011). "Chromosome fragility in patients with Fanconi anaemia: diagnostic implications and clinical impact." J Med Genet **48**(4): 242-250.

Chance, B., H. Sies and A. Boveris (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev **59**(3): 527-605.

Chehab, N. H., A. Malikzay, M. Appel and T. D. Halazonetis (2000). "Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53." Genes Dev **14**(3): 278-288.

Chen, Q. M., J. C. Bartholomew, J. Campisi, M. Acosta, J. D. Reagan and B. N. Ames (1998). "Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication." Biochem J **332**(Pt 1): 43-50.

Chi, C. P. and C. B. Harley (1997). "Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase." Proc Soc Exp Biol Med **214**(2): 99-106.

Cho, K. A., S. J. Ryu, Y. S. Oh, J. H. Park, J. W. Lee, H. P. Kim, K. T. Kim, I. S. Jang and S. C. Park (2004). "Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status." J Biol Chem **279**(40): 42270-42278.

Cho, K. A., S. J. Ryu, J. S. Park, I. S. Jang, J. S. Ahn, K. T. Kim and S. C. Park (2003). "Senescent phenotype can be reversed by reduction of caveolin status." J Biol Chem **278**(30): 27789-27795.

Coppe, J. P., P. Y. Desprez, A. Krtolica and J. Campisi (2010). "The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression." Annu Rev Pathol **5**: 99-118.

Cristofalo, V. J. (2005). "SA beta Gal staining: biomarker or delusion." Exp Gerontol **40**(10): 836-838.

Cristofalo, V. J. and R. J. Pignolo (1993). "Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture." Physiol Rev **73**(3): 617-638.

d'Adda di Fagagna, F., S. H. Teo and S. P. Jackson (2004). "Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response." Genes Dev **18**(15): 1781-1799.

Dale, B. A., K. A. Resing and J. D. Lonsdale-Eccles (1985). "Filaggrin: a keratin filament associated protein." Ann N Y Acad Sci **455**: 330-342.

Darr, D., S. Combs, S. Dunston, T. Manning and S. Pinnell (1992). "Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage." British Journal of Dermatology **127**(3): 247-253.

Dasgupta, J., S. Kar, R. Liu, J. Joseph, B. Kalyanaraman, S. J. Remington, C. Chen and J. A. Melendez (2010). "Reactive oxygen species control senescence-associated matrix metalloproteinase-1 through c-Jun-N-terminal kinase." J Cell Physiol **225**(1): 52-62.

de Stanchina, E., M. E. McCurrach, F. Zindy, S. Y. Shieh, G. Ferbeyre, A. V. Samuelson, C. Prives, M. F. Roussel, C. J. Sherr and S. W. Lowe (1998). "E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor." Genes Dev **12**(15): 2434-2442.

Deutschmann, G. (2007). Die Haut und Ihre Anhangsgebilde: Lehrbuch Fur Krankenpflegepersonal und Andere Gesundheitsberufe, Springer London, Limited.

Dewberry, R. M., D. C. Crossman and S. E. Francis (2003). "Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RN) genotype modulates the replicative capacity of human endothelial cells." Circ Res **92**(12): 1285-1287.

Diekmann, J. & Alili, L., O. Holtkoetter, M. Giesen, P. Brenneisen (2013). "Aging in timelaps: ROS is not enough." Journal of investigative dermatology.

Dimri, G., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj and O. Pereira-Smith (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 9363 - 9367.

Dimri, G. P., K. Itahana, M. Acosta and J. Campisi (2000). "Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor." Mol Cell Biol **20**(1): 273-285.

Dimri, G. P., X. Lee, G. Basile, M. Acosta, G. Scott, C. Roskelley, E. E. Medrano, M. Linskens, I. Rubelj and O. Pereira-Smith (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**(20): 9363-9367.

Dong, K. K., N. Damaghi, S. D. Picart, N. G. Markova, K. Obayashi, Y. Okano, H. Masaki, S. Grether-Beck, J. Krutmann, K. A. Smiles and D. B. Yarosh (2008). "UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin." Exp Dermatol **17**(12): 1037-1044.

Draelos, Z. D. (2008). Procedures in Cosmetic Dermatology Series: Cosmeceuticals, Elsevier Health Sciences.

Duan, J., Z. Zhang and T. Tong (2005). "Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening." Int J Biochem Cell Biol **37**(7): 1407-1420.

Duthie, G. G., K. W. Wahle and W. P. James (1989). "Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease." Nutr Res Rev **2**(1): 51-62.

Elias, P. M. and R. Ghadially (2002). "The aged epidermal permeability barrier: basis for functional abnormalities." Clin Geriatr Med **18**(1): 103-120.

Eshaghian, A., R. A. Vleugels, J. A. Canter, M. A. McDonald, T. Stasko and J. E. Sligh (2006). "Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers." J Invest Dermatol **126**(2): 336-344.

Esposito, D., G. Fassina, P. Szabo, P. De Angelis, L. Rodgers, M. Weksler and M. Siniscalco (1989). "Chromosomes of older humans are more prone to aminopterine-induced breakage." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(4): 1302-1306.

Failla, G. (1958). "The aging process and cancerogenesis." Ann N Y Acad Sci **71**(6): 1124-1140.

Falk, M. and C. D. Anderson (2013). "Influence of age, gender, educational level and self-estimation of skin type on sun exposure habits and readiness to increase sun protection." Cancer Epidemiol **37**(2): 127-132.

Farage, M. A., K. W. Miller, P. Elsner and H. I. Maibach (2008). "Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review." Int J Cosmet Sci **30**(2): 87-95.

Farage, M. A., K. W. Miller and H. I. Maibach (2010). Textbook of Aging Skin, Springer.

Feilotter, H., C. Lingner, R. Rowley and P. G. Young (1992). "Regulation of the G2-mitosis transition." Biochem Cell Biol **70**(10-11): 954-971.

Fenske, N. A. and C. W. Lober (1986). "Structural and functional changes of normal aging skin." J Am Acad Dermatol **15**(4 Pt 1): 571-585.

Fenton, M., S. Barker, D. J. Kurz and J. D. Erusalimsky (2001). "Cellular senescence after single and repeated balloon catheter denudations of rabbit carotid arteries." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(2): 220-226.

Fisher, G. J., T. Quan, T. Purohit, Y. Shao, M. K. Cho, T. He, J. Varani, S. Kang and J. J. Voorhees (2009). "Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin." Am J Pathol **174**(1): 101-114.

Fisher, G. J. and J. J. Voorhees (1998). "Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce Ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo." J Investig Dermatol Symp Proc **3**(1): 61-68.

Franchitto, A., P. Pichierri, P. Mosesso and F. Palitti (1998). "Caffeine effect on the mitotic delay induced by G2 treatment with UVC or mitomycin C." Mutagenesis **13**(5): 499-505.

Fratzl, P. (2008). Collagen: Structure and Mechanics, Springer Science+Business Media, LLC.

Freitas, A. A. and J. P. de Magalhaes (2011). "A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing." Mutat Res **728**(1-2): 12-22.

Fripiat, C., Q. M. Chen, S. Zdanov, J. P. Magalhaes, J. Remacle and O. Toussaint (2001). "Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts." *J Biol Chem* **276**(4): 2531-2537.

Fritsch, P. (1983). *Dermatologie Venerologie: Grundlagen. Klinik. Atlas*, Springer.

Frye, E. B., T. P. Degenhardt, S. R. Thorpe and J. W. Baynes (1998). "Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins." *J Biol Chem* **273**(30): 18714-18719.

Fusenig, N. E., D. Breitkreutz, R. T. Dzarlieva, P. Boukamp, A. Bohnert and W. Tilgen (1983). "Growth and differentiation characteristics of transformed keratinocytes from mouse and human skin in vitro and in vivo." *J Invest Dermatol* **81**(1 Suppl): 168s-175s.

Galvao, M. M., M. N. Sotto, S. M. Kihara, E. A. Rivitti and E. Sabbaga (1998). "Lymphocyte subsets and Langerhans cells in sun-protected and sun-exposed skin of immunosuppressed renal allograft recipients." *J Am Acad Dermatol* **38**(1): 38-44.

Gardner, H., A. Broberg, A. Pozzi, M. Laato and J. Heino (1999). "Absence of integrin alpha1beta1 in the mouse causes loss of feedback regulation of collagen synthesis in normal and wounded dermis." *J Cell Sci* **112**(Pt 3): 263-272.

Gems, D. and R. Doonan (2009). "Antioxidant defense and aging in *C. elegans*: is the oxidative damage theory of aging wrong?" *Cell Cycle* **8**(11): 1681-1687.

Gensler, H. L. and H. Bernstein (1981). "DNA damage as the primary cause of aging." *Q Rev Biol* **56**(3): 279-303.

Gerdes, J., L. Li, C. Schlueter, M. Duchrow, C. Wohlenberg, C. Gerlach, I. Stahmer, S. Kloth, E. Brandt and H. D. Flad (1991). "Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67." *Am J Pathol* **138**(4): 867-873.

Gershon, H. and D. Gershon (1970). "Detection of inactive enzyme molecules in ageing organisms." *Nature* **227**(5264): 1214-1217.

Gilchrest, B. A. (1989). "Skin aging and photoaging: an overview." *J Am Acad Dermatol* **21**(3 Pt 2): 610-613.

Gilchrest, B. A. and J. Krutmann (2006). *Skin Aging*, Springer.

Gilley, D., H. Tanaka and B. S. Herbert (2005). "Telomere dysfunction in aging and cancer." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 1000-1013.

Goldfarb, M. T., C. N. Ellis, J. S. Weiss and J. J. Voorhees (1989). "Topical tretinoin therapy: its use in photoaged skin." J Am Acad Dermatol **21**(3 Pt 2): 645-650.

Green, L. M., J. L. Reade and C. F. Ware (1984). "Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines." J Immunol Methods **70**(2): 257-268.

Grether-Beck, S., S. Olaizola-Horn, H. Schmitt, M. Grewe, A. Jahnke, J. P. Johnson, K. Briviba, H. Sies and J. Krutmann (1996). "Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation- and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(25): 14586-14591.

Griffiths, C. E. (2001). "The role of retinoids in the prevention and repair of aged and photoaged skin." Clin Exp Dermatol **26**(7): 613-618.

Grove, G. L. (1989). "Physiologic changes in older skin." Clin Geriatr Med **5**(1): 115-125.

Haendeler, J., J. Hoffmann, J. F. Diehl, M. Vasa, I. Spyridopoulos, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2004). "Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells." Circ Res **94**(6): 768-775.

Halliwell, B. (1989). "Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis." Br J Exp Pathol **70**(6): 737-757.

Harley, C., A. Futcher and C. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**: 458 - 460.

Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." Nature **345**(6274): 458-460.

Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.

Harvey, M., A. T. Sands, R. S. Weiss, M. E. Hegi, R. W. Wiseman, P. Pantazis, B. C. Giovanella, M. A. Tainsky, A. Bradley and L. A. Donehower (1993). "In vitro growth characteristics of embryo fibroblasts isolated from p53-deficient mice." Oncogene **8**(9): 2457-2467.

Hayflick, L. (1965). "The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains." Exp Cell Res **37**: 614-636.

Hayflick, L. (2007). "Biological aging is no longer an unsolved problem." Ann N Y Acad Sci: 1-13.

Hayflick, L. and P. S. Moorhead (1961). "The serial cultivation of human diploid cell strains." Exp Cell Res **25**: 585-621.

Heckmann, M. (1999). Taschenlexikon Dermatologie.: Klinik, Diagnostik, Therapie, Springer-Verlag GmbH.

Herbig, U., W. A. Jobling, B. P. Chen, D. J. Chen and J. M. Sedivy (2004). "Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)." Mol Cell **14**(4): 501-513.

Honda, S., L. M. Hjelmeland and J. T. Handa (2002). "Senescence associated beta galactosidase activity in human retinal pigment epithelial cells exposed to mild hyperoxia in vitro." Br J Ophthalmol **86**(2): 159-162.

Huang, T. T., E. J. Carlson, A. M. Gillespie, Y. Shi and C. J. Epstein (2000). "Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **55**(1): B5-9.

Hutter, E., H. Unterluggauer, F. Überall, H. Schramek and P. Jansen-Durr (2002). "Relicative senescence of human fibroblasts: the role of Ras-dependent signaling and oxidative stress." Exp Gerontol **37**(10-11): 1165-1174.

Hyun, M., J. Lee, K. Lee, A. May, V. A. Bohr and B. Ahn (2008). "Longevity and resistance to stress correlate with DNA repair capacity in *Caenorhabditis elegans*." Nucleic Acids Res **36**(4): 1380-1389.

Iozzo (2000). Proteoglycans: Structure, Biology and Molecular Interactions, Marcel Dekker Incorporated.

Islaih, M., B. W. Halstead, I. A. Kadura, B. Li, J. L. Reid-Hubbard, L. Flick, J. L. Altizer, J. Thom Deahl, D. K. Monteith, R. K. Newton and D. E. Watson (2005). "Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals." Mutat Res **578**(1-2): 100-116.

Jackson, S. M., M. L. Williams, K. R. Feingold and P. M. Elias (1993). "Pathobiology of the stratum corneum." West J Med **158**(3): 279-285.

Jacob, C., G. I. Giles, N. M. Giles and H. Sies (2003). "Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function." Angew Chem Int Ed Engl **42**(39): 4742-4758.

Jacobi, G. H. (2005). Kursbuch Anti-Aging, Thieme.

Jaiswal, A. S., A. S. Multani, S. Pathak and S. Narayan (2004). "N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced senescence-like growth arrest in colon cancer cells is associated with loss of adenomatous polyposis coli protein, microtubule organization, and telomeric DNA." Mol Cancer **3**: 3.

Jayaraman, L. and C. Prives (1999). "Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein." Cell Mol Life Sci **55**(1): 76-87.

Jennissen, H. P. (1995). "Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation." Eur J Biochem **231**(1): 1-30.

Jensen, F. C., R. B. Gwatkin and J. D. Biggers (1964). "A Simple Organ Culture Method Which Allows Simultaneous Isolation of Specific Types of Cells." Exp Cell Res **34**: 440-447.

Johnson, J. L., S. Pillai, D. Pernazza, S. M. Sebti, N. J. Lawrence and S. P. Chellappan (2012). "Regulation of Matrix Metalloproteinase Genes by E2F Transcription Factors: Rb–Raf-1 Interaction as a Novel Target for Metastatic Disease." Cancer Research **72**(2): 516-526.

Jokura, Y., S. Ishikawa, H. Tokuda and G. Imokawa (1995). "Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid-state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy." J Invest Dermatol **104**(5): 806-812.

Kaatz, M., P. Elsner and M. J. Koehler (2008). "Changes in skin topography during hormone therapy." Menopause **15**(6): 1193-1194.

Kadler, K. (1994). Extracellular matrix 1: fibril-forming collagens, Academic Press.

Kashino, G., S. Kodama, Y. Nakayama, K. Suzuki, K. Fukase, M. Goto and M. Watanabe (2003). "Relief of oxidative stress by ascorbic acid delays cellular senescence of normal human and Werner syndrome fibroblast cells." Free Radic Biol Med **35**(4): 438-443.

Katakura, Y., E. Nakata, T. Miura and S. Shirahata (1999). "Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **255**(1): 110-115.

Katiyar, S. K. (2003). "Skin photoprotection by green tea: antioxidant and immunomodulatory effects." Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord **3**(3): 234-242.

Kester, W. R. and B. W. Matthews (1977). "Crystallographic study of the binding of dipeptide inhibitors to thermolysin: implications for the mechanism of catalysis." Biochemistry **16**(11): 2506-2516.

Kim, H., X. Liu, T. Kohyama, T. Kobayashi, H. Conner, S. Abe, Q. Fang, F. Q. Wen and S. I. Rennard (2004). "Cigarette smoke stimulates MMP-1 production by human lung fibroblasts through the ERK1/2 pathway." Copd **1**(1): 13-23.

Kirkwood, T. B. (1997). "The origins of human ageing." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **352**(1363): 1765-1772.

Kirkwood, T. B. and T. Cremer (1982). "Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress." Hum Genet **60**(2): 101-121.

Koch, S., C. M. Volkmar, V. Kolb-Bachofen, H. G. Korth, M. Kirsch, A. H. Horn, H. Sticht, N. Pallua and C. V. Suschek (2009). "A new redox-dependent mechanism of MMP-1 activity control comprising reduced low-molecular-weight thiols and oxidizing radicals." *J Mol Med* **87**(3): 261-272.

Komiyama, T., T. Kikuchi and Y. Sugiura (1982). "Generation of hydroxyl radical by anticancer quinone drugs, carbazilquinone, mitomycin C, aclacinomycin A and adriamycin, in the presence of NADPH-cytochrome P-450 reductase." *Biochem Pharmacol* **31**(22): 3651-3656.

Korzu, E., H. Nagase, R. Rydell and J. Travis (1997). "The Mitogen-activated Protein Kinase and JAK-STAT Signaling Pathways Are Required for an Oncostatin M-responsive Element-mediated Activation of Matrix Metalloproteinase 1 Gene Expression." *Journal of Biological Chemistry* **272**(2): 1188-1196.

Kosmadaki, M. G. and B. A. Gilchrest The demographics of aging in the United States: implications for dermatology, Arch Dermatol. 2002 Nov;138(11):1427-8.

Krishna, D. R., B. Sperker, P. Fritz and U. Klotz (1999). "Does pH 6 beta-galactosidase activity indicate cell senescence?" *Mech Ageing Dev* **109**(2): 113-123.

Krutmann, J. (2003). "[Premature skin aging by ultraviolet radiation and other environmental hazards. The molecular basis]." *Hautarzt* **54**(9): 809-817.

Kumar, S., R. Lipman and M. Tomasz (1992). "Recognition of specific DNA sequences by mitomycin C for alkylation." *Biochemistry* **31**(5): 1399-1407.

Kurz, D., S. Decary, Y. Hong and J. Erusalimsky (2000). "Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells." *J Cell Sci* **113**(Pt 20): 3613 - 3622.

Lanza, R. P., J. B. Cibelli, C. Blackwell, V. J. Cristofalo, M. K. Francis, G. M. Baerlocher, J. Mak, M. Schertzer, E. A. Chavez, N. Sawyer, P. M. Lansdorp and M. D. West (2000). "Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells." *Science* **288**(5466): 665-669.

Larsen, P. L. (1993). "Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 8905-8909.

Lee, Y.-J., S.-J. Park, S. L. M. Ciccone, C.-R. Kim and S.-H. Lee (2006). "An in vivo analysis of MMC-induced DNA damage and its repair." *Carcinogenesis* **27**(3): 446-453.

Lin, Y. C. and F. Grinnell (1993). "Decreased level of PDGF-stimulated receptor autophosphorylation by fibroblasts in mechanically relaxed collagen matrices." *J Cell Biol* **122**(3): 663-672.

Liu, Z., J. Liu, G. Xu and F. Wang (2009). "[Establishment of reconstituted human engineered skin model for evaluating cosmetic skin corrosion/irritation]." *Wei Sheng Yan Jiu* **38**(4): 468-471.

Löffler, G. (2008). Basiswissen Biochemie: Mit Pathobiochemie, Springer London, Limited.

Magana-Schwencke, N., J. A. Henriques, R. Chanet and E. Moustacchi (1982). "The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(6): 1722-1726.

Matheu, A., A. Maraver, P. Klatt, I. Flores, I. Garcia-Cao, C. Borras, J. M. Flores, J. Vina, M. A. Blasco and M. Serrano (2007). "Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway." Nature **448**(7151): 375-379.

Mays, P. K., R. J. McAnulty, J. S. Campa, A. D. Cambrey and G. J. Laurent (1990). "Similar age-related alterations in collagen metabolism in rat tissues in vivo and fibroblasts in vitro." Biochem Soc Trans **18**(5): 957.

McConnell, B. B., M. Starborg, S. Brookes and G. Peters (1998). "Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts." Curr Biol **8**(6): 351-354.

McPhillips, D. M., C. Lindamood, 3rd, J. E. Heath and D. L. Hill (1988). "The disposition and toxicology of retinyl methyl ether in rats dosed orally." Drug Metab Dispos **16**(5): 683-689.

Medvedev, Z. A. (1990). "An attempt at a rational classification of theories of ageing." Biol Rev Camb Philos Soc **65**(3): 375-398.

Mehta, I. S., M. Figgitt, C. S. Clements, I. R. Kill and J. M. Bridger (2007). "Alterations to nuclear architecture and genome behavior in senescent cells." Ann N Y Acad Sci: 250-263.

Meng, A., Y. Wang, G. Van Zant and D. Zhou (2003). "Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells." Cancer Res **63**(17): 5414-5419.

Millington, P. F. and R. Wilkinson (1983). Skin, Cambridge University Press.

Millis, A. J., M. Hoyle, H. M. McCue and H. Martini (1992). "Differential expression of metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase genes in aged human fibroblasts." Exp Cell Res **201**(2): 373-379.

Mitnitski, A. B., J. E. Graham, A. J. Mogilner and K. Rockwood (2002). "Frailty, fitness and late-life mortality in relation to chronological and biological age." BMC Geriatr **2**: 1.

Mitsui, Y. and E. L. Schneider (1976). "Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures." Experimental Cell Research **100**(1): 147-152.

Montagna, W. and K. Carlisle (1979). "Structural changes in aging human skin." J Invest Dermatol **73**(1): 47-53.

Müller-Esterl, W. (2010). Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler [Unter Mitarbeit von Ulrich Brandt, Oliver Anderka, Stefan Kerscher, Stefan Kieß und Katrin Ridinger], Spektrum Akademischer Verlag.

Muller, K.-C., L. Welker, K. Paasch, B. Feindt, V. Erpenbeck, J. Hohlfeld, N. Krug, M. Nakashima, D. Branscheid, H. Magnussen, R. Jorres and O. Holz (2006). "Lung fibroblasts from patients with emphysema show markers of senescence in vitro." Respiratory Research **7**(1): 32.

Muller, M. (2009). "Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations." Antioxid Redox Signal **11**(1): 59-98.

Nakagawa, S., P. Pawelek and F. Grinnell (1989). "Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness." Exp Cell Res **182**(2): 572-582.

Nishio, K., A. Inoue, S. Qiao, H. Kondo and A. Mimura (2001). "Senescence and cytoskeleton: overproduction of vimentin induces senescent-like morphology in human fibroblasts." Histochem Cell Biol **116**(4): 321-327.

Nyunoya, T., M. M. Monick, A. Klingelhutz, T. O. Yarovinsky, J. R. Cagley and G. W. Hunninghake (2006). "Cigarette Smoke Induces Cellular Senescence." American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **35**(6): 681-688.

Oh, C. W., E. A. Bump, J. S. Kim, D. Janigro and M. R. Mayberg (2001). "Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation." Radiat Res **156**(3): 232-240.

Orgel, L. E. (1963). "The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing." Proc Natl Acad Sci U S A **49**: 517-521.

Orgel, L. E. (1970). "The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing: a correction." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(3).

Orr, W. C., R. J. Mockett, J. J. Benes and R. S. Sohal (2003). "Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*." J Biol Chem **278**(29): 26418-26422.

Packer, L. and K. Fuehr (1977). "Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells." Nature **267**(5610): 423-425.

Pageon, H., H. Bakala, V. M. Monnier and D. Asselineau (2007). "Collagen glycation triggers the formation of aged skin in vitro." Eur J Dermatol **17**(1): 12-20.

Parenteau, N. L., C. M. Nolte, P. Bilbo, M. Rosenberg, L. M. Wilkins, E. W. Johnson, S. Watson, V. S. Mason and E. Bell (1991). "Epidermis generated in vitro: practical considerations and applications." Journal of Cellular Biochemistry **45**(3): 245-251.

Parker, J. D., K. M. Parker, B. H. Sohal, R. S. Sohal and L. Keller (2004). "Decreased expression of Cu-Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(10): 3486-3489.

Passegue, E. and E. F. Wagner (2000). "JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression." Embo J **19**(12): 2969-2979.

Paz, M. M., T. A. Das and M. Tomasz (1999). "Mitomycin C linked to DNA minor groove binding agents: synthesis, reductive activation, DNA binding and cross-linking properties and in vitro antitumor activity." Bioorg Med Chem **7**(12): 2713-2726.

Perez, V. I., A. Bokov, H. Van Remmen, J. Mele, Q. Ran, Y. Ikeda and A. Richardson (2009). "Is the oxidative stress theory of aging dead?" Biochim Biophys Acta **10**(14): 11.

Pérez, V. I., R. Buffenstein, V. Masamsetti, S. Leonard, A. B. Salmon, J. Mele, B. Andziak, T. Yang, Y. Edrey, B. Friguet, W. Ward, A. Richardson and A. Chaudhuri (2009). "Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(9): 3059-3064.

Peto, R., S. E. Parish and R. G. Gray (1985). "There is no such thing as ageing, and cancer is not related to it." IARC Sci Publ **58**: 43-53.

Pickart, L., J. M. Vasquez-Soltero and A. Margolina (2012). "The human tripeptide GHK-Cu in prevention of oxidative stress and degenerative conditions of aging: implications for cognitive health." Oxid Med Cell Longev **32**(10): 10.

Pignolo, R. J., B. G. Martin, J. H. Horton, A. N. Kalbach and V. J. Cristofalo (1998). "The pathway of cell senescence: WI-38 cells arrest in late G1 and are unable to traverse the cell cycle from a true G0 state." Exp Gerontol **33**(1-2): 67-80.

Podda, M. and M. Grundmann-Kollmann (2001). "Low molecular weight antioxidants and their role in skin ageing." Clinical and Experimental Dermatology **26**(7): 578-582.

Poole, L. B., P. A. Karplus and A. Claiborne (2004). "Protein sulfenic acids in redox signaling." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 325-347.

Probin, V., Y. Wang and D. Zhou (2007). "Busulfan-induced senescence is dependent on ROS production upstream of the MAPK pathway." Free Radic Biol Med **42**(12): 1858-1865.

Prunieras, M. (1983). "Methods for cultivation of Keratinocytes with an Air- Liquid- Interface." Journal of investigative dermatology **81**.

Purba, M. B., A. Kouris-Blazos, N. Wattanapenpaiboon, W. Lukito, E. M. Rothenberg, B. C. Steen and M. L. Wahlqvist (2001). "Skin wrinkling: can food make a difference?" J Am Coll Nutr **20**(1): 71-80.

Quan, T., Z. Qin, Y. Shao, Y. Xu, J. J. Voorhees and G. J. Fisher (2011). "Retinoids suppress cysteine-rich protein 61 (CCN1), a negative regulator of collagen homeostasis, in skin equivalent cultures and aged human skin in vivo." Exp Dermatol **20**(7): 572-576.

Raices, M., H. Maruyama, A. Dillin and J. Karlseder (2005). "Uncoupling of longevity and telomere length in *C. elegans*." PLoS Genet **1**(3).

Ranganathan, A. C., K. K. Nelson, A. M. Rodriguez, K. H. Kim, G. B. Tower, J. L. Rutter, C. E. Brinckerhoff, T. T. Huang, C. J. Epstein, J. J. Jeffrey and J. A. Melendez (2001). "Manganese superoxide dismutase signals matrix metalloproteinase expression via H₂O₂-dependent ERK1/2 activation." J Biol Chem **276**(17): 14264-14270.

Rassow, J., K. Hauser, R. Deutzmann and R. Netzker (2012). Duale Reihe Biochemie, Thieme.

Ravanti, L., J. Heino, C. Lopez-Otin and V. M. Kahari (1999). "Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem **274**(4): 2446-2455.

Ravi, R. K., M. McMahon, Z. Yangang, J. R. Williams, L. E. Dillehay, B. D. Nelkin and M. Mabry (1999). "Raf-1-induced cell cycle arrest in LNCaP human prostate cancer cells." J Cell Biochem **72**(4): 458-469.

Reaper, P. M., F. di Fagagna and S. P. Jackson (2004). "Activation of the DNA damage response by telomere attrition: a passage to cellular senescence." Cell Cycle **3**(5): 543-546.

Regnier, M., D. Caron, U. Reichert and H. Schaefer (1992). "Reconstructed human epidermis: a model to study in vitro the barrier function of the skin." Skin Pharmacol **5**(1): 49-56.

Rheinwald, J. G. (1976). "Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes." Nature.

Rheinwald, J. G. and H. Green (1975). "Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells." Cell **6**(3): 331-343.

Riikonen, T., J. Westermarck, L. Koivisto, A. Broberg, V. M. Kahari and J. Heino (1995). "Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression." J Biol Chem **270**(22): 13548-13552.

Robles, S. J., P. W. Buehler, A. Negrusz and G. R. Adam (1999). "Permanent cell cycle arrest in asynchronously proliferating normal human fibroblasts treated with doxorubicin or etoposide but not camptothecin." Biochem Pharmacol **58**(4): 675-685.

Rodemann, H. P. (1989). "Differential degradation of intracellular proteins in human skin fibroblasts of mitotic and mitomycin-C (MMC)-induced postmitotic differentiation states in vitro." Differentiation **42**(1): 37-43.

Rodier, F. and J. Campisi (2011). "Four faces of cellular senescence." J Cell Biol **192**(4): 547-556.

Rodier, F., S. H. Kim, T. Nijjar, P. Yaswen and J. Campisi (2005). "Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance." Int J Biochem Cell Biol **37**(5): 977-990.

Roy, S., S. Khanna, K. Nallu, T. K. Hunt and C. K. Sen (2006). "Dermal wound healing is subject to redox control." Mol Ther **13**(1): 211-220.

Salmon, A. B., A. Richardson and V. I. Perez (2010). "Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?" Free Radic Biol Med **48**(5): 642-655.

Sander, C. S., H. Chang, S. Salzmann, C. S. Muller, S. Ekanayake-Mudiyanselage, P. Elsner and J. J. Thiele (2002). "Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo." J Invest Dermatol **118**(4): 618-625.

Sanz, A. and R. K. Stefanatos (2008). "The mitochondrial free radical theory of aging: a critical view." Curr Aging Sci **1**(1): 10-21.

Scharffetter-Kochanek, K., M. Wlaschek, P. Brenneisen, M. Schauen, R. Blaudschun and J. Wenk (1997). "UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging." Biol Chem **378**(11): 1247-1257.

Schmiegelow, P., A. Nussgen, K. Grasedyck and J. Lindner (1986). "[Skin changes in advanced age--biochemical findings corresponding to morphology?]." Z Gerontol **19**(3): 179-189.

Scott, I. R., C. R. Harding and J. G. Barrett (1982). "Histidine-rich protein of the keratohyalin granules. Source of the free amino acids, urocanic acid and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum." Biochim Biophys Acta **719**(1): 110-117.

Seguchi, T., C. Y. Cui, S. Kusuda, M. Takahashi, K. Aisu and T. Tezuka (1996). "Decreased expression of filaggrin in atopic skin." Arch Dermatol Res **288**(8): 442-446.

Sell, D. R., M. A. Lane, W. A. Johnson, E. J. Masoro, O. B. Mock, K. M. Reiser, J. F. Fogarty, R. G. Cutler, D. K. Ingram, G. S. Roth and V. M. Monnier (1996). "Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 485-490.

Sellheyer, K. (2003). "Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation?" J Cutan Pathol **30**(2): 123-127.

Serrano, M. and M. A. Blasco (2001). "Putting the stress on senescence." Curr Opin Cell Biol **13**(6): 748-753.

Serrano, M., A. W. Lin, M. E. McCurrach, D. Beach and S. W. Lowe (1997). "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." Cell **88**(5): 593-602.

Severino, J., R. Allen, S. Balin, A. Balin and V. Cristofalo (2000). "Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo?" Exp Cell Res **257**: 162 - 171.

Sherratt, M. J. (2009). "Tissue elasticity and the ageing elastic fibre." Age **31**(4): 305-325.

Shiels, P. G., A. J. Kind, K. H. Campbell, D. Waddington, I. Wilmut, A. Colman and A. E. Schnieke Analysis of telomere lengths in cloned sheep, Nature. 1999 May 27;399(6734):316-7.

Shuster, S., M. M. Black and E. McVitie (1975). "The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density." Br J Dermatol **93**(6): 639-643.

Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-219.

Sies, H. (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." Exp Physiol **82**(2): 291-295.

Sies, H. and W. Stahl (2004). "Nutritional protection against skin damage from sunlight." Annu Rev Nutr **24**: 173-200.

Sigal, S. H., P. Rajvanshi, G. R. Gorla, R. P. Sokhi, R. Saxena, D. R. Gebhard, Jr., L. M. Reid and S. Gupta (1999). "Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events." Am J Physiol **276**(5 Pt 1): G1260-1272.

Sohal, R. S., H. H. Ku and S. Agarwal (1993). "Biochemical correlates of longevity in two closely related rodent species." Biochem Biophys Res Commun **196**(1): 7-11.

Stein, G. H., M. Beeson and L. Gordon (1990). "Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts." Science **249**(4969): 666-669.

Stein, G. H. and V. Dulic (1995). "Origins of G1 arrest in senescent human fibroblasts." Bioessays **17**(6): 537-543.

Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.

Stewart, S. A., I. Ben-Porath, V. J. Carey, B. F. O'Connor, W. C. Hahn and R. A. Weinberg (2003). "Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence." Nat Genet **33**(4): 492-496.

Strehler, B. L. (1962). Time, cells, and aging, Academic Press.

Sudel, K. M., K. Venzke, H. Mielke, U. Breitenbach, C. Mundt, S. Jaspers, U. Koop, K. Sauermann, E. Knussman-Hartig, I. Moll, G. Gercken, A. R. Young, F. Stab, H. Wenck and S. Gallinat (2005). "Novel aspects of intrinsic and extrinsic aging of human skin: beneficial effects of soy extract." *Photochem Photobiol* **81**(3): 581-587.

Suh, Y., D.-I. Kim, J.-S. Park, W.-Y. Park and S. C. Park (2001). "Induction of Senescence-like Phenotype by an Alkylating Agent, Methyl Methanesulfonate, in Human Diploid Fibroblast." *Annals of the New York Academy of Sciences* **928**(1): 365-365.

Taddese, S., A. S. Weiss, R. H. Neubert and C. E. Schmelzer (2008). "Mapping of macrophage elastase cleavage sites in insoluble human skin elastin." *Matrix Biol* **27**(5): 420-428.

Takahashi, M. and T. Tezuka (2004). "The content of free amino acids in the stratum corneum is increased in senile xerosis." *Arch Dermatol Res* **295**(10): 448-452.

Takebe, H., Y. Miki, T. Kozuka, J. I. Furuyama and K. Tanaka (1977). "DNA repair characteristics and skin cancers of xeroderma pigmentosum patients in Japan." *Cancer Res* **37**(2): 490-495.

Talwar, H. S., C. E. Griffiths, G. J. Fisher, T. A. Hamilton and J. J. Voorhees (1995). "Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin." *J Invest Dermatol* **105**(2): 285-290.

Taylor, W. R., S. E. DePrimo, A. Agarwal, M. L. Agarwal, A. H. Schönthal, K. S. Katula and G. R. Stark (1999). "Mechanisms of G2 Arrest in Response to Overexpression of p53." *Molecular Biology of the Cell* **10**(11): 3607-3622.

Tian, X. C., C. Kubota, B. Enright and X. Yang (2003). "Cloning animals by somatic cell nuclear transfer--biological factors." *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 98.

Tomasz, M. (1995). "Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective)." *Chem Biol* **2**(9): 575-579.

Tomasz, M., A. K. Chawla and R. Lipman (1988). "Mechanism of monofunctional and bifunctional alkylation of DNA by mitomycin C." *Biochemistry* **27**(9): 3182-3187.

Tomasz, M. and Y. Palom (1997). "The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity." *Pharmacol Ther* **76**(1-3): 73-87.

Toussaint, O., E. E. Medrano and T. von Zglinicki (2000). "Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes." *Experimental Gerontology* **35**(8): 927-945.

Toussaint, O., J. Remacle, J. F. Dierick, T. Pascal, C. Frippiat, S. Zdanov, J. P. Magalhaes, V. Royer and F. Chainiaux (2002). "From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing." *Int J Biochem Cell Biol* **34**(11): 1415-1429.

Trifunovic, A. (2006). "Mitochondrial DNA and ageing." *Biochim Biophys Acta*: 31.

Tsuji, T., K. Aoshiba and A. Nagai (2006). "Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema." Am J Respir Crit Care Med **174**(8): 886-893.

Tubbs, J. L., V. Latypov, S. Kanugula, A. Butt, M. Melikishvili, R. Kraehenbuehl, O. Fleck, A. Marriott, A. J. Watson, B. Verbeek, G. McGown, M. Thorncroft, M. F. Santibanez-Koref, C. Millington, A. S. Arvai, M. D. Kroeger, L. A. Peterson, D. M. Williams, M. G. Fried, G. P. Margison, A. E. Pegg and J. A. Tainer (2009). "Flipping of alkylated DNA damage bridges base and nucleotide excision repair." Nature **459**(7248): 808-813.

Tyner, S. D., S. Venkatachalam, J. Choi, S. Jones, N. Ghebranious, H. Igelmann, X. Lu, G. Soron, B. Cooper, C. Brayton, S. H. Park, T. Thompson, G. Karsenty, A. Bradley and L. A. Donehower (2002). "p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes." Nature **415**(6867): 45-53.

Umeda, H., F. Nakamura and K. Suyama (2001). "Oxodesmosine and iso-oxodesmosine, candidates of oxidative metabolic intermediates of pyridinium cross-links in elastin." Arch Biochem Biophys **385**(1): 209-219.

Untergasser, G., R. Gander, H. Rumpold, E. Heinrich, E. Plas and P. Berger (2003). "TGF-beta cytokines increase senescence-associated beta-galactosidase activity in human prostate basal cells by supporting differentiation processes, but not cellular senescence." Exp Gerontol **38**(10): 1179-1188.

van der Loo, B., M. J. Fenton and J. D. Erusalimsky (1998). "Cytochemical detection of a senescence-associated beta-galactosidase in endothelial and smooth muscle cells from human and rabbit blood vessels." Exp Cell Res **241**(2): 309-315.

Van Raamsdonk, J. M. and S. Hekimi (2009). "Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*." PLoS Genet **5**(2): 6.

Van Remmen, H., Y. Ikeno, M. Hamilton, M. Pahlavani, N. Wolf, S. R. Thorpe, N. L. Alderson, J. W. Baynes, C. J. Epstein, T. T. Huang, J. Nelson, R. Strong and A. Richardson (2003). "Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging." Physiol Genomics **16**(1): 29-37.

Varani, J., D. Spearman, P. Perone, S. E. Fligiel, S. C. Datta, Z. Q. Wang, Y. Shao, S. Kang, G. J. Fisher and J. J. Voorhees (2001). "Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro." Am J Pathol **158**(3): 931-942.

Varani, J., R. L. Warner, M. Gharaee-Kermani, S. H. Phan, S. Kang, J. H. Chung, Z. Q. Wang, S. C. Datta, G. J. Fisher and J. J. Voorhees (2000). "Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin." J Invest Dermatol **114**(3): 480-486.

Venkatachalam, P., S. M. de Toledo, B. N. Pandey, L. A. Tephly, A. B. Carter, J. B. Little, D. R. Spitz and E. I. Azzam (2008). Regulation of normal cell cycle progression by flavin-containing oxidases.

Vijg, J. and M. E. Dolle (2002). "Large genome rearrangements as a primary cause of aging." Mech Ageing Dev **123**(8): 907-915.

Vitellaro-Zuccarello, L., S. Cappelletti, V. Dal Pozzo Rossi and M. Sari-Gorla (1994). "Stereological analysis of collagen and elastic fibers in the normal human dermis: variability with age, sex, and body region." Anat Rec **238**(2): 153-162.

Vuillermoz, B., Y. Wegrowski, J. L. Contet-Audonneau, L. Danoux, G. Pauly and F. X. Maquart (2005). "Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts." Mol Cell Biochem **277**(1-2): 63-72.

Waldmann, A., S. Nolte, A. C. Geller, A. Katalinic, M. A. Weinstock, B. Volkmer, R. Greinert and E. W. Breitbart (2012). "Frequency of excisions and yields of malignant skin tumors in a population-based screening intervention of 360,288 whole-body examinations." Arch Dermatol **148**(8): 903-910.

Wang, X., S. C. Wong, J. Pan, S. W. Tsao, K. H. Fung, D. L. Kwong, J. S. Sham and J. M. Nicholls (1998). "Evidence of cisplatin-induced senescent-like growth arrest in nasopharyngeal carcinoma cells." Cancer Res **58**(22): 5019-5022.

Wang, Y., J. P. Gray, V. Mishin, D. E. Heck, D. L. Laskin and J. D. Laskin (2010). "Distinct roles of cytochrome P450 reductase in mitomycin C redox cycling and cytotoxicity." Mol Cancer Ther **9**(6): 1852-1863.

Weinert, T. (1998). "DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair." Cell **94**(5): 555-558.

Wenyi, W., H. Utz, W. Shan, D. Annie and M. S. John (2003). "Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts." EMBO reports **4**(11): 1061-1065.

Wlaschek, M., K. Briviba, G. P. Stricklin, H. Sies and K. Scharffetter-Kochanek (1995). "Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase." J Invest Dermatol **104**(2): 194-198.

Wlaschek, M., C. Hommel, J. Wenk, P. Brenneisen, W. Ma, G. Herrmann and K. Scharffetter-Kochanek (2000). "Isolation and identification of psoralen plus ultraviolet A (PUVA)-induced genes in human dermal fibroblasts by polymerase chain reaction-based subtractive hybridization." J Invest Dermatol **115**(5): 909-913.

Wlaschek, M., I. Tantcheva-Poor, L. Naderi, W. Ma, L. A. Schneider, Z. Razi-Wolf, J. Schuller and K. Scharffetter-Kochanek (2001). "Solar UV irradiation and dermal photoaging." J Photochem Photobiol B **63**(1-3): 41-51.

Wohlrab, W. (1990). "[Effect of urea on penetration kinetics of vitamin A acid in human skin]." Z Hautkr **65**(9): 803-805.

Wolff, K., L. Goldsmith, S. Katz, B. Gilchrest, A. Paller and D. Leffell (2007). Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine, Seventh Edition: Two Volumes, McGraw-Hill Companies, Incorporated.

Xu, D., R. Neville and T. Finkel (2000). "Homocysteine accelerates endothelial cell senescence." FEBS Lett **470**(1): 20-24.

Yaar, M. (2006). Clinical and Histological Features of Intrinsic versus Extrinsic Skin Aging. Skin Aging. B. Gilchrest and J. Krutmann, Springer Berlin Heidelberg: 9-21.

Yin, L., A. Morita and T. Tsuji (2000). "Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract." Arch Dermatol Res **292**(4): 188-194.

Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II and J. A. Thomson (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-1920.

Zhou, Z. Q., D. Manguino, K. Kewitt, G. W. Intano, C. A. McMahan, D. C. Herbert, M. Hanes, R. Reddick, Y. Ikeno and C. A. Walter (2001). "Spontaneous hepatocellular carcinoma is reduced in transgenic mice overexpressing human O6- methylguanine-DNA methyltransferase." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12566-12571.

Konferenzen, Posterbeiträge und Publikationen

4th Mildred Scheel Cancer Conference (Bonn)

19. – 21. Mai 2010

Aging and Cancer Conference (Heidelberg)

19. – 21. Mai 2011

Posterbeitrag: Skin aging in timelapse

Teile dieser Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Diekmann J, Alili L, Holtkoetter O, Giesen M, Brenneisen P. „Aging in timelapse: ROS is not enough“ (*Journal of Investigative Dermatology*)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Düsseldorf in Kooperation mit Henkel AG & Co. KGaA angefertigt. Ich möchte mich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit, sowie die interinstitutionelle Ausrichtung bedanken. Diese Doktorarbeit wäre nicht möglich gewesen, wenn mich nicht eine Vielzahl von Menschen auf meinem Weg begleitet und unterstützt hätten.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Peter Brenneisen für die interessante Themenstellung und die fachliche Betreuung bedanken. Durch seine wissenschaftlichen Ratschläge, Ideen und Diskussionen habe ich gelernt, was wissenschaftliches Arbeiten bedeutet. Vielen Dank!

Bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Joachim Ernst (Institut für Mikrobiologie) danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät und für die Übernahme des Koreferats sowie die freundliche Betreuung.

Ebenso möchte ich mich von ganzem Herzen bei Herrn Dr. Olaf Holtkötter für die vielen Anregungen und seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft bedanken. Seine Tür stand immer für mich offen und die Unterstützung ging weit über wissenschaftliche Themen hinaus.

Frau Melanie Giesen danke ich für die gute Betreuung durch ihre fachliche und moralische Unterstützung. Ihre ständige Hilfsbereitschaft und das stetige Engagement haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Für die herzliche Unterstützung bei meiner Arbeit danke ich Frau Dr. Lirija Alili. Durch deine zahlreichen Hilfestellungen und Ideen ist diese Arbeit überhaupt erst möglich geworden. Danke, dass du neben der fachlichen Begleitung auch zahlreiche freie Abende für mich geopfert hast und mir nicht zuletzt auch durch die vielen privaten Gespräche zu einem wertvollen und freundschaftlichen Wegbegleiter geworden bist. 1000 Dank!

Außerdem möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. Maren Sack bedanken. Du hattest immer ein offenes Ohr für mich und hast mich unterstützt, egal ob auf fachlicher oder privater Ebene. Ich bin sehr froh, dass ich dich kennen gelernt habe.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Labor- und Bürokolleginnen Kerstin Elias und Gudrun Heinen. Was hätte ich nur ohne euch gemacht?! Ihr ward viel mehr für mich als nur fachliche Ansprechpartner, vielen Dank für die schöne Zeit und die unendlich vielen Hilfestellungen, die ihr mir zu jeder Tages und Nachtzeit bereit ward zu geben. KJG!

Für die Hilfestellung im Laboralltag und die aufmunternden Gespräche danke ich Claudia Wyrich und Vanessa Pützer.

Dr. Silke de Spirt und PD Dr. Holger Steinbrenner danke ich sehr für die qualifizierten wissenschaftlichen Tipps und dass sie für Fragen immer offen waren.

Uschi Engels hat mich in der FACS- Analyse unterstützt und mit mir viele Stunden vor dem FACS-Gerät verbracht. Vielen Dank dafür.

Swenja Kalischke danke ich für die zahlreichen Paraffinschnitte die sie für mich angefertigt hat.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I und der Abteilung *Biological and Clinical Research* bei Henkel für die gute Zusammenarbeit, das nette Arbeitsklima und die Unterstützung bei organisatorischen Angelegenheiten bedanken. Marlies, Thomas, Tina, Sylwia, Carina, Tanja, Andrea, Heide, Peter, Gilla, Diane und besonders Sarah, sowie Werner, Marion, Melanie, Guido, Sabine, Christof, Tanja, Nelli und Lars vielen Dank für eure Hilfe!

Mein Dank an Philipp lässt sich nicht in Worte fassen. Du hast mir stets Mut zugesprochen, unendlich viel Verständnis gezeigt und sämtliche Launen der letzten Zeit ertragen. Ich liebe dich!

Den größten Dank schulde ich meiner Familie. Ohne die grenzenlose und uneingeschränkte Unterstützung meiner Eltern Uwe und Petra, sowie meiner Schwester Helena, wäre ich nicht dort, wo ich jetzt bin. Danke, dass ihr immer für mich da ward!

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

Düsseldorf, April 2013

(J. Diekmann)