

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. J. W. Fischer

**Untersuchungen zum Einfluss von  $17\beta$ -Östrogen auf die extrazelluläre  
Matrix von *hairless-(skh-1)*-Mäusen während der intrinsischen und  
extrinsischen Hautalterung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Meusch

2016

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. J. W. Fischer

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. B. Homey

***Die Freiheit entwickelt sich immer  
neu an den Widerständen.***

(Willi Baumeister)

***Meiner Familie.***

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Röck K., Joosse S.A., Müller J., Heinisch N., Fuchs N., Meusch M., Zipper P., Reifenberger J., Pantel K., Fischer J.W. „Chronic UVB-irradiation actuates perpetuated dermal matrix remodeling in female mice: Protective role of estrogen“. *Sci. Rep.*; 2016 Jul 27; 6:30482

Röck K., Meusch M., Fuchs N., Tigges J., Zipper P., Fritsche E., Krutmann J., Homey B., Reifenberger J., Fischer J.W. „Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging by release of epidermal growth factor from keratinocytes“. *J. Biol. Chem.*; 2012 Jun 8; 287(24): 20056-69

Röck K., Meusch M., Fuchs N., Tigges J., Zipper P., Fritsche E., Krutmann J., Homey B., Reifenberger J., Fischer J.W. „Estradiol induced paracrine release of EGF from keratinocytes protects the dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2012; 385 (Suppl 1): S.76

Röck K., Meusch M., Fuchs N., Zipper P., Tigges J., Homey B., Fritsche E., Reifenberger J., Fischer J.W. „Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photo aging by release of EGF from keratinocytes“. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2011; 383 (Suppl 1): S.71

Röck K., Meusch M., Fuchs N., Zipper P., Freudenberger T., Krutmann J., Reifenberger J., Fischer J.W. „Estrogen augments dermal hyaluronan and proteoglycans during extrinsic skin ageing in mice“ *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*; 2010; 381 (Suppl 1): S. 1-92

# Zusammenfassung

Die Haut ist eines der ersten Organe, in dem sich altersassoziierte Veränderungen zeigen. Prinzipiell wird hierbei zwischen Prozessen der intrinsischen/chronologischen und der extrinsischen Hautalterung unterschieden, wobei die UV-Exposition den wichtigsten Faktor der extrinsischen Alterung darstellt. In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass Veränderungen der dermalen extrazellulären Matrix (EZM) integraler Bestandteil beider Formen der Hautalterung sind. Während Veränderungen der Kollagen-Matrix bereits in diversen Studien charakterisiert wurden, ist über Alterationen dermalen Proteoglykane, z.B. Lumikan (LUM), Biglykan (BGN) und Versikan (VER), bzw. Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure (HA) weit weniger bekannt. Weitere Untersuchungen legen nahe, dass Östrogene ( $E_2$ ), denen ein positiver Effekt auf funktionelle und strukturelle Charakteristika der Haut zugeschrieben wird, sowie entsprechend das postmenopausale Absinken des  $E_2$ -Spiegels eine Rolle bei der dermalen Alterung und EZM-Regulation spielen. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es den Einfluss von  $E_2$  auf die dermale Alterung unter der Berücksichtigung der unterschiedlichen EZM-Komponenten während beider Formen der Hautalterung an „*hairless-skh-1-Mäusen*“ zu evaluieren. Zur Analyse des Einflusses von  $E_2$  wurden die Tiere ovariektomiert und so die endogene Hormonproduktion inhibiert. Im Anschluss wurde entweder ein Placebo- oder ein  $E_2$ -freisetzendes Pellet (1,1  $\mu\text{g}$   $17\beta$ -Estradiol/Tag) implantiert. Mittels UVB-Bestrahlung (3x/Woche, 80  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ , 280-320 nm) wurde der Prozess der extrinsischen Hautalterung imitiert. Nach 20 Wochen Behandlung wurden Hautbiopsien entnommen und einer immunhistochemischen Aufarbeitung zugeführt. Zudem wurde die Messung physiologischer Parameter (Elastizität, transepidermaler Wasserverlust, Hydratisierung) vorgenommen. Die  $E_2$ -Behandlung erhöhte den dermalen HA- und VER-Gehalt und verhinderte Verluste der zwei EZM-Komponenten bei bestrahlten und unbestrahlten Tieren. Darüber hinaus führte  $E_2$  bei beiden Formen der Hautalterung zu einer gesteigerten Akkumulation von BGN, LUM und Kollagen und inhibierte die Kollagenfragmentierung. Funktionell schien  $E_2$  antiinflammatorisch durch eine verminderte Einwanderung von Makrophagen und pro-proliferativ, wie durch Quantifizierung der Ki67-positiven Zellen detektierbar, zu wirken. Die Analyse der Hautparameter zeigte einen extrinsisch erhöhten Wasser- und Elastizitätsverlust der Haut. Es konnte kein einheitlicher Zusammenhang zwischen  $E_2$ -Substitution bzw. -Depletion und o.g. Parametern detektiert werden. Insgesamt führte die  $E_2$ -Substitution somit zu strukturellen Veränderungen der EZM, welche vermutlich insbesondere in der extrinsisch gealterten Haut einen positiven Einfluss auf *Remodeling* und Integrität der Dermis haben dürften. Es gelang somit eine neue und detaillierte Charakterisierung der dermalen EZM aus struktureller und funktioneller Sicht unter dem Aspekt verschiedener  $E_2$ -Spiegel im Zuge der zwei verschiedenen Formen der Hautalterung. Zudem gelang es erstmalig einen Zusammenhang zwischen  $E_2$ , UVB-Exposition und BGN sowie LUM in diesem Kontext zu beschreiben.

# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>2</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>3</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>4</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>5</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Extrazelluläre Matrix der Haut.....</b>	<b>1</b>
5.1.1	Hyaluronsäure.....	2-4
5.1.2	Kollagene.....	4
5.1.3	Proteoglykane.....	5
5.1.3.1	Biglykan.....	5
5.1.3.2	Lumikan.....	5-6
5.1.3.3	Versikan.....	6-7
<b>5.2</b>	<b>Die Extrazelluläre Matrix während der Hautalterung.....</b>	<b>7</b>
5.2.1	Intrinsische Hautalterung.....	7-8
5.2.2	Extrinsische Hautalterung.....	8-9
<b>5.3</b>	<b>Die Rolle von Östrogenen im Prozess der Hautalterung.....</b>	<b>9-10</b>
<b>5.4</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>10-11</b>
<b>6</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
<b>6.1</b>	<b>Puffer, Lösungen und Substanzen.....</b>	<b>12-13</b>
<b>6.2</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>14-15</b>
<b>6.3</b>	<b>Geräte und Materialien.....</b>	<b>15</b>
<b>6.4</b>	<b>Studiendesign und Versuchsplanung.....</b>	<b>15</b>
6.4.1	Zeitplan der Behandlung.....	16

6.4.2 Studiendesign und Gruppeneinteilung.....	17
<b>6.5 Tiere und Behandlung.....</b>	<b>18</b>
6.5.1 Operative Entfernung der Eierstöcke.....	18
6.5.2 Implantation Östrogen-substituierender Pellets.....	18-19
6.5.3 Bestrahlungsprotokoll.....	19
6.5.4 Entnahme von murinen Hautproben.....	19
<b>6.6 Quantifizierung der Hautparameter.....</b>	<b>19</b>
<b>6.7 Histologische Untersuchungen.....</b>	<b>20</b>
6.7.1 Gefrierschnitte/Kryoschnitte.....	20
6.7.2 Immunhistochemische Färbungen.....	21-22
6.7.3 Siriusrot-Färbung.....	22-23
<b>6.8 Auswertung von histologischem Material.....</b>	<b>23</b>
6.8.1 Mikroskop.....	23
6.8.2 Quantitative Auswertung mittels <i>ImageJ</i> .....	24
6.8.3 Quantifizierung MAC2-positiver Zellen durch Zellzählung.....	24
6.8.4 Quantifizierung Ki67-positiver Zellen durch Angabe relativer Fraktionen...24	24
<b>6.9 Statistische Auswertung.....</b>	<b>24</b>
<b>7 Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
<b>7.1 Histologische Analyse der extrazellulären Matrix.....</b>	<b>25</b>
7.1.1 Modulation der Hyaluronsäure-Matrix.....	25-26
7.1.2 Quantifizierung und Alterationen von Biglykan.....	27-28
7.1.3 Quantifizierung und Alterationen von Lumikan.....	29-30
7.1.4 Quantifizierung und Alterationen von Versikan.....	31-32



7.1.5 Packungsdichte kollagener Fasern.....	33-35
7.1.6 Kollagendegradation.....	36-37
7.1.7 Modifikationen im Proliferationsstatus dermalen Zellen.....	38-39
7.1.8 Quantifizierung inflammatorischer Prozesse.....	40-41
<b>7.2 Erfassung funktioneller Hautparameter.....</b>	<b>42</b>
7.2.1 Feuchtigkeitsgehalt der Haut.....	42
7.2.2 Trans-epidermaler Wasserverlust.....	43
7.2.3 Dehnbarkeit der Haut.....	44
7.2.4 Dehnsteifigkeit der Haut.....	45
<b>8 Diskussion.....</b>	<b>46</b>
<b>8.1 Charakteristika der intrinsischen Hautalterung.....</b>	<b>46</b>
8.1.1 Verlust von Versikan bei konstantem Hyaluronsäuregehalt.....	46
8.1.2 Konstanter Gehalt von Biglykan und Lumikan.....	46-47
8.1.3 Zunahme kollagener Neopepitope bei konstantem Gesamtkollagen.....	47-48
8.1.4 Alterationen dermalen PG scheinen dem Kollagenverlust und funktionellen Einbußen im Verlauf der intrinsischen Hautalterung voraus zu gehen.....	48
<b>8.2 Charakteristika der extrinsischen Hautalterung.....</b>	<b>48</b>
8.2.1 Zunahme von Hyaluronsäure und Versikan.....	48-49
8.2.2 Zunahme von Biglykan und Lumikan.....	49-50
8.2.3 Kollagenfragmentierung.....	50-51
8.2.4 UVB-Exposition führt zur Verminderung der Elastizität der Haut bei erhöhtem Wasserverlust und induziert einen kutanen Entzündungsprozess..	51-52
<b>8.3 Rolle von Östrogenen im zeitlichen Verlauf der Hautalterung.....</b>	<b>52</b>
8.3.1 Östrogen erhöht Hyaluronsäure und Versikan während extrinsischer und	

intrinsischer Hautalterung.....	52-53
8.3.2 Östrogen erhöht Biglykan und Lumikan während intrinsischer und extrinsischer Hautalterung.....	53-54
8.3.3 Östrogen steigert den dermalen Gesamtkollagengehalt und inhibiert dermale Kollagenfragmentierung.....	55
8.3.4 Östrogen wirkt anti-inflammatorisch und fördert dermale zelluläre Proliferation.....	55-56
<b>9 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>57</b>
<b>10 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>11 Eidesstattliche Versicherung</b>	
<b>12 Danksagung</b>	

## 2 Abkürzungsverzeichnis

<b>AK</b>	Antikörper
<b>APC</b>	<i>Antigen presenting cells</i> / Antigen präsentierende Zellen
<b>BGN</b>	Biglykan
<b>BL</b>	Basallamina
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>CS</b>	Chondroitinsulfat
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin
<b>DS</b>	Dermatansulfat
<b>E<sub>2</sub></b>	Estrogen/Östrogen
<b>EGF</b>	<i>Epidermal growth factor</i> / Endothelialer Wachstumsfaktor
<b>ELA</b>	Elastin
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>EZR</b>	Extrazellulärer Raum / Extrazellulärraum
<b>FACIT</b>	Fibrillen assoziierte Kollagene mit nicht durchgängiger Triplehelix
<b>FKS</b>	Fetales Kälberserum
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykan(e)
<b>GF</b>	<i>Growth factor</i> / Wachstumsfaktor
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
<b>HA</b>	Hyaluronsäure / Hyaluronan
<b>HABP</b>	Hyaluronsäure-Bindeprotein
<b>HABR</b>	Hyaluronsäure bindende Region
<b>HAS</b>	Hyaluronsäure-Synthase

<b>HRT</b>	<i>Hormone replacement therapy / Hormonersatztherapie</i>
<b>HYAL</b>	Hyaluronidase
<b>IL(-<math>\beta</math>)</b>	Interleukin (Beta)
<b>KF</b>	Kollagenfragmente
<b>LUM</b>	Lumikan
<b>MAC-2</b>	<i>Macrophage antigen 2</i>
<b>MED</b>	Mittlere Erythemdosis
<b>MIP-2</b>	<i>Macrophage inflammatory protein 2</i>
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase
<b>mRNA</b>	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
<b>OVX</b>	Ovariectomie
<b>P</b>	Pellet
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
<b>PDGF</b>	<i>Platelet derived growth factor / Aus Plättchen stammender Wachstumsfaktor</i>
<b>PG</b>	Proteoglykan(e)
<b>ROS</b>	Reaktive O <sub>2</sub> -Spezies
<b>S</b>	Sham-Behandlung
<b>SLRP</b>	<i>Small leucin rich repeat proteoglycans</i>
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
<b>TEWL</b>	Transepidermaler Wasserverlust
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<b>TIMP</b>	<i>Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases</i>

<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor Alpha
<b>UV</b>	Ultra violett (Radiation)
<b>VER</b>	Versikan

### 3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Dermis	2
2	Strukturformel der Disaccharideinheit der Hyaluronsäure	3
3	Schematische Darstellung von Biglykan, Lumikan und Versikan	7
4	Überblick über die durch Östrogene vermittelten Effekte auf die Haut	9
5	Versuchsdurchführung	16
6	Verlaufsschema Tiere und Behandlung	20
7	Immunhistochemische Detektion der HA-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung	26
8	Immunhistochemische Detektion der BGN-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung	28
9	Immunhistochemische Detektion der LUM-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung	30
10	Immunhistochemische Detektion der VER-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung	32
11	Quantitative Detektion des Gesamtkollagens in der papillären Dermis mittels Picro-Siriusrot-Methode nach 20 -wöchiger Behandlung	34
12	Exemplarische Vergleichsaufnahmen der Siriusrot-Färbung der Gruppen S, P UVB und X, E <sub>2</sub> UVB	35
13	Immunhistochemische Detektion kollagener Neoepitope in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung	37
14	Immunhistochemische Detektion Ki67-positiver Zellen in der	39

papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung

<b>15</b>	Immunhistochemische Detektion MAC-2-positiver Zellen in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung	41
<b>16</b>	Statistische Auswertung des Feuchtigkeitsgehaltes der Haut nach 20 -wöchiger Behandlung	42
<b>17</b>	Statistische Auswertung des transepidermalen Wasserverlustes der Haut nach 20 -wöchiger Behandlung	43
<b>18</b>	Statistische Auswertung der Viskoelastizität der Haut nach 20 -wöchiger Behandlung	44
<b>19</b>	Statistische Auswertung der Dehnsteifigkeit der Haut nach 20 -wöchiger Behandlung	45

## 4 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Verwendete Puffer und Lösungen zur Gewebepräparation und Histologie	12
2	Verwendete Farbstoffe und Farbstofflösungen (Picro-Siriusrot)	13
3	Verwendete Substanzen und Pharmaka	13
4	Verwendete Primärantikörper in der Immunhistochemie	14
5	Verwendete Sekundärantikörper in der Immunhistochemie	14
6	Verwendete Geräte und Materialien	15
7	Studiendesign und Einteilung der Versuchstiere	17
8	Protokoll der immunhistochemischen Färbungen	21
9	Protokoll der Siriusrot-Färbung	22



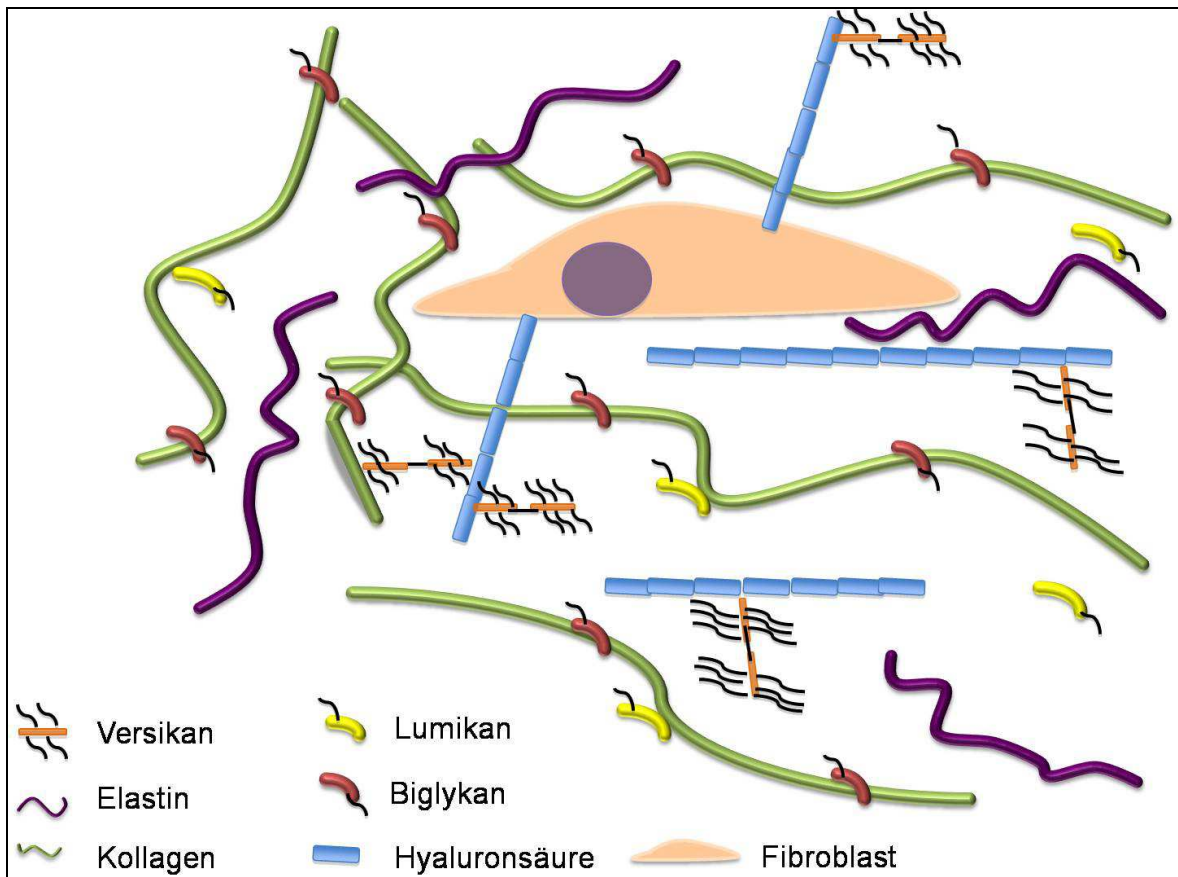
# 5 Einleitung

## 5.1 Die Extrazelluläre Matrix der Haut

Die Hautdecke besteht aus drei Schichten: Epidermis (verhorntes mehrschichtiges Plattenepithel), Dermis (bindegewebsreiche Lederhaut) und Subkutis (Unterhautfettgewebe). Die Epidermis, welche die äußere Abdeckung des Körpers darstellt, ist sehr zellreich und besteht aus Keratinozyten (Hornbildner), Melanozyten (Pigment-Bildner), Merkel-Zellen (Mechanozeptoren) und Langerhans-Zellen (spezialisierte Makrophagen). Sie erfüllt die Aufgabe einer mechanisch und chemisch widerstandsfähigen, fast wasserdichten Diffusionsbarriere gegenüber der Umwelt. Ermöglicht wird dies durch *tight-junctions*, welche als schmale Bänder aus Membranproteinen benachbarte Epithelzellen jeweils gürtelförmig aneinander heften und polaren Lipiden (Ceramide) in Form einer Doppellipidschicht, welche eine Versiegelung der Interzellularspalten bewirken. Die Epidermis besitzt dementsprechend fast keine Zellzwischenräume und zeigt damit einhergehend nur einen geringen Gehalt an extrazellulärer Matrix (EZM). Demgegenüber ist die darunter liegende Dermis sehr reich an EZM-Komponenten, jedoch relativ zellarm. Sie besitzt hauptsächlich Fibroblasten und unterschiedliche Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen und Granulozyten). Die Dermis besteht aus zwei Schichten: der papillären und der retikulären Dermis. Die retikuläre Dermis besteht aus straffem, geflechtartigem Bindegewebe (BGW), verleiht der Haut mechanische Widerstandsfähigkeit und ist reißfest, aber reversibel dehnbar. Die papilläre Dermis besteht aus lockerem BGW und führt zahlreiche Lymphgefäße und Kapillaren zur Ernährung der gefäßfreien Epidermis, sowie enthält freie Nervenendigungen und Sinnesrezeptoren (Meissner-Tastkörperchen, Ruffini-Körperchen). Die Subkutis besteht aus lockerem Bindegewebe und Fettgewebe, welches je nach Lokalisation als mechanisches Druckpolster, Energiespeicher oder Wärmeisolator fungiert.

Die EZM der Haut stellt das Grundgerüst für die in ihr befindlichen Zellen dar und beeinflusst ferner die Funktion und den Phänotyp dieser Zellen. Sie besteht im Wesentlichen aus Bindegewebsfasern (Kollagenfasern vom Typ I und Typ III, sowie elastischen Fasern), Glykosaminoglykanen (GAG), Proteoglykanen (PG) und Adhäsionsproteinen, welche zur Etablierung von Zell-Matrix-Verbindungen beitragen [1]. Molekulare Komponenten sind Hyaluronsäure, als Hauptvertreter der GAG und die PG Versikan, Biglykan, Dekorin und Lumikan, sowie verschiedene Glykoproteine (hauptsächlich Fibronektine und Laminine). GAGs bestehen aus linearen Polysaccharidketten, welche anhand der jeweiligen Disaccharideinheiten in Chondroitin- und Dermatansulfate, Heparansulfate und Heparin, sowie Keratansulfate unterteilt werden [2]. PG sind glykosilierte Proteine, die aus einem Kernprotein und sulfatierten, kovalent gebundenen

Glykosaminoglykanen (GAG) bestehen. Im Folgenden sollen funktionell wichtige EZM-Bestandteile der Haut detaillierter vorgestellt werden.



**Abbildung 1: Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der Dermis:** Schema der dermalen extrazellulären Matrix mit Darstellung der Morphologie und räumlichen Anordnung wichtiger Makromoleküle wie kollagener Fasern, Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen sowie dermalen Zellen.

### 5.1.1 Hyaluronsäure

Über 50% der gesamten HA im menschlichen Körper befinden sich innerhalb der Haut [3], wo HA typischerweise als hochmolekulares Polymer vorliegt. Während HA in der Epidermis nur im Stratum basale und im Stratum spinosum vorkommt [4], ist die Dermis - speziell die papilläre Dermis - sehr reich an HA, die dort mit Kollagenfibrillen und elastischen Fasern räumlich assoziiert ist [5]. HA kann sowohl frei im Extrazellulärraum, als auch an Proteine gebunden oder zellassoziiert vorliegen, wobei letzteres zur Ausbildung perizellulärer „HA-Coats“ führen kann [6]. Biochemisch betrachtet, handelt es sich bei HA um ein lineares GAG aus alternierenden  $[-\beta(1,4)\text{-Glukuronsäure-}\beta(1,3)\text{-N-Acetylglukosamin-}]_n$ -Einheiten (**Abb.2**). Ein Molekül HA besteht aus 2000 bis 25000 Disaccharideinheiten und weist ein Molekulargewicht von  $10^6$  -  $10^7$  Da bei einer Polymerlänge von 2 - 25  $\mu\text{m}$  auf [7]. Im Gegensatz zu anderen GAGs wie Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat und Heparansulfat liegt HA weder sulfatiert vor, noch erfolgt die

Biosynthese im Golgi-Apparat oder im endoplasmatischen Retikulum. Die Synthese von HA erfolgt in der Haut durch Fibroblasten bzw. Keratinozyten und erfordert zunächst eine Aktivierung mittels Uridintriphosphat (UTP), bevor die Hyaluronsäuresynthase-Isoenzyme UDP-Glukuronsäure und UDP-N-Acetylglukosamin im Rahmen einer Glykosyltransferasereaktion miteinander verknüpfen. Anschließend wird die wachsende Polypeptidkette durch die Plasmamembran in den extrazellulären Raum extrudiert. Hyaluronsäure wird durch die transmembranären Hyaluronsäuresynthasen 1, -2 und -3 (HAS1, -2, -3) synthetisiert. Die einzelnen HAS-Isoformen besitzen unterschiedliche Funktionen und Charakteristika, wie etwa die Synthese unterschiedlich langer HA-Polymere. Untersuchungen in Fibroblasten haben gezeigt, dass HAS1 HA mit einer durchschnittlichen Größe von  $2 \times 10^5$  bis  $\sim 2 \times 10^6$  Da, HAS2 HA-Polymere von  $> 2 \times 10^6$  Da und HAS3 HA mit einem Molekulargewicht von  $1 \times 10^5$  bis  $\sim 1 \times 10^6$  Da synthetisieren [8].

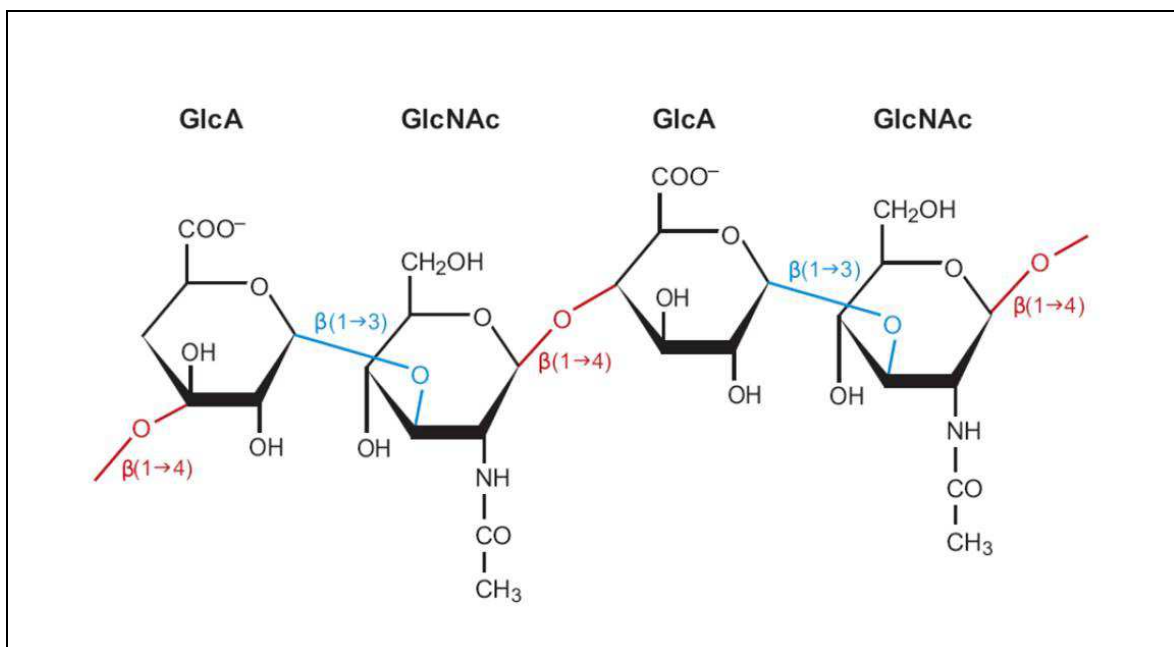


Abbildung 2: Strukturelle Darstellung der Dissaccharideinheit der Hyaluronsäure [9]

Zum einen trägt HA durch ihre chemische Struktur, insbesondere durch die negativ geladenen Carboxylgruppen, zur Etablierung einer spezifischen extrazellulären Mikroumgebung innerhalb der Haut bei, welche die mechanischen und physikochemischen Eigenschaften der Haut maßgeblich mitbestimmt. Beispielsweise führen die polyanionische Struktur und die hohe Polymer-Länge der HA zu einer großen H<sub>2</sub>O-Bindungskapazität. Dies wiederum bedingt ein erhöhtes Volumen und eine verbesserte Elastizität der Haut. Gleichzeitig wird die Diffusion von Nährstoffen und metabolischen Endprodukten erleichtert [10]. Zum anderen übt HA über CD44 und RHAMM einen direkten zellbiologischen Einfluss innerhalb von Epidermis und Dermis aus. Fibroblasten und Keratinozyten sind nicht nur HA-synthetisierende Zellen der Haut, sondern exprimieren darüber

hinaus die HA-Rezeptoren CD44 und RHAMM (Rezeptor für HA mediierte Mobilität) und sind daher direkte Effektoren von HA-vermittelten zellulären Effekten [11]. Bekannte, durch Rezeptoren vermittelte, zelluläre Effekte sind die Förderung von Proliferation und Migration von Fibroblasten [12], eine Hemmung von Apoptose und Adhäsion [13], sowie eine Induktion der Regeneration von Keratinozyten [4]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die HA-Synthese durch mitogene Faktoren gesteigert wird und HA selber ebenfalls mitogene Effekte haben kann [12].

Der Abbau der HA erfolgt über eine schrittweise enzymatische Degradation von hochmolekularer HA über niedermolekulare HA bis hin zu HA-Oligomeren. Diese katabolen Reaktionen werden hauptsächlich von zwei Enzymen, der Hyaluronidase 1 (HYAL-1) und der Hyaluronidase 2 (HYAL-2), vermittelt [14]. Die entstandenen HA-Fragmente sind in der Lage *Toll-Like-Rezeptoren* (TLR-2, TLR-4) zu aktivieren, was zur Modulation entzündlicher Prozesse führen kann [15].

### 5.1.2 Kollagene

Kollagene sind die mengenmäßig wichtigsten Strukturproteine der EZM. Anhand ihrer Aminosäuren (v. A. Glycin, Prolin und Hydroxyprolin) und der Länge ihrer Polypeptidketten werden sie in über 28 verschiedene Subtypen eingeteilt. Allen Kollagentypen ist dabei gemein, dass sie aus drei Polypeptidketten aufgebaut sind, die man als Kollagen-Helices bezeichnet und die in Form einer rechtsgängigen Tripelhelix umeinander gewunden sind. Die zwei wichtigsten Kollagene der Haut sind Kollagen Typ I und Kollagen Typ III, wobei adulte Haut 6 -fach mehr Kollagen Typ I als Kollagen Typ III aufweist [16]. Typ I Kollagen macht darüber hinaus alleine bereits über 80% Prozent des Trockengewichts der gesamten Dermis aus [17]. Typ I Kollagenfasern bestehen aus zwei identischen  $\alpha_1$ -Peptidketten und einer  $\alpha_2$ -Peptidkette, während Typ III Kollagenfasern aus drei  $\alpha_1$ -Ketten bestehen. Typ I Kollagenfasern repräsentieren den Hauptteil der retikulären Dermis und verleihen mechanische Stabilität, die durch eine eingeschränkte, reversible Dehnbarkeit und hohe Zugfestigkeit charakterisiert ist. Demgegenüber werden Typ III Kollagenfasern wegen ihrer Abundanz in prä- und neonatalen Geweben auch als fetale Kollagene bezeichnet [18]. Beim Erwachsenen bilden Typ III Kollagenfasern netzartige Geflechte in der papillären Dermis und zeigen über Interaktionen mit anderen EZM-Komponenten (1.1.3) und Zellen der Dermis eine initiale Beteiligung an Reparaturprozessen der dermalen EZM [1]. Darüber hinaus befindet sich innerhalb der Basallamina (BL) der Haut Typ IV Kollagen, ein nicht fibrilläres Kollagen mit triplehelikalen und globulären Domänen, welches ein komplexes 2D-Netzwerk aufbaut.

### 5.1.3 Proteoglykane

#### 5.1.3.1 Biglykan

Das PG Biglykan (BGN) gehört zur Gruppe der „*Small Leucin-Rich-PG*“ (SLRP) und wird auch als Chondroitinsulfat/Dermatansulfat-PG bezeichnet. Sein Proteinanteil besteht, bei einem Molekulargewicht von 38 kDa, zu 70% aus sich wiederholenden, leucinreichen Regionen [19]. Am N-terminalen Ende besitzt BGN vier und in der C-terminalen Region zwei Cysteinreste, die an diesen Stellen Disulfidbrücken ausbilden können. BGN besitzt zwei GAG-Seitenketten, welche über Serinreste mit dem N-terminalen Ende des Kernproteins verknüpft sind. Sowohl über die GAG-Ketten, als auch über sein Kernprotein kann BGN mit diversen anderen Komponenten der EZM interagieren [20]. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die spezifische Bindungsstelle des Kernproteins für die quantitativ wichtigsten dermalen Kollagene Typ I und III. Von BGN und auch anderen SLRPs ist bekannt, dass sie die Fibrillogenese und die räumliche Anordnung der Kollagenfibrillen beeinflussen können [21].

BGN wird hauptsächlich im Knochen exprimiert. In der Haut ist es basal nur in sehr geringer Menge nachweisbar und hauptsächlich innerhalb der Epidermis mit differenzierenden Keratinozyten assoziiert. Innerhalb der Dermis konnten nur deutlich geringere Mengen BGN in einer schmalen Zone unmittelbar subepithelial nachgewiesen werden [22, 23]. Neben der vorstehend beschriebenen Interaktion mit Kollagenen und pro-proliferativen Effekten im Zuge posttraumatischer Regenerationsprozesse [24], ist über die physiologische Funktion von BGN in der Haut nur sehr wenig bekannt. Das BGN eine essentielle Bedeutung für die dermale EZM hat, ist allerdings aus Knockout-Modellen bekannt, in denen BGN-defiziente Mäuse eine massive Ausdünnung der Dermis zeigten, die phänotypisch dem Ehlers-Danlos Syndrom beim Menschen ähnelt [25].

#### 5.1.3.2 Lumikan

Lumikan (LUM) ist ein Keratansulfat-PG und ein weiteres Mitglied der Familie der SLRP, welches ursprünglich wegen seiner Bedeutung für die Entwicklung und Transparenz der Kornea bekannt geworden ist. LUM besteht aus einem 38 kDa schweren Kernprotein mit vier N-terminalen und zwei C-terminalen Cysteinresten, sowie einer zentralen Domäne mit 11 -12 leucinreichen Motiven [26]. Die Synthese von LUM erfolgt hauptsächlich durch Fibroblasten, wobei die höchste LUM-Expression in Cornea und Herz detektiert werden konnte. LUM ist hierbei zwingend erforderlich um die Integrität und Funktion des Bindegewebes zu erhalten [27]. LUM beeinflusst - neben seiner direkten Interaktion mit Kollagen Typ I - die Kollagenfibrillogenese und limitiert so die Größe der Kollagenfasern, sowie reglementiert interfibrilläre Spalträume [28]. Darüber hinaus scheint LUM eine unmittelbare Beteiligung an regulatorischen Zellfunktionen wie der Migration, der

Proliferation und der Apoptose zu haben, weshalb es oftmals auch als „*Matrikin*“ bezeichnet wird [29]. Interessanterweise wird das strukturverwandte Fibromodulin in der Haut nicht exprimiert, was eine spezifische Bedeutung des LUM für die Haut nahelegt. LUM ist vor allem in der papillären Dermis lokalisiert und liegt in direkter Assoziation mit dermalen Kapillaren vor. Die spezifische Bedeutung von LUM für die Haut ist bislang weitgehend unbekannt. In mehreren Tierexperimenten wurde jedoch beobachtet, dass bei einem homozygoten LUM-Knockout im Mausmodell durch Effekte auf Haut und Cornea ein spezifischer Phänotyp entsteht. Unter anderem lies sich eine abnorme Kollagenfibrillogenese mit unregelmässiger Verteilung und irregulärem Fibrillendurchmesser nachweisen, welche in der Haut zu erhöhter Fragilität und Brüchigkeit und in der Cornea zu verminderter Transparenz und Trübung führte [28].

### 5.1.3.3 Versikan

Versikan (VER) ist eines der größten PG der EZM und gehört zur Familie der HA-bindenden PG (Hyaladhärine). Wie alle Vertreter dieser Gruppe besteht VER aus drei Molekül-Domänen mit sehr unterschiedlichen zellbiologischen Funktionen, was auch in der Namensgebung dieses Makromoleküls berücksichtigt wurde (*VERsatile*) [30]. Die G1-Domäne ist N-terminal lokalisiert und besteht aus einem Immunglobulin-ähnlichen Motiv, gefolgt von zwei PG-Tandem-Repeats, welche für die Bindung von HA verantwortlich sind [31]. Am C-terminalen Ende befindet sich die G3-Domäne des Moleküls, die sich aus zwei *Epidermal-Growth-Factor-Like-Repeats*, einem an Komplementkomponenten-bindenden Motiv und einem selektinähnlichen Motiv zusammensetzt [32] (**Abb. 3**). Neben der Bindung von HA werden Interaktionen mit anderen EZM-Komponenten, wie Fibulin-1 und -2 oder Fibrillin-1 ermöglicht [33, 34]. Zwischen den beiden Molekülpolen befindet sich die G2-Domäne, die die Bindung von Chondroitinsulfat-Ketten vermittelt. Durch alternatives Spleißen der *mRNA*, welche Regionen codiert, an die GAGs binden können entstehen vier voneinander verschiedene Isoformen (V0, V1, V2, V3), die ein Molekulargewicht von 74 bis 370 kDa aufweisen und jeweils eine unterschiedliche Anzahl an CS-Ketten binden können [35]. VER kommt in einer Vielzahl von Weichteilgeweben vor. Besonders große Mengen konnten hierbei altersunabhängig in der Haut detektiert werden, wo VER zum einen in der Proliferationszone der Epidermis (Stratum basale) und zum Anderen in der papillären und retikulären Dermis nachgewiesen wurde [36]. Die wesentliche Bedeutung von VER, - speziell innerhalb der Dermis - liegt hierbei vermutlich im Aufbau hochmolekularer Netzwerke mit diversen EZM-Komponenten, welche die Zellen unmittelbar umgeben.

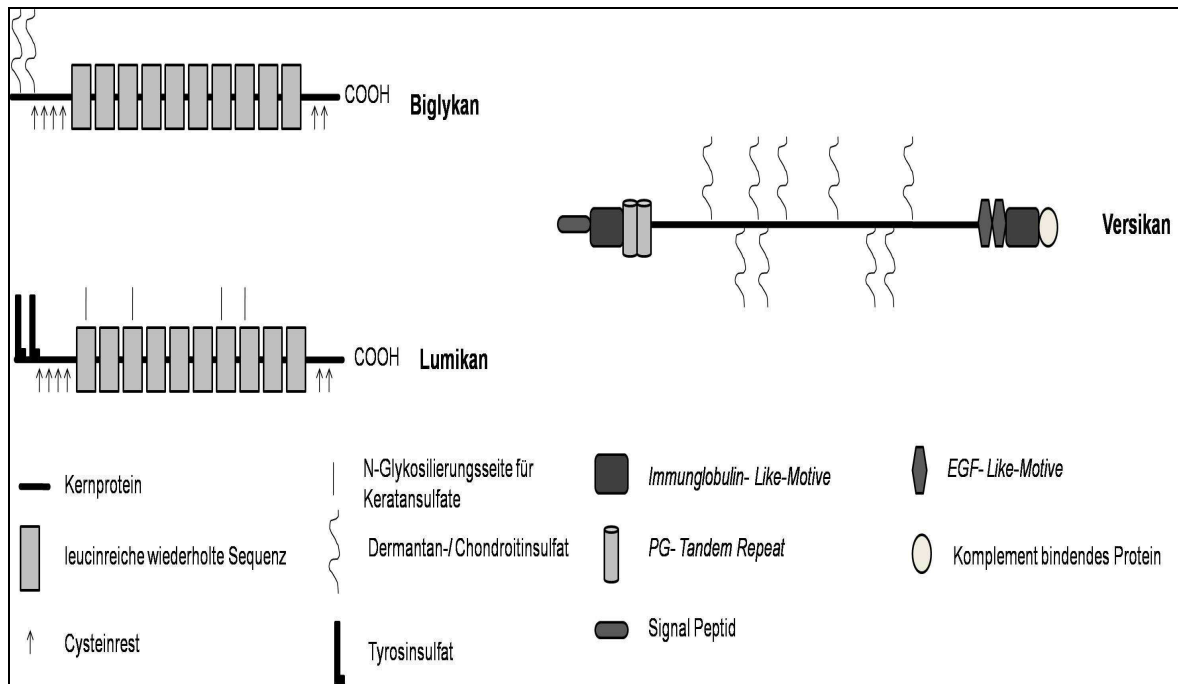


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Biglykan (BGN), Lumikan (LUM) und Versikan (VER)

## 5.2 Die Extrazelluläre Matrix während der Hautalterung

### 5.2.1 Intrinsische Hautalterung

Unter dem Begriff der intrinsischen Hautalterung versteht man einen von äußeren Einflüssen unabhängigen, multifaktoriellen Prozess aus degenerativen und teilweise reversiblen Gewebeveränderungen, sowie einer genetisch determinierten verminderten Reagibilität auf zellulärer Ebene (zelluläre Seneszenz). Strukturelle und funktionelle Charakteristika sämtlicher Hautschichten gehen hierbei langsam verloren: die Haut erscheint dünn und trocken, ist charakterisiert durch eine erhöhte Empfindlichkeit für Verletzungen, jedoch funktionell intakt [37]. Ursächlich spielen vor allem der Verlust proliferativer Aktivität von Fibroblasten und Keratinozyten, das beeinträchtigte Überleben dieser Zellen durch Telomer-Verkürzung und mitochondriale Defekte, spontane Mutationen einer Vielzahl unterschiedlicher Gene und die progrediente Abnahme der Synthese von Geschlechtshormonen eine Rolle [38]. Aus diesen multiplen endogenen Veränderungen, resultiert eine Akkumulation von Zellschäden, die zu einer Inhibition zellulärer Prozesse, wie der Synthese von EZM Komponenten führen kann. Im Verlauf der intrinsischen Hautalterung kommt es durch progredienten Zellverlust zu einer Ausdünnung der Epidermis um 10-30% [39]. Die Dermis ist ebenfalls durch eine mit fortschreitendem Alter auftretende graduelle Abnahme ihrer Dicke charakterisiert. Bedingt durch eine reduzierte Anzahl aktiver Fibroblasten, kommt es zu einem Verlust von dermalen EZM-Bestandteilen (Atrophie).

Beschrieben wurde in diesem Zusammenhang bisher vor Allem ein reduzierter Gehalt von Kollagen Typ I und III sowie elastischen Fasern [40]. Es besteht hierbei eine Korrelation zwischen der Abnahme des Gesamtkollagengehaltes, dem Verhältnis von Typ I zu Typ III Kollagen und dem Alter. Pro Jahr gehen ca. 1% aller Hautkollagene verloren [41].

### 5.2.2 Extrinsische Hautalterung

Als extrinsische Hautalterung bezeichnet man sämtliche ultrastrukturellen, mikroskopischen sowie makroskopischen Gewebealterationen und zellulären Dysfunktionen innerhalb der Haut, die durch exogene Stressoren bzw. Umwelteinflüsse verursacht werden. Unter einer Vielzahl von Faktoren, wie biomechanischem Stress, Luftverschmutzung durch Gase und Nanopartikel, Rauchen, Bakterien und Viren oder Xenobiotika (körperfremde Stoffe) ist die UV-Strahlung der potenteste exogene Stimulus einer beschleunigten bzw. vorzeitigen Hautalterung. Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass extrinsische und intrinsische Alterungsprozesse zumindest in Teilen überlappende biologische (Patho-) Mechanismen aufweisen [42]. Im Gegensatz zur chronologisch gealterten Haut, führen aktinische Schäden jedoch zu einer lederartigen Erscheinung, unregelmäßiger Pigmentierung, erhöhter Brüchigkeit und tiefen Falten [43]. In der Folge entsteht ein pathologischer Phänotyp mit schweren funktionellen Defekten. Auf mechanistischer Ebene werden durch UVB-Strahlung DNA-Schäden induziert ((6-4)-Photoprodukte und Cyclobutandimere). Zusätzlich entstehen in den Mitochondrien reaktive O<sub>2</sub>-Spezies (ROS), welche die DNA indirekt schädigen und darüber hinaus EZM-Komponenten unmittelbar verändern können [44]. Zudem induzieren ROS die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP) 1, 3, 9 und 13 und inaktivieren Inhibitoren der MMP (TIMP) [45, 46].

Obwohl man davon ausgeht, dass nur ca. 5% der UVB-Strahlung die papilläre Dermis erreichen, kommt es dort im zeitlichen Verlauf kumulativ zu einer irreversiblen Schädigung der EZM [47]. Die gesteigerte Proteolyse der Kollagene führt zu einer ausgedehnten Atrophie der Dermis bei absolutem Mangel an Typ I und Typ III Kollagen [48], sowie ebenfalls reduzierter Anzahl stabilisierender *kollagen-cross-links*, was die regelrechte Formation eines dermalen Kollagennetzwerkes stört und die mechanische Verbindung von Dermis und Epidermis auflockert [49]. Darüber hinaus können hochmolekulare Kollagenspaltprodukte - sog. Kollagenfragmente (KF) bzw. kollagene Neoepitope - entstehen, welche über direkten Kontakt mit Fibroblasten interagieren, die Neusynthese der Kollagenfibrillen inhibieren und somit erforderliche Reparaturprozesse behindern [50, 51]. Parallel zum Kollagenkatabolismus kommt es zur Akkumulation von dystrophem und fehlerhaft organisiertem Material in der Dermis [52]. Die ursprüngliche dermale Matrix wird hierbei durch Elastin und Fibrillin ersetzt (solare Dermatitis oder Elastosis), welche im konkreten Gegensatz zur generellen EZM-Atrophie im intrinsischen Verlauf steht. Die durch UV-Licht induzierte Hautalterung (*Photoaging*) ist somit ein komplexer,



biologischer Prozess, der alle Schichten der Haut betrifft, aber seinen schädigenden Einfluss hauptsächlich innerhalb des dermalen Bindegewebes entfaltet [43].

### 5.3 Die Rolle von Östrogenen im Prozess der Hautalterung

Die Haut stellt ein wichtiges Zielorgan der vielfältigen Östrogenwirkungen dar, die hauptsächlich über den in dermalen Fibroblasten, aber auch in epidermalen Keratinozyten exprimierten Rezeptor ER- $\alpha$  vermittelt werden [53]. Diverse Studien konnten demonstrieren, dass Östrogene ( $E_2$ ) die Qualität sowohl intrinsisch als auch extrinsisch gealterter Haut auf vielfältige Weise verbessern (**Abb. 4**). Protektive  $E_2$ -Effekte sind: Verbesserung des Hydratisierungsgrades der Haut bei erhöhter Elastizität und Hautdicke, gesteigerte Produktion von Oberflächen-Sphingolipiden mit Barrierefunktion, Reduktion von Falten -Bildung und -Tiefe, Regulation der Hautpigmentierung und Modifikation des Haarwachstums [54]. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch vielfältige Beobachtungen aus klinischen Studien und tierexperimentellen Untersuchungen, welche sowohl humane postmenopausale Probanden, als auch eine bei Mäusen bzw. Ratten durchgeführte Ovariectomie (X) als Grundlage haben. Das Absinken der  $E_2$ -Plasmaspiegel scheint mit einer beschleunigten intrinsischen und extrinsischen Hautalterung zu korrelieren [38]. Ebenso führt eine X zu einer beschleunigten Hautalterung im Tiermodell, wie auch zu einer Beschleunigung der durch UV-Licht induzierten Hautalterung, was sich unter anderem in einem Verlust von Elastizität und Widerstandskraft bemerkbar macht [55].

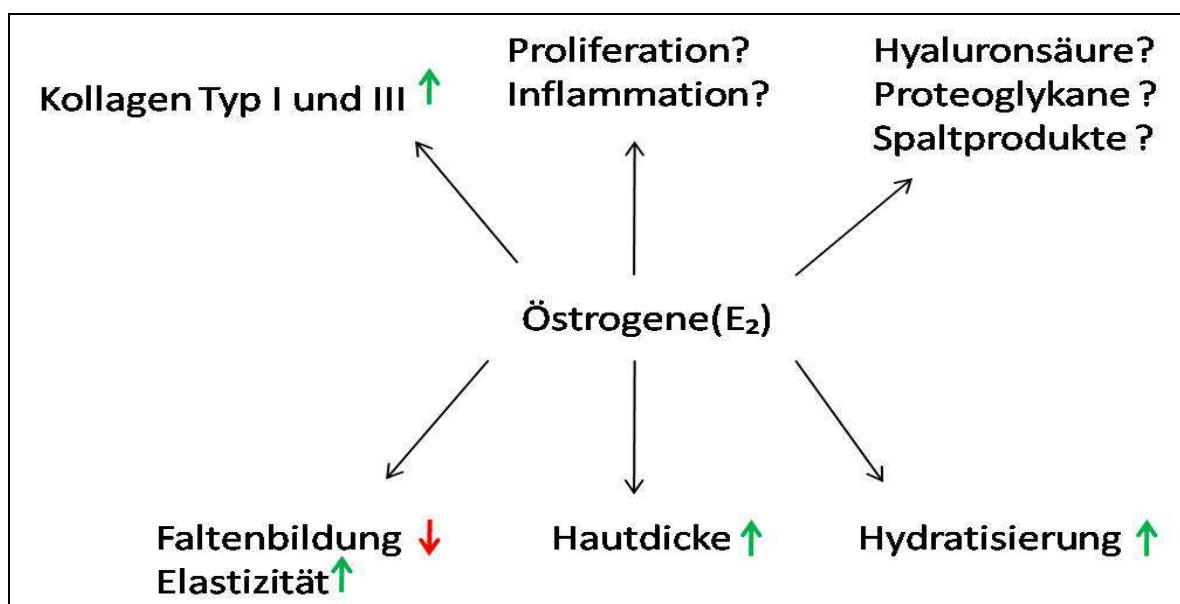


Abbildung 4: Überblick über die durch Östrogene vermittelten Effekte auf die Haut

In der Vergangenheit wurde vor allem die komplexe Modifikation der dermalen kollagenen EZM als zentraler E<sub>2</sub>-vermittelter Effekt auf das Hautgewebe angesehen. So konnte gezeigt werden, dass E<sub>2</sub> die Synthese von dermalem Kollagen Typ I und Typ III induziert und postmenopausal bzw. nach Ovariectomie physiologische Mengen an Kollagen wiederherstellt [56, 57]. Es besteht hierbei eine enge Verbindung zwischen dem Kollagengehalt der Dermis, der Hautdicke als einem Indikator der Hautalterung und dem Zeitraum eines E<sub>2</sub>-Mangels bzw. einer exogenen E<sub>2</sub>-Substitution [58, 59]. Weiterhin ist bekannt, dass E<sub>2</sub> auch den dermalen HA-Gehalt erhöhen kann [41, 60], wodurch eine verbesserte Kapazität zur H<sub>2</sub>O-Bindung resultieren kann [61]. Die Wirkungen von E<sub>2</sub> auf andere Bestandteile der dermalen EZM, wie SLRP und andere PG sind bisher weitaus weniger erforscht und ebenso wie Veränderungen der dermalen HA-Akkumulation Teil dieser Arbeit.

#### 5.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Bereits seit geraumer Zeit ist bekannt, dass die Haut eines der ersten Organe ist, in dem sich altersassoziierte Veränderungen manifestieren [62]. Prinzipiell wird hierbei zwischen Prozessen der intrinsischen, d.h. einer unter anderem durch abnehmenden E<sub>2</sub>-Gehalt und der extrinsischen, d.h. einer durch äußere Faktoren - vor allem UV-Exposition - beeinflussten Hautalterung unterschieden.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Modifikationen der dermalen EZM integraler Bestandteil beider Formen der Hautalterung sind. Der Fokus intensiver Forschungen lag hierbei jedoch hauptsächlich auf Veränderungen der Kollagenstruktur [63] (1.2), obwohl im Verlauf der chronischen Hautalterung ebenfalls Alterationen anderer EZM-Komponenten - unter anderem von HA - beschrieben werden konnten [10]. Über altersassoziierte Alterationen dermalen Proteoglykane wie VER und SLRP, wie LUM und BGN ist weitaus weniger bekannt. Diverse Untersuchungen und Studien legen nahe, dass E<sub>2</sub> eine entscheidende Rolle in der Regulation der EZM während der Hautalterung spielt und in diesem Zusammenhang auch funktionell einen ausgeprägt positiven Effekt auf die Haut hat [64, 65] (1.3).

Insgesamt fehlen bislang jedoch systematische Untersuchungen hinsichtlich altersbedingter Veränderungen der Zusammensetzung der EZM der Haut unter einer Behandlung mit E<sub>2</sub> und möglicherweise assoziierten funktionellen Alterationen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit eine grundlegende morphologische und funktionelle Charakterisierung der murinen Dermis im Rahmen der durch intrinsische (E<sub>2</sub>) und extrinsische (UVB) Faktoren hervorgerufenen Hautalterung.

Dabei wurden folgende thematische Schwerpunkte gesetzt:

- 1.** Quantitative Zusammensetzung der dermalen extrazellulären Matrix im Hinblick auf Proteoglykane (Versikan, Biglykan, Lumikan), Hyaluronsäure und Kollagen innerhalb chronischer intrinsischer und extrinsischer Hautalterung.
- 2.** Histologische Charakterisierung von durch die EZM regulierten Prozessen wie Inflammation und Proliferation, sowie dem Auftreten von Kollagenfragmenten innerhalb chronischer intrinsischer und extrinsischer Hautalterung.
- 3.** Einfluss von Östrogen auf die Komposition der extrazellulären Matrix und auf hautalterungsassoziierte Prozesse wie Proliferation, Inflammation sowie dem Auftreten kollagener Fragmente innerhalb chronischer intrinsischer und extrinsischer Hautalterung.
- 4.** *In-vivo-Analyse* der Veränderung hautphysiologischer Parameter: *Feuchtigkeitsgehalt, transepidermaler Wasserverlust, Viskoelastizität* und *Dehnsteifigkeit* während der chronischen intrinsischen und extrinsischen Hautalterung, sowie im Zusammenhang mit Östrogen.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Puffer, Lösungen und Substanzen

Alle nicht gesondert aufgeführten Substanzen und Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München) und Merck (Darmstadt) bezogen.

**Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen zur Gewebepräparation und Histologie**

<b>Puffer bzw. Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,4
10x TBS	100 mM Tris-HCl 1,5 mM NaCl pH 7,6
ABC-Puffer (Chondroitinase-Verdau)	109 mM Tris-HCl 15 % BSA 18 mM Na-Acetat pH 8,0
Blockierlösung	10 % 10x TBS 10 % FCS 1 % BSA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Block	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in 1x PBS
Ethanol	100 % Ethanol
Formalin	10 % Formalin ad Aqua dest.
BSA	1 % BSA ad 1x PBS
1% HCl	1 % HCl ad Aqua dest.
Hämalaun nach Mayer	gebrauchsfertig von Merck
10x TB (Tris HCl)	0,5 M Trispuffer pH 7,6 121,14 g/mol Tris ad Aqua dest.

Isopentan	100 % Isopentan
-----------	-----------------

Tabelle 2: Verwendete Farbstoffe und Farbstofflösungen (Picro-Siriusrot)

Farbstoff	Farblösung
Picro-Siriusrot	0,1 % (w/v) Picro-Siriusrot gesättigte Pikrinsäurelösung
Cölestinblau	4,4 % (w/v) $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 0,4 % (w/v) Cölestinblau 12,3 % (v/v) Glycerin

Tabelle 3: Verwendete Substanzen und Pharmaka

Substanzen	Hersteller
Aquatex <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
Entellan <sup>®</sup> (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt
Diaminobenzidin (DAB)	Zytomed Systems, Berlin
Hoechst 33324	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TissueTek <sup>®</sup> -Einbettmedium	Leica Microsystems, Wetzlar
Vectashield <sup>®</sup> Mounting -Medium	Vector Laboratories, CA, USA
Estrogen Pellets (90d Release, 0,04 mg/kg/d)	Innovative Research of America, Sarasota, USA
Esketaminhydrochlorid (25 mg/ml Ketamin)	Pfizer, PARKE-Davis GmbH, Karlsruhe
Xylazin (Rompun) (5mg/kg)	Bayer HealthCare, Leverkusen
Betaisadona Lösung	Mundipharma GmbH, Limburg
Rimadyl (Carprofen) (5mg/kg)	Pfizer, PARKE-Davis GmbH, Karlsruhe

## 6.2 Antikörper

**Tabelle 4: Verwendete Primärantikörper in der Immunhistochemie**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Biglycan LF 159, polyklonal	von Larry Fischer (NIH,USA) zur Verfügung gestellt	1: 1000
Kollagenneoepitope COL 2 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> short, polyklonal	IBEX Technologies, Montreal, Quebec	1:100
Versican LF 99, polyklonal	von Larry Fischer (NIH,USA) zur Verfügung gestellt	1:500
Hyaluronsäure-Bindeprotein (HABP), biotinyliert	Seikagaku, Tokyo, Japan	1:250
Lumican, monoklonal	R&D Systems, Minneapolis, USA	1:200
Mac 2, polyklonal	CEDARLANE Laboratories, Burlington, Ontario, Canada	1:400
Ki-67 Antibody, polyklonal	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1:50

**Tabelle 5: Verwendete Sekundärantikörper in der Immunhistochemie**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
goat anti-rabbit IgG, HRP-konjugiert, (sc-2004)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:200 (Ki-67) 1:400 (Ver, Bgn) 1:600 (Col 2 <sup>3</sup> / <sub>4</sub> )
donkey anti-goat IgG, HRP-konjugiert, (sc-2020)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:500
goat polyklonal anti-Rat IgG2a, HRP-konjugiert	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1:400

Streptavidin Typ IV, HRP-konjugiert, (S-5512)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	1:500
---	----------------------------	-------

### 6.3 Geräte und Materialien

Tabelle 6: Verwendete Geräte und Materialien

Verwendung	Produktname	Hersteller
Kryostat	CM 1850	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop	CX 41	Olympus, Hamburg
Temperiergerät	E100/E26	Lauda, Königshofen
Inkubationskammer	Thermo Electron	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Zentrifuge	Mini Spin +	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	R160 P	Sartorius, Göttingen
Mikroskop	DM 2000	Leica Microsystems, Wetzlar
Kamera + Software	DFC 420C + Leica Application Suite (LAS) Ver. 3.3.1	Leica Microsystems, Wetzlar
Operationsbesteck	Aesculap	Aesculap AG, Tuttlingen
Brutschrank	BB 16	Hereaus, Hanau
UVB-Röhren	20W/12 (280 – 320 nm)	Philips, Eindhoven, Niederlande
Hautanalysesystem	DermaLab USB <sup>®</sup> skin testing system und modules	Cortex Technology, Hadsund, Dänemark
Nahtmaterialien	Vicryl rapid 4.0 Vicryl rapid 5.0	Ethicon (Johnson & Johnson Medical GmbH), Norderstedt

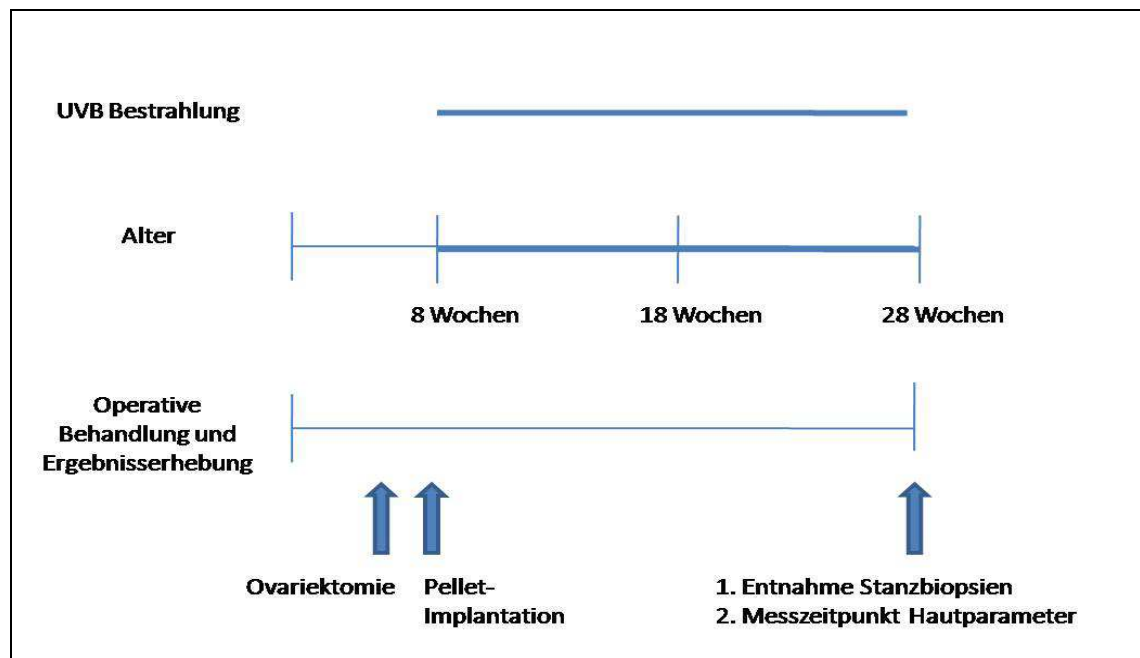
## 6.4 Studiendesign und Versuchsplanung

### 6.4.1 Zeitplan der Behandlung

Die Untersuchungen an *hairless shk-1-Mäusen* wurden im Lebensalter von 8 Wochen begonnen und bis zum Lebensalter von 28 Wochen durchgeführt. Vor Beginn der Bestrahlung ab der 8. Lebenswoche wurden bei einem Teil der Tiere die Ovarien entfernt, um Östrogenpellets oder Placebopellets zu implantieren. Nach 20-wöchiger Behandlung der Tiere (Lebensalter 28 Wochen) wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Entnahme der Stanzbiopsien zur histologischen Aufarbeitung
2. Messung der physiologischen Hautparameter

Die hier und im folgenden (6.5.1-6.5.3) aufgeführten Behandlungen wurden von Frau Dr. Katharina Röck (Institut für Pharmakologie und klinischen Pharmakologie, UKD), Frau Petra Zipper und Frau PD Dr. Julia Reifenberger (beide Hautklinik, UKD) im zentralen Tierversuchslabor der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Die Entnahme der Biopsie mit Frau Dr. Röck (6.5.4) und alle folgenden histologischen Arbeiten, sowie die Bestimmung der Hautparameter erfolgten in Eigenleistung unter Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Fischer und Frau Dr. Röck im Rahmen der vorliegenden Dissertation.



**Abbildung 5: Versuchsdurchführung:** Zeitliche Darstellung von Ovariectomie und Pellet-Implantation nach 8 Wochen, UVB-Bestrahlung über 10 Wochen, sowie Biopsie und Messung der Hautparameter nach 20-wöchiger Behandlung.



### 6.4.2 Studiendesign und Gruppeneinteilung

Um den Einfluss von  $E_2$  auf die Hautalterung zu evaluieren, wurden weibliche *skh-1-Mäuse* im Lebensalter von 8 Wochen ovariectomiert (OVX) und somit die intrinsische  $E_2$ -Synthese depletiert. Sham-operierte (S) Tiere dienten als Kontrolle. Im Anschluss erfolgte die Implantation von Placebo-Pellets (P) und  $E_2$ -Pellets ( $E_2$ ), die eine definierte Menge von  $E_2$  über einen Zeitraum von 90 Tagen freisetzen. Es ergaben sich somit drei unterschiedliche Versuchsgruppen: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S, P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X, P) und Ovariectomierte Tiere mit  $E_2$ -Pellet (X,  $E_2$ ). Die drei Gruppen wurden im Folgenden aufgeteilt, wobei eine Hälfte UVB-bestrahlt wurde, während die andere Hälfte unbestrahlt blieb (**Tab. 7**).

**Tabelle 7: Studiendesign und Einteilung der Versuchstiere:** Entsprechend der jeweils durchgeführten Behandlung: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S, P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X, P), Ovariectomierte Tiere mit  $E_2$ -Pellet (X,  $E_2$ ); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S, P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X, P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit  $E_2$ -Pellet und UVB-Exposition (X,  $E_2$  UVB).

Gruppenname	OVX	Placebo pellet	Östrogen pellet	UVB
S,P	-	+	-	-
X,P	+	+	-	-
X, $E_2$	+	-	+	-
S,P UVB	-	+	-	+
X,P UVB	+	+	-	+
X, $E_2$ UVB	+	-	+	+

## 6.5 Tiere und Behandlung

Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurden 5 Wochen alte, weibliche *hairless skh-1-Mäuse* von der Firma Charles River Laboratories (Wilmington, USA) bezogen, welche ein etabliertes Modell dermatologischer Forschung auf dem Gebiet der durch UV induzierten Schäden darstellen [66]. Die Mäuse wurden in der Tierversuchsanstalt der Universitätsklinik Düsseldorf gehalten, wo sie jeweils zu siebt in einen Käfig verbracht, ad libitum gefüttert und mit Wasser versorgt wurden. Sämtliche Genehmigungen für die Haltung und Behandlung der Tiere lagen vor (Aktenzeichen AZ 8.87-50.10.34.08.022.).

### 6.5.1 Operative Entfernung der Eierstöcke (Ovariectomie)

Im Alter von sieben Wochen erfolgte die operative Entfernung der Eierstöcke (OVX) um den Einfluss endogener ovarieller Steroidhormone zu depletieren. Vor Beginn des chirurgischen Eingriffs wurden die Mäuse zunächst mit einer Kombination aus 100 mg/kg Esketaminhydrochlorid und 5 mg/kg Xylazin anästhesiert und relaxiert. Nach intraperitonealer Injektion erfolgte die Überprüfung ausreichender Narkosetiefe anhand ausbleibender Lid- und Zwischenzehenreflexe. Im Folgenden wurden die Mäuse auf einem Operationstisch fixiert und es wurde eine Hautinzision von ca. 1,5cm Länge lateral der Medianlinie in der Leistenregion vorgenommen. Unter Schonung von Dermis und Subkutis wurde in die Tiefe präpariert und das Peritoneum jeweils links und rechts auf Länge von 0,5cm eröffnet. Die Ovarien wurden vorgelagert und beidseits jeweils am Übergang zum Uterushorn abgetrennt. Die Uterushörner wurden wieder in die Bauchhöhle reponiert und die beiden Peritonealschnitte mit einem resorbierbaren Faden (Stärke 5.0) verschlossen. Anschließend wurde auch der Hautschnitt mit einem resorbierbaren Faden (Stärke 4.0) genäht und mit Betaisadona-Lösung desinfiziert. Im weiteren Verlauf wurden 5 mg/kg Carprofen s.c. appliziert um eine ausreichende postoperative Analgesie sicherzustellen.

### 6.5.2 Implantation Östrogen-substituierender Pellets

Drei Tage nach Entfernung der Eierstöcke wurden „Östrogen-Pellets“ der Firma *Innovative Research of America* implantiert. Die Pellets haben einen Durchmesser von ca. 2 mm, eine Dicke von ca. 1 mm und setzen über einen Zeitraum von 90 Tagen kontinuierlich und gleichmäßig 1,1µg 17β-Estradiol pro Maus und Tag frei. Die Pellets wurden in Narkose mit 100 mg/kg Ketamin und 5 mg/kg Xylazin subkutan deponiert. Hierzu wurde im Bereich der Schulter eine Inzision von 0,5 cm Länge gemacht und subkutan eine kleine Tasche geformt, in die das Pellet gelegt wurde. Abschließend wurde die Haut mit resorbierbaren Fäden (Stärke 4.0) durch eine Einzelknopfnäht verschlossen. Um östrogenunabhängige Effekte durch die Narkose oder

den mikrochirurgischen Eingriff der Pelltimplantation auszuschließen wurden den Kontrolltieren Placebo-Pellets implantiert.

### 6.5.3 Bestrahlungsprotokoll

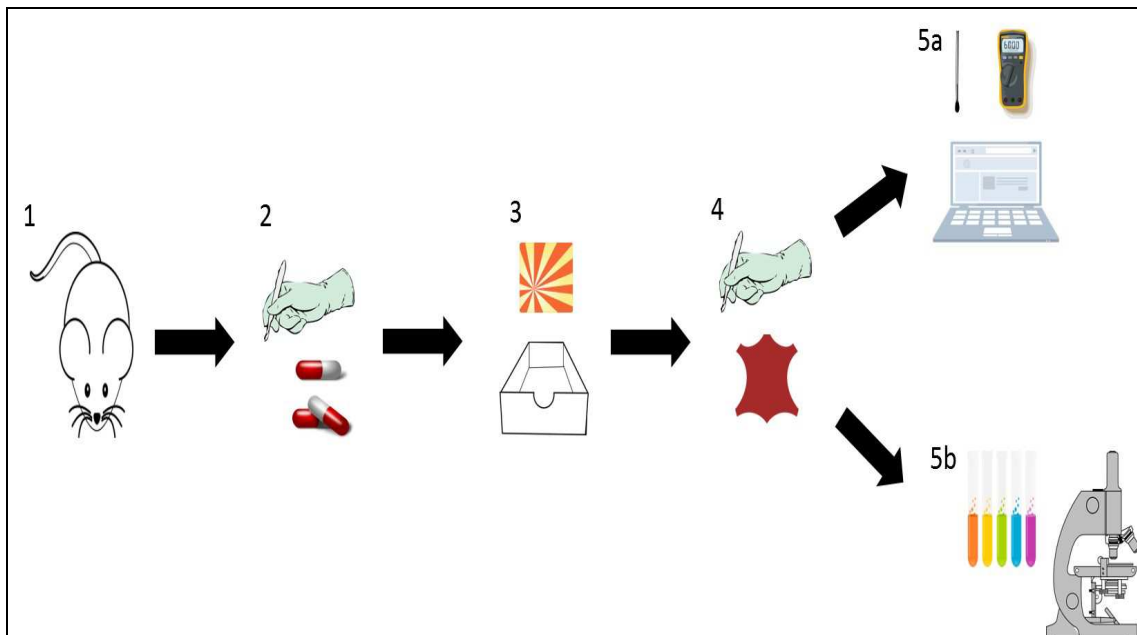
Ab einem Alter von acht Wochen wurden die Mäuse drei Mal pro Woche mit 80 mJ/cm<sup>2</sup> UV-Licht der Wellenlänge 280 - 320 nm (UVB), entsprechend einer minimalen Erythemdosis von 1,5 bestrahlt. Die UVB-Exposition erfolgte über einen Gesamtzeitraum von 20 Wochen. Die Applikation der oben genannten Strahlendosis erfolgte mit speziellen UV- Röhren der Firma Philips (280 - 320nm, peak 313 nm). Die Mäuse wurden dazu jeweils einzeln in eine geschlossene Box mit Quarzscheibe verbracht und der komplette Rücken der Tiere bestrahlt.

### 6.5.4 Entnahme von murinen Hautproben

Zur Untersuchung der EZM der Haut wurden 5-10 mm breite respektive lange Stanzbiopsien entnommen. Bei einer Entnahmetiefe von ca. 0,5 mm umfassten die Proben Epidermis, Dermis und Subkutis. Das Gewebe wurde dazu jeweils aus kaudalen Rückenarealen der Mäuse entnommen, nachdem die Tiere narkotisiert (Dosierung: 100mg/kg Ketamin und 5mg/kg Xylazin) und auf einer Unterlage fixiert wurden. Es wurde darauf geachtet, dass diese Hautareale keinen mechanischen oder sonstigen Belastungen neben der Bestrahlung ausgesetzt waren. Die Stanzbiopsien wurden im Alter von 28 Lebenswochen entnommen. Nach der Gewebeentnahme wurden die Hautränder mit einem resorbierbaren Faden (Stärke 4.0) und Einzelknopfnähten vernäht und anschließend mit Betaisadon-Lösung desinfiziert.

## 6.6 Bestimmung der Hautparameter

Im Rahmen der oben erwähnten Stanzbiopsien nach 20 -wöchiger Behandlung wurden an den narkotisierten Mäusen mittels *Derma-Lab-System*® [67], ohne invasive Manipulation der Haut, die Parameter Feuchtigkeitsgehalt („*Moisture*“), Transepidermaler Wasserverlust („*TEWL*“) und Elastizität (bestehend aus „*Elasticity*“ und „*Young`s modulus*“) erhoben. Der Feuchtigkeitsgehalt kennzeichnet dabei den Hydratisierungsgrad der oberen Hautschichten über eine Messung der elektrischen Leitfähigkeit. Der transepidermale Wasserverlust stellt das Resultat einer Messung der Evaporation über einem definierten Hautareal dar, während die Elastizität durch faltenfreies Ansaugen der Haut bei Bestimmung von Elevation und Retraktion bestimmt wurde. Die Elastizität wurde hierbei über die beiden Kenngrößen *Viskoelastizität* - als Ausdruck der Dehnbarkeit der Haut - und die sogenannte Dehnsteifigkeit, welche auf der Kraft mit der die Haut 1,5 mm per Sog angehoben wird basiert, ermittelt.



**Abbildung 6: Verlaufsschema Tiere und Behandlung:** (1) Bezug der fünf Wochen alten weiblichen *hairless skh-1-Mäuse*, (2) Operative Ovariectomie und Implantation Östrogen-substituierender Pellets bzw. Placebo-Pellets, (3) Dorsale UVB-Exposition in spezieller geschlossener Box, (4) Durchführung von Stanzbiopsien zur Gewinnung muriner Hautproben, (5a) Non-invasive Bestimmung der Hautparameter und (5b) Durchführung der histologischen Untersuchungen. Modifiziert nach: <http://www.pixabay.com>

## 6.7 Histologische Untersuchungen

### 6.7.1 Gefrierschnitte/Kryoschnitte

Zur Schonung und Vermeidung von Rissen im Gewebe wurden die nativ entnommenen Hautproben zunächst in *Tissue-Tek*<sup>®</sup>-Einbettmedium bei konstant  $-40\text{ °C}$  in Isopentan eingefroren. Anschließend erfolgte eine Lagerung der Gewebeprobe bei  $-80\text{ °C}$ , um letztlich die entsprechenden Schnitte der Hautproben (Dicke  $14\text{ }\mu\text{m}$ ) bei  $-20\text{ °C}$  mit Hilfe eines Kryostaten anzufertigen. Nach Aufnahme der Präparate auf entsprechend vorgekühlte Objektträger ( $-20\text{ °C}$ ) wurden diese unmittelbar danach unter kaltem Luftstrom getrocknet um Feuchtigkeitsniederschläge auf den Objektträgern zu vermeiden. Die Lagerung erfolgte dann bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20\text{ °C}$  unter Ausschluss von Feuchtigkeit.

### 6.7.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Kryoschnitte wurden zunächst mit Ethanol fixiert. Für PG-Färbungen wurde zusätzlich zwecks Demaskierung der Epitope und somit Freilegung der Bindungsstelle für den

Erstantikörper ein enzymatischer Verdau mittels Chondroitinase-ABC-Lösung (*Konzentration 1: 250*) bei Inkubationsbedingungen (37 °C) durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren und mögliche Hintergrundsignale in den Färbungen zu vermeiden wurden die Präparate eine Stunde in 1 % BSA und 10 % FBS blockiert. Die entsprechenden Primärantikörper wurden aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Behandlung der Schnitte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung diente der Inaktivierung endogener Peroxidasen mit dem Ziel unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Applikation der mit Meerrettich- Peroxidase (HRP) konjugierten Zweitantikörper. Die Detektion erfolgte mittels Diaminobenzidin (DAB) als Substrat, der von mit HRP-konjugierten Zweitantikörpern katalysierten Farbreaktion. Bei nicht-fluoreszierenden Sekundärantikörpern wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun und bei fluoreszierenden Antikörpern mit Hoechst 33342 durchgeführt. Die Einbettung der Schnitte erfolgte entweder mittels Aquatex oder Entellan und einem Deckglas (**Tab. 8**).

**Tabelle 8: Protokoll der immunhistochemischen Färbungen**

<b>Zeitliche Abfolge</b>	<b>Färbelösungen</b>	<b>Ziel/Zweck</b>
20-30 min, i.d.R. bei 4 °C	100 % Ethanol oder 100 % Aceton oder 10 % Formalin	Fixierung der Kryoschnitte
3 x 5 min	PBS	Waschen
60 min , 37 °C	Chondroitinase-ABC- Lösung	Bei PG-Detektion: enzymatische Abspaltung der GAG-Ketten vom Kernprotein
3 x 5 min	PBS	s.o.
60 min, Raumtemperatur	Blockierlösung	Inhibition unspezifischer Bindungen der Primärantikörper
über Nacht, 4 °C, feuchte Kammer	Primärantikörper (in 1 % BSA)	Inkubation
3 x 5 min	PBS	Entfernung überschüssiger Primärantikörper
20 min	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Lösung	Inaktivierung endogener Peroxidasen
3 x 5 min	PBS	Waschen

60 min, Raumtemperatur	Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper (in 1 x PBS)	Inkubation
variabel, nach Herstellerangaben und unter Beobachtung der Färbungsintensität	TB DAB-Peroxidase-Set TB Aqua. dest.	Detektion der Sekundärantikörper
1 min	Hämaulan-Lösung nach Mayer und schrittweise: Leitungswasser 1 % HCl Aqua dest.	Zellkernfärbung
	Aquatex/Entellan	Eindecken

### 6.7.3 Siriusrot-Färbung

Kollagen wurde durch Färbung mit Picro-Siriusrot nach der von *Puchtler et. al.* [68] beschriebenen Methode dargestellt. Die Färbung ist spezifisch für das Gesamtkollagen eines Präparates und erlaubt darüber hinaus eine Bestimmung der Packungsdichte der kollagenen Fasern im polarisierten Licht. Dicht gepackte Kollagenfasern erscheinen rot, locker angeordnete Fasern erscheinen hellrot bis grün (**Tab. 9**).

**Tabelle 9: Protokoll der Siriusrot-Färbung**

Zeitliche Abfolge	Färbelösungen	Ziel/Zweck
10 min	70 % Ethanol	Fixierung
2 x 5 min	PBS	Waschen
1 min	Aqua dest.	Waschen
10 min	Cölestineblau	Kernfärbung
kurz	1 % HCl	Differenzierung
5 min	Leitungswasser	Bläuen der Schnitte
15 min	Picro-Siriusrot	Kollagen Detektion
2 min	70 % Ethanol	Schrittweise Dehydrierung mit aufsteigender Alkoholreihe
2 min	95 % Ethanol	s.o.

2 min	100 % Ethanol	s.o.
5 min	Xylol	Entfärben
	Entellan	Eindecken

## 6.8 Auswertung von histologischem Material

### 6.8.1 Mikroskop

Sämtliche lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem Leica Lichtmikroskop (DM2000) und aufgesetzter Kamera (DFC420C) gemacht. Zur Quantifizierung und Auswertung wurden Aufnahmen der histologischen Schnitte in 25x (1 Foto pro Hautprobe) und in 100x (3 Fotos pro Hautprobe) Vergrößerung bei Kaltlicht gemacht. Dies erfolgte bei konstanter Belichtungszeit, Farbsättigung und Gamma-Einstellung (Helligkeitswert) für das jeweilige Farbeset, sowie Anwendung einer Shading-Korrektur (Korrektur von Tönung und Schattierung bei ungleichmäßiger Beleuchtung), mit dem Ziel eine möglichst hohe Qualität der Aufnahmen bei gleichzeitiger Reduktion von Helligkeitsunterschieden im Hintergrund zu erzielen. Unter Verwendung der Mikroskop-Software *Leica Application Suite* (Ver. 3.3.1) wurden die Fotos anschließend zur weiteren Auswertung als 8-Bit-Bilder digitalisiert gespeichert. Zur Darstellung der Packungsdichte der Kollagenfasern in der Siriusrotfärbung wurde ein Polarisationsfilter verwendet.

### 6.8.2 Quantitative Auswertung via *ImageJ*

Zur quantitativen Auswertung sämtlicher immunhistochemischer Färbungen wurde das Bildanalyseprogramm *ImageJ* in der Version 1.41 verwendet (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Die Verwendung des *plugins (colour deconvolution)* erlaubte die Trennung der Farbkanäle der Kernfärbung von denen der jeweiligen Zielstruktur, deren Farbsignal so quantitativ auswertbar gemacht wurde. Den jeweils spezifisch gefärbten Arealen wurde ein manuell festgelegter Intensitäts-Schwellenwert zugeordnet, so dass eine maximale Erfassung der gefärbten Zielstruktur, bei gleichzeitiger Minimierung möglicher Hintergrundaktivitäten möglich war. Oberhalb des Schwellenwertes liegende Bereiche waren somit als positiv definiert und gaben Auskunft über den prozentualen Anteil der gefärbten Fläche an der zuvor ausgewählten Gesamtfläche. Unter dem Schwellenwert liegende Werte wurden als Hintergrund eliminiert. Der Schwellenwert wurde für alle Schnitte einer Färbung konstant gehalten. Pro Foto wurden nach dem Zufallsprinzip 14 Areale innerhalb der ersten 35 µm unmittelbar unterhalb der Epidermis selektiert, wobei die papilläre Dermis als Orientierung diente. Mit Hilfe der *ImageJ* Software wurde der Parameter prozentuale Fläche (*% angefärbte Fläche*) berechnet. Die

prozentuale Fläche ist definiert als die spezifisch angefärbte Fläche bezogen auf die Gesamtfläche eines photographierten Präparates. Alle errechneten quantitativen Farbtintensitäten sind in den Darstellungen und Grafiken, wie bereits von anderen Autoren vorgeschlagen, als % *angefärbte Fläche* dargestellt [69].

### **6.8.3 Quantifizierung MAC-2 -positiver Zellen durch Zellzählung**

Die immunhistochemische Detektion von Makrophagen wurde mit einer MAC-2-Färbung durchgeführt und lichtmikroskopisch bei einer Vergrößerung von 100x ausgewertet. Die Präparate wurden jeweils auf das Vorliegen MAC-2-spezifisch angefärbter Strukturen in drei Gesichtsfeldern untersucht und anschließend ausgezählt. Es werden jeweils die absoluten Zellzahlen als Vielfaches der Kontrolle angegeben.

### **6.8.4 Quantifizierung Ki67-positiver Zellen durch Angabe relativer Fraktionen**

Die immunhistochemische Ki67-Färbung zur Quantifizierung der Proliferation wurde in drei Gesichtsfeldern in 100x Vergrößerung ausgewertet. Hierbei wurden jeweils separat sämtliche kernhaltigen Zellen der papillären Dermis und sämtliche Ki67-positive Zellen der papillären Dermis ausgezählt. Somit wurde die Fraktion proliferierender Zellen innerhalb der Dermis gemessen an der Gesamtzahl dermalen Zellen erfasst. Die Darstellungen und Grafiken enthalten prozentuale Angaben (Anzahl proliferierender Zellen / Gesamtzellzahl der Dermis) als Vielfaches der Kontrolle.

## **6.9 Statistische Auswertung**

Die Messdaten sind als arithmetische Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n unabhängigen Experimenten dargestellt. Das Signifikanzniveau P für  $\alpha$  wurde mit 0,05 und das Konfidenzintervall mit 95 % festgelegt. Signifikante Unterschiede zwischen mehreren Versuchsgruppen ( $\geq 3$ ) wurden via *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) und anschliessendem *Bonferroni-Test* für multiple Vergleiche überprüft. Unterschiede zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mittels ungepaartem *Student's t-Test* (T-Test) statistisch getestet. Die statistischen Auswertungen sowie graphischen Darstellungen wurden unter Zuhilfenahme der *Graph-Pad-Software 5.0* (Graph-Pad, Institute for scientific information, San Diego, USA) angefertigt.



# 7 Ergebnisse

## 7.1 Histologische Analyse der extrazellulären Matrix

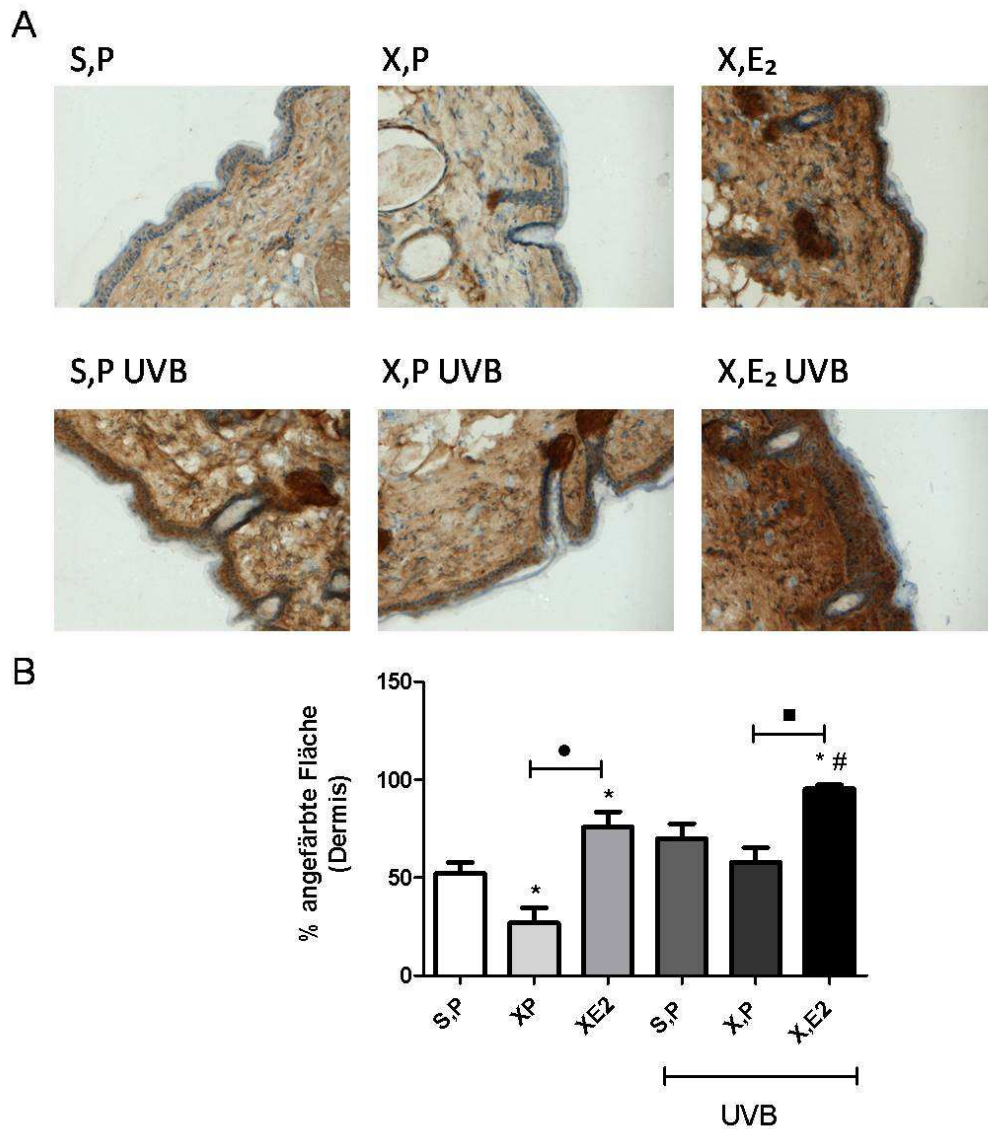
### 7.1.1 Modulation der Hyaluronsäure-Matrix

Am Beginn der Untersuchungen stand die Quantifizierung der dermalen HA, einem Polysaccharid mit wesentlicher Bedeutung für die Haut und zudem auch mengenmäßig ein Hauptbestandteil der dermalen EZM (5.1.1). HA wurde mittels eines biotinylierten, an Hyaluronsäure bindenden Proteins (HABP) gefärbt. Hierbei war die stärkste Färbintensität in der papillären Dermis zu erkennen (**Abb. 7**). Die Epidermis zeigte demgegenüber nur eine relativ schwache Färbung. Diese histologische Verteilung von HA innerhalb der erwähnten zwei Hautschichten wurde in der Vergangenheit bereits von anderen Autoren beschrieben [4].

Innerhalb der quantitativen Analyse zeigte sich, dass der dermale HA-Gehalt unter intrinsischen Bedingungen nach 20-wöchiger  $E_2$ -Substitution (X,  $E_2$ ) sowohl gegenüber den ovariektomierten Tieren (X, P), als auch gegenüber der Kontrollgruppe (S, P) signifikant erhöht war. Die Depletion von  $E_2$  mittels X führte demgegenüber zu einem signifikanten Verlust dermalen HA unter intrinsischen Bedingungen (**Abb. 7**).

Unter dem Einfluss der Bestrahlung zeigte sich nach 20 Wochen ein tendenzieller, zur Kontrollgruppe nicht signifikanter Anstieg des dermalen HA-Gehaltes in allen UVB-exponierten Gruppen im Vergleich zu den jeweils nicht bestrahlten Gruppen (**Abb. 7**). Durch die Substitution mit  $E_2$  und gleichzeitiger UVB-Exposition manifestierte sich eine weitere Zunahme dermalen HA im Vergleich zu Kontrollen und X (**Abb. 7**). Die Gruppe X,  $E_2$  UVB wies somit den höchsten HA-Gehalt aller untersuchten Gruppen auf.

Zusammenfassend ließ sich zeigen, dass  $E_2$  sowohl unter extrinsischen, als auch unter intrinsischen Bedingungen zu einer Augmentation dermalen HA geführt hat, während die X parallel eine Reduktion dermalen HA bedingte.



**Abbildung 7: Immunhistochemische Hyaluronsäure-Detektion in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung:** Quantitative Bildauswertung mittels ImageJ®: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); (A) Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der für Hyaluronsäure spezifischen Färbung an Hautschnitten von 14 µm Dicke ,100x Vergrößerung; (B) Statistische Auswertung der HA-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung, n = 7 Tiere, \*, p < 0,05 versus S, P; #, p < 0,05 versus S, P UVB; •, p < 0,05 versus X, P; ■, p < 0,05 versus X, P UVB.

### 7.1.2 Quantifizierung und Alterationen von Biglykan

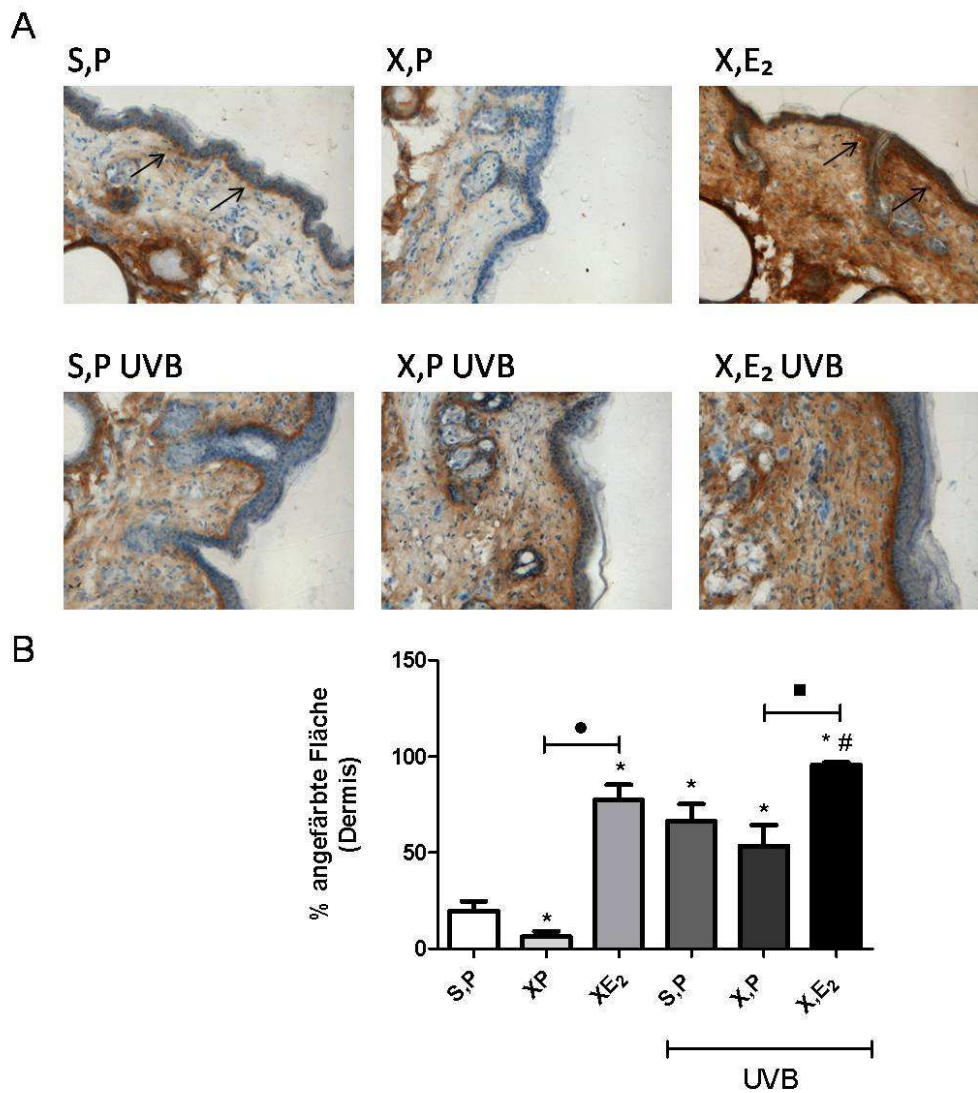
Nachdem beobachtet wurde, dass eine E<sub>2</sub>-Substitution zu einer Augmentation dermalen HA geführt hat, sollte anschließend geklärt werden, ob auch auf der Ebene der SLRP (BGN und LUM) durch E<sub>2</sub>-induzierte Veränderungen in der Quantität dieser EZM-Komponenten auftreten. Mit dem Antikörper LF159 von Larry Fischer konnte gezeigt werden, dass BGN vermehrt in der oberen papillären Dermis als schmaler subepithelialer Saum sowie in direkter Assoziation mit der Basalmembran auftritt (**Abb. 8**).

Nach 20 -wöchiger Behandlung ließ sich eine maßgebliche Beeinflussung der dermalen BGN-Expression im intrinsischen Prozess durch E<sub>2</sub>-Substitution bzw. Depletion beobachten. So führte die E<sub>2</sub>-Substitution zu einer signifikanten Zunahme des dermalen BGN-Gehaltes im Vergleich zur Kontrollgruppe (S, P) und den ovariectomierten Tieren (X, P), während die X im Vergleich zur Kontrollgruppe (S, P) und den mit E<sub>2</sub>-substituierten Tieren (X, E<sub>2</sub>) einen signifikanten Verlust von BGN in den untersuchten Hautschichten zur Folge hatte (**Abb. 8**).

Unter extrinsischen Bedingungen führte die E<sub>2</sub>-Substitution ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme des dermalen BGN-Gehaltes im Vergleich zur Kontrollgruppe (S, P UVB) und den ovariectomierten Tieren (X, P UVB). Im Gegensatz dazu führte die X zwar zu einem Verlust von BGN, ohne jedoch ein signifikantes Ausmaß gegenüber der Kontrollgruppe zu erreichen (X, P UVB vs. S, P UVB) (**Abb. 8**).

Darüber hinaus führte die UVB-Bestrahlung im extrinsischen Prozess der Hautalterung zu einer signifikanten Zunahme von dermale BGN gegenüber den jeweils nicht UVB-exponierten Gruppen (S, P vs. S, P UVB; X, P vs. X, P UVB; X, E<sub>2</sub> vs. X, E<sub>2</sub> UVB). Insgesamt manifestierte sich so der höchste dermale BGN-Gehalt in der UVB-exponierten und mit E<sub>2</sub>-substituierten Gruppe (X, E<sub>2</sub> UVB).

Das in der Haut physiologischerweise basal niedrig exprimierte BGN zeigte sowohl nach UVB-Bestrahlung, als auch im Zuge exogener Substitution mit E<sub>2</sub> eine starke Anreicherung in der papillären Dermis. Darüber hinaus führte eine E<sub>2</sub>-Substitution zu einer deutlichen subepithelialen Zunahme von BGN mit Ausdehnung auf tiefere Schichten der Dermis (**Abb. 8**). Hierbei lies sich quantitativ sowohl intrinsisch als auch extrinsisch eine Verdopplung des dermalen BGN-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle validieren (X, E<sub>2</sub> und X, E<sub>2</sub> UVB vs. S, P).



**Abbildung 8: Immunohistochemische Biglykan-Detektion in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung:** Quantitative Bildauswertung mittels ImageJ®: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); **(A)** Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der für Biglykan spezifischen Färbung an Hautschnitten von 14 µm Dicke, 100x Vergrößerung; (→) zeigt subepitheliale Lokalisation von BGN in der Kontrollgruppe S, P, sowie deutliche dermale Zunahme (→) von BGN und Ausweitung auf tiefere Schichten der Dermis in der E<sub>2</sub>-substituierten X, E<sub>2</sub>-Gruppe; **(B)** Statistische Auswertung der BGN-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung, n = 7 Tiere, \*, p < 0,05 versus S, P; #, p < 0,05 versus S, P UVB; •, p < 0,05 versus X, P; ■, p < 0,05 versus X, P UVB.

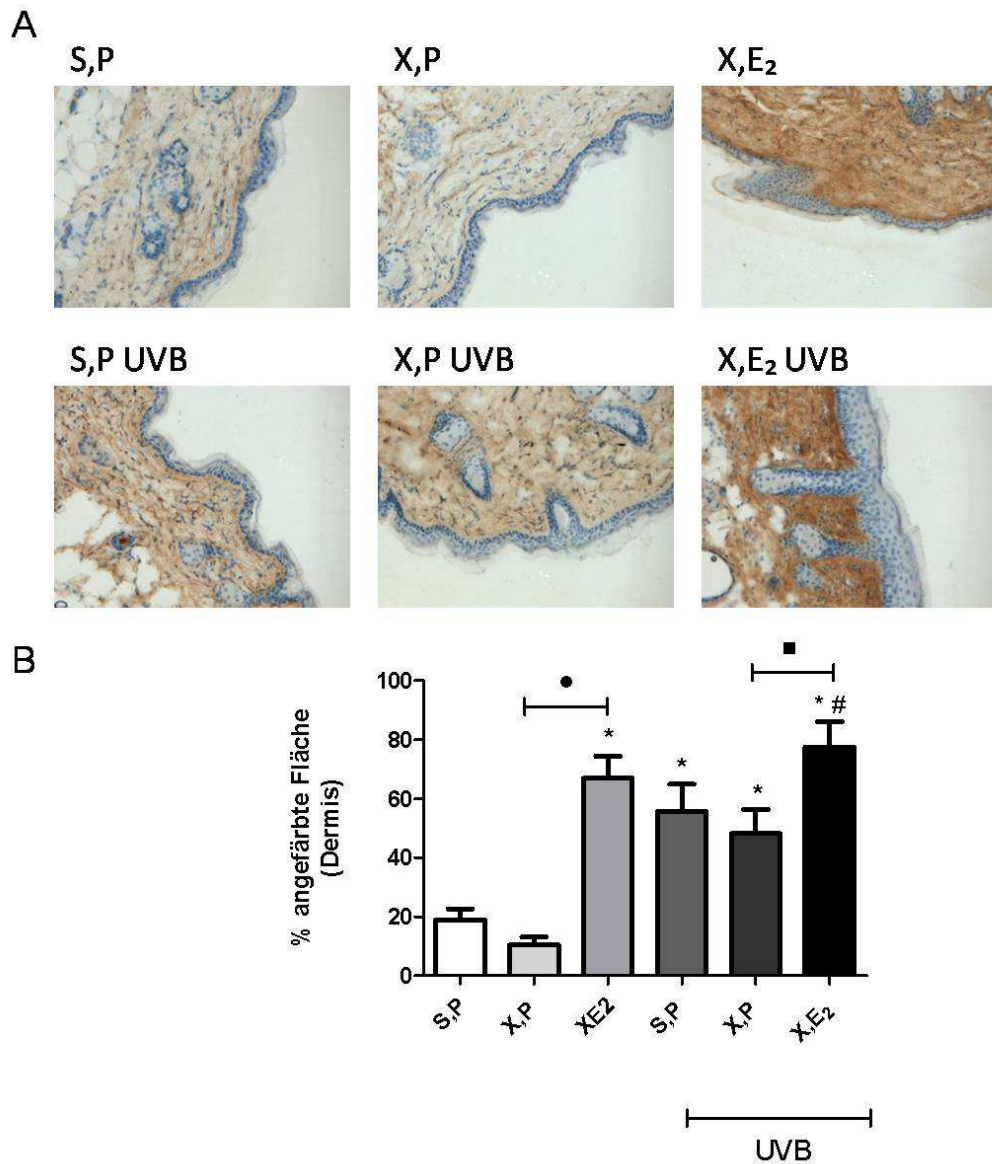
### 7.1.3 Quantifizierung und Alterationen von Lumikan

Neben BGN könnten auch andere SLRP der dermalen EZM durch  $E_2$  reguliert werden [70]. Angesichts der wiederholt beschriebenen Kollagendegradation und einer veränderten Anordnung kollagener Fasern [42, 71] im Rahmen aktinischer Hautschäden, sowie aufgrund experimenteller Evidenzen, dass es sich bei LUM um ein PG handelt, welches in Fibrillogenese und Anordnung der Kollagenfibrillen im extrazellulären Raum involviert ist [72, 73], wurde im weiteren Verlauf eine immunhistochemische Färbung für das SLRP LUM durchgeführt (**Abb. 9**). Interessanterweise zeigte LUM, ähnlich wie BGN eine vermehrte Akkumulation in der oberen papillären Dermis, war jedoch in der Epidermis nicht nachweisbar. Ein subepithelialer LUM-Saum ließ sich, im Gegensatz zum BGN nicht darstellen.

Ähnlich der dermalen BGN-Akkumulation, zeigte sich unter  $E_2$ -Behandlung im intrinsischen Verlauf eine signifikante Augmentation von dermale LUM gegenüber den ovariektomierten Tieren und den Kontrolltieren (**Abb. 9**). Analog zu diesem Ergebnis wiesen die ovariektomierten Tiere eine verminderte dermale LUM-Akkumulation auf. Eine signifikante Reduktion des LUM-Vorkommens durch X konnte gegenüber der Kontrolle jedoch nicht festgestellt werden (S, P vs. X, P) (**Abb. 9**).

Unter extrinsischen Bedingungen führte die  $E_2$ -Substitution ebenfalls zu einer Zunahme des dermalen LUM -Gehaltes gegenüber den ovariektomierten Tieren und den Kontrolltieren (**Abb. 9**), während keine signifikante Abnahme an dermalen LUM durch die X detektiert werden konnte.

Zudem zeigte sich sowohl bei den Kontrolltieren (S, P vs. S, P UVB), als auch bei den ovariektomierten Tieren (X, P vs. X, P UVB) nach 20 Wochen Behandlung ein Anstieg des dermalen LUM-Gehaltes durch UVB-Bestrahlung. Dieser UVB-induzierte Effekt war zwar tendenziell auch unter  $E_2$ -Substitution zu beobachten, erreichte jedoch kein signifikantes Ausmaß (X,  $E_2$  vs. X,  $E_2$  UVB).



**Abbildung 9: Immunhistochemische Lumikan-Detektion in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung:** Quantitative Bildauswertung mittels ImageJ®: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); **(A)** Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der für Lumikan spezifischen Färbung an Hautschnitten von 14 µm Dicke ,100x Vergrößerung; **(B)** Statistische Auswertung der LUM-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung, n = 7 Tiere, \*, p < 0,05 versus S, P; #, p < 0,05 versus S, P UVB; •, p < 0,05 versus X, P; ■, p < 0,05 versus X, P UVB.

#### 7.1.4 Quantifizierung und Alterationen von Versikan

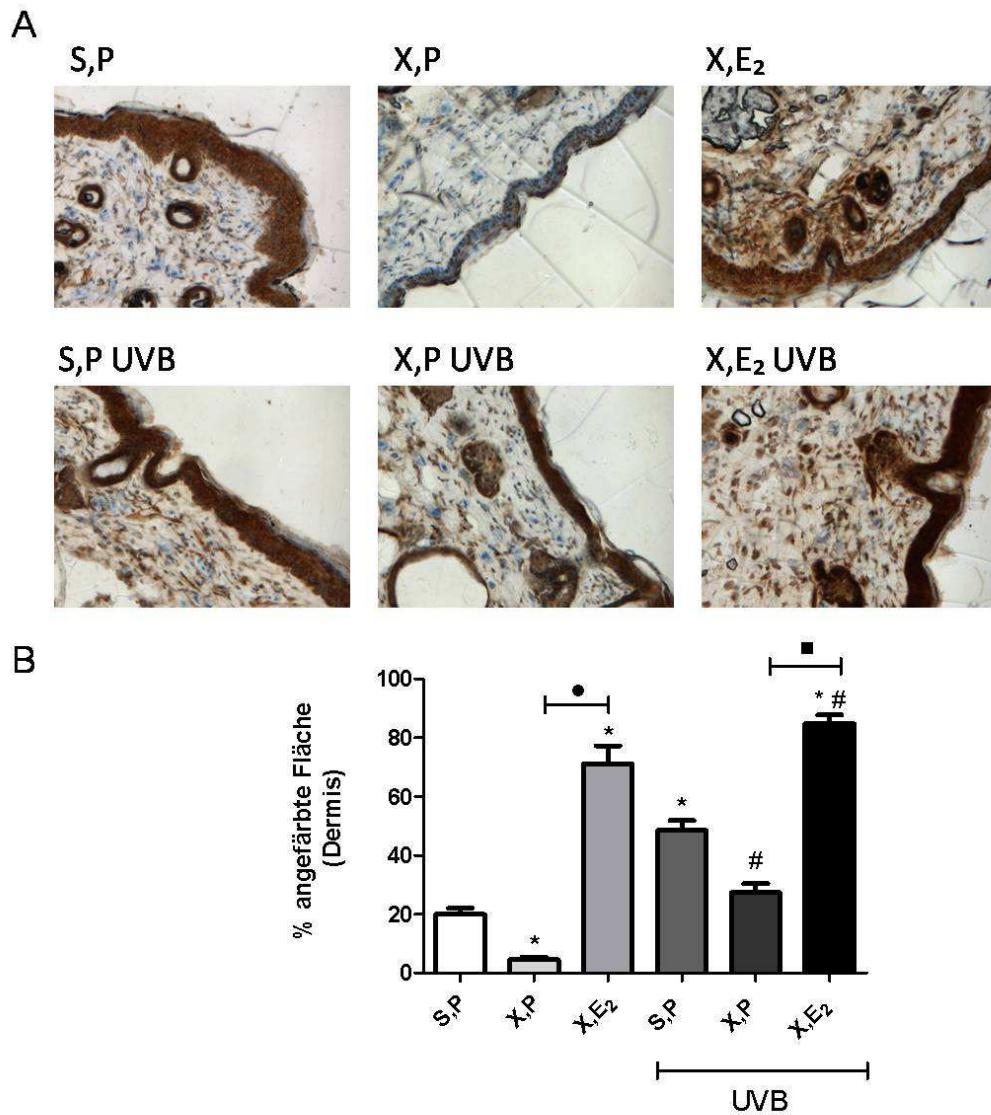
Da eine Bedeutung von  $E_2$  für die dermale HA- und SLRP -Expression im Alterungsprozess verifiziert worden war, stellte sich die Frage, ob auch die hyaluronsäure-bindenden PG durch  $E_2$  reguliert werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde mit dem Antikörper LF 99 eine immunhistochemische Detektion des PG VER durchgeführt. VER ist mengenmäßig eines der wichtigsten PG der Dermis [74] und verfügt gleichzeitig über eine spezifische Bindungsstelle G1 [32] für HA. Somit sollte evaluiert werden, ob ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen der HA-Matrix und dem PG VER bestand.

Bei makroskopischer Betrachtung wies die Epidermis den höchsten VER-Gehalt auf (keine Quantifizierung erfolgt). Im Gegensatz zum hauptsächlich dermalen Vorkommen von BGN und LUM. Darüber hinaus konnte VER in geringerer Menge ebenfalls in der papillären Dermis nachgewiesen werden (**Abb. 10**).

Im Fall der mit  $E_2$ -substituierten Tiere (X,  $E_2$ ) zeigte sich unter intrinsischen Bedingungen eine signifikante Erhöhung der VER-Expression im Vergleich zu ovariektomierten Tieren (X, P) und Kontrollen (S, P). Weiterhin manifestierte sich nach 20-wöchiger Behandlung eine signifikante Reduktion der dermalen VER-Menge durch X im Vergleich zu den mit  $E_2$  -substituierten Tieren (X,  $E_2$ ) und den Kontrolltieren (S, P) (**Abb. 10**).

Unter extrinsischen Bedingungen zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der VER-Akkumulation bei den  $E_2$ -substituierten Tieren (X,  $E_2$  UVB) im Vergleich mit Kontrollen (S, P UVB) und X (X, P UVB). Der Einfluss einer  $E_2$ -Depletion führte jedoch - anders als bei HA, BGN und LUM - im extrinsischen Verlauf trotz UVB-Bestrahlung zu einer signifikanten Abnahme der VER-Menge in der papillären Dermis (X, P UVB vs. S, P UVB und X,  $E_2$  UVB).

Zudem konnte nach 20 Wochen unter UVB-Exposition eine Augmentation von dermalem VER beobachtet werden, die im Fall der ovariektomierten Tiere (X, P vs. X, P UVB) und der Kontrolltiere (SP vs. SP UVB) signifikant war. (**Abb. 10**).



**Abbildung 10: Immunhistochemische Versikan-Detektion in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung:** Quantitative Bildauswertung mittels ImageJ®: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); **(A)** Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der für Versikan spezifischen Färbung an Hautschnitten von 14 µm Dicke ,100x Vergrößerung; **(B)** Statistische Auswertung der VER-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung, n = 7 Tiere, \*, p < 0,05 versus S, P; #, p < 0,05 versus S, P UVB; ■, p < 0,05 versus X, P UVB; •, p < 0,05 versus X, P.



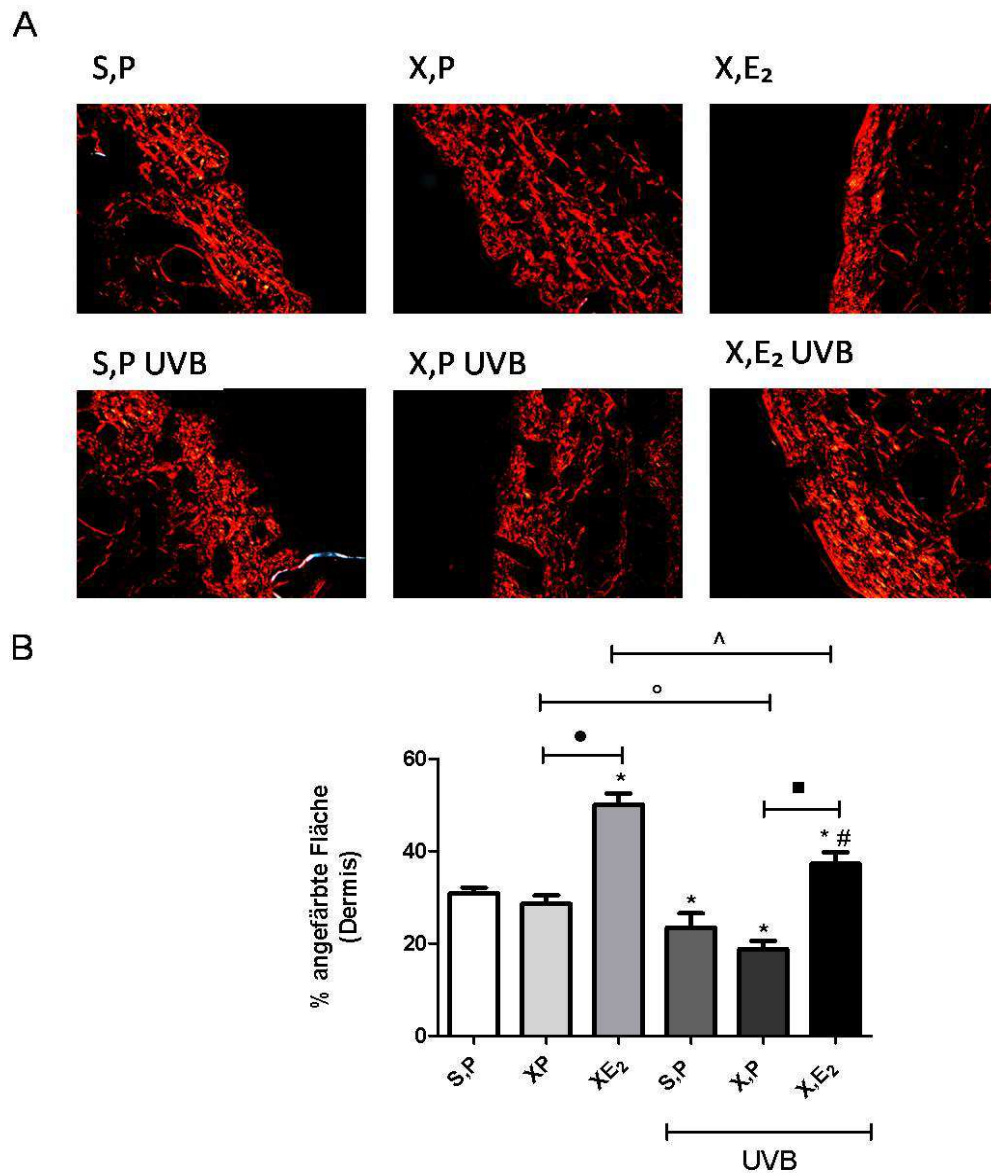
### 7.1.5 Packungsdichte kollagener Fasern

Der Gesamtkollagengehalt der Präparate wurde mit Hilfe der Picro-Siriusrot-Methode dargestellt. Hierbei konnte durch spezielle polarisierte Aufnahmen die Packungsdichte dermalen Kollagenfasern ermittelt werden, so dass neben dem Nachweis quantitativer Alterationen des Gesamtkollagengehaltes auch Aussagen hinsichtlich morphologischer und qualitativer Veränderungen der Kollagenmatrix in diesem Versuchsmodell möglich waren. Erwartungsgemäß [1] war das dermale Kollagen in der Kontrollgruppe (S, P) locker gepackt und netzartig angeordnet. Die stärkste Akkumulation manifestierte sich hierbei unmittelbar subepithelial.

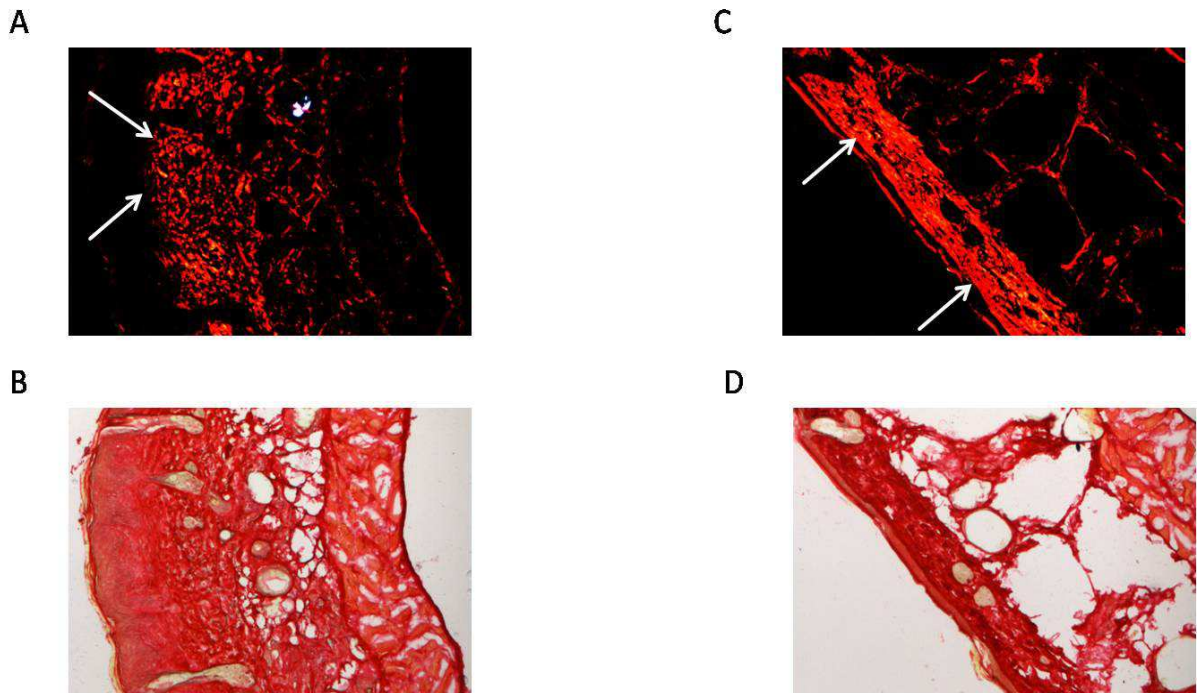
Die im Verlauf der intrinsischen Hautalterung erhobenen quantitativen Daten führten zu dem Ergebnis einer durch  $E_2$  gesteigerten dermalen Kollagen-Akkumulation. So ließ sich unter  $E_2$ -Substitution (X,  $E_2$ ) nach 20 Wochen eine signifikante Erhöhung des dermalen Kollagens im Stratum papillare im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren (X, P) und den Kontrolltieren (S, P) validieren (**Abb. 11**). Eine  $E_2$ -Depletion führte demgegenüber im intrinsischen Verlauf zu einer Reduktion dermalen Kollagene im Vergleich zu den  $E_2$ -substituierten Tieren, jedoch nicht gegenüber den Kontrolltieren (S, P) (**Abb. 11**).

Im Prozess der extrinsischen Hautalterung führte die UVB-Bestrahlung zu einem Verlust dermalen Kollagene. Dieser Effekte zeigte sich in allen UVB-exponierten Gruppen im Vergleich zu den jeweils nicht bestrahlten Gruppen und lies sich durchgehend signifikant nachweisen (S, P vs. S, P UVB; X, P vs. X, P UVB; X,  $E_2$  vs. X,  $E_2$  UVB). Im Rahmen dieser aktinisch verursachten Reduktion dermalen Kollagens fiel auf, dass  $E_2$  dem UVB-Effekt entgegenwirken konnte. So zeigte sich nach 20 Wochen trotz UVB-Exposition eine signifikante Augmentation der dermalen Gesamtkollagene unter  $E_2$ -Substitution (X,  $E_2$  UVB). Der dermale Kollagengehalt dieser Gruppe überstieg hierbei sowohl den der ovariectomierten Tiere (X, P und X, P UVB), als auch den der extrinsischen (S, P UVB) und intrinsischen (S, P) Kontrollen (**Abb. 11**).

Unter dem Einfluss der UVB-Bestrahlung (S, P UVB) reduzierte sich zudem die Packungsdichte kollagener Fasern und nach 20 -wöchiger UVB-Exposition war die papilläre Dermis bereits auffällig ausgedünnt, so dass von einer Reduktion des Gesamtkollagens auszugehen war (**Abb. 11 und 12**). Darüberhinaus ließ sich ein optisch deutlicher Dichteverlust kollagener Fasern in der papillären Dermis ovariectomierter Mäuse validieren unabhängig davon, ob sie zusätzlich UVB-exponiert waren oder nicht. Die  $E_2$ -Applikation (X,  $E_2$  und X,  $E_2$  UVB) führte demgegenüber zu dem morphologischen Erscheinungsbild einer dicht gelagerten, fast durchgehenden subepithelialen Kollagenschicht, die bei den entsprechenden Präparaten als eine Art „*dermalen Coat*“ imponierte (**Abb. 11 und 12**).



**Abbildung 11: Quantitative Detektion des Gesamtkollagens in der papillären Dermis mittels Picro-Siriusrot-Methode nach 20 -wöchiger Behandlung:** Quantitative Bildauswertung mittels ImageJ®: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); (A) Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der für Kollagen spezifischen Färbung im polarisierten Licht an Hautschnitten von 14 µm Dicke ,100x Vergrößerung, Rot = Kollagen; (B) Statistische Auswertung der Kollagen-Akkumulation in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung, n = 7 Tiere, \*, p < 0,05 versus S, P; #, p < 0,05 versus S, P UVB; ■, p < 0,05 versus X, P UVB; •, p < 0,05 versus X, P; °, p < 0,05 versus X, P; ^ < 0,05 versus X, E<sub>2</sub>.



**Abbildung 12: A-D: Exemplarische Vergleichsaufnahmen der Siriusrot-Färbung der Gruppen S, P UVB und X, E<sub>2</sub> UVB** zeigen die Bedeutung von E<sub>2</sub> während extrinsischer Hautalterung im polarisierten Licht (A und C), sowie mittels konventioneller Lichtmikroskopie (B und D), 100x Vergrößerung; **A und B** stellen Gruppe S, P UVB dar, deutlich erkennbar sind die UVB-induzierte, epidermale Akanthose und dermal betont ausgedünnte Areale ( → ) bei signifikant reduziertem Gesamtkollagen; **C und D** stellen Gruppe X, E<sub>2</sub> UVB dar mit dicht gelagerten dermalen Kollagenfibrillen im Sinne eines fast durchgehenden, „papillären layers“ bzw. „coats“ ( → ); Erst die polarisierten Aufnahmen verdeutlichen die E<sub>2</sub> assoziierten Effekte, während die konventionelle Lichtmikroskopie hier keinen Aufschluss über die tatsächliche Dichte kollagener Fasern geben kann.

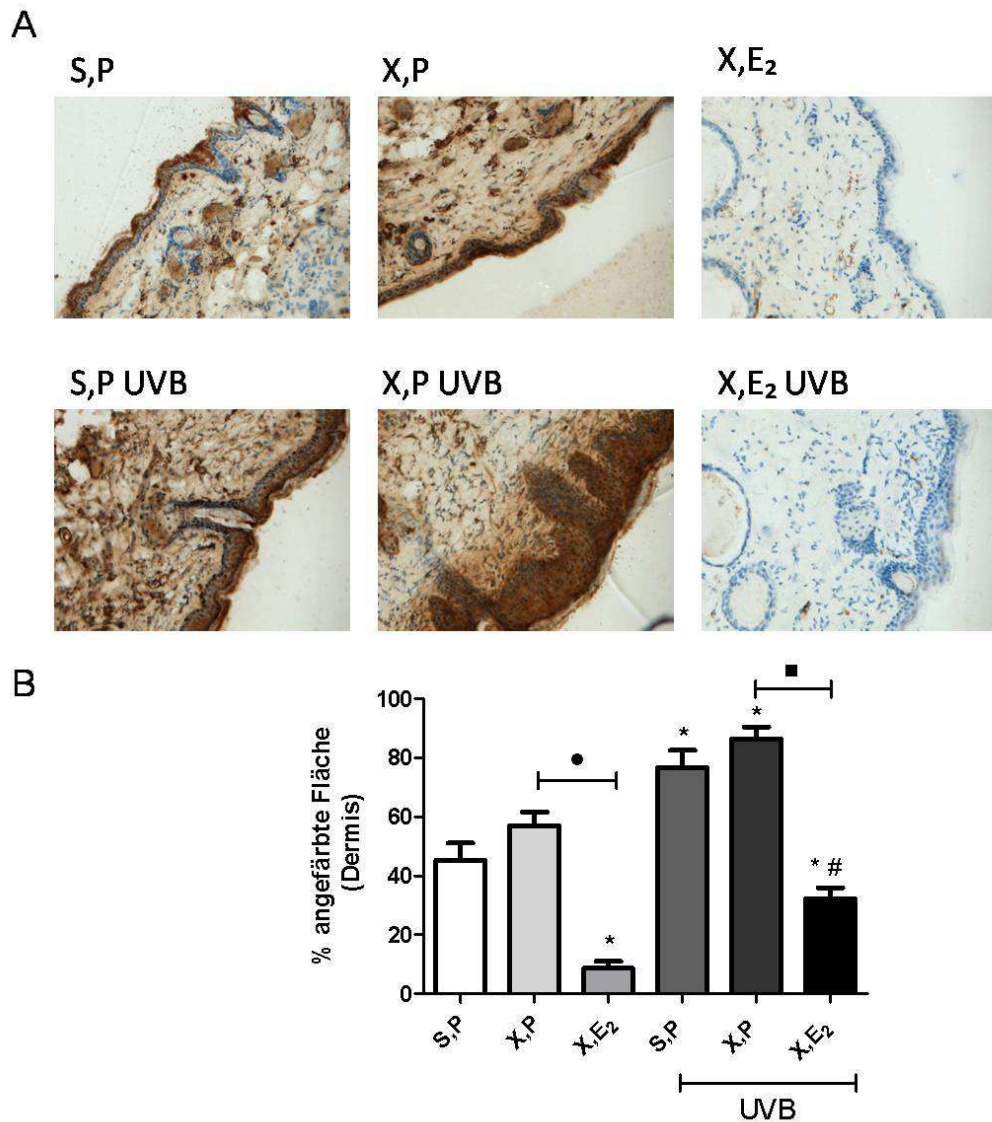
### 7.1.6 Kollagendegradation

Im Rahmen von älteren Untersuchungen [46, 75] konnte gezeigt werden, dass UV-Stress die Synthese diverser Matrixmetalloproteinasen (MMP-1, MMP-3, MMP-9) hochreguliert und somit dermale Kollagenfibrillen verstärkt abgebaut werden. Um das Ausmaß dieser Veränderungen bzw. Schädigungen der dermalen EZM genauer zu erfassen, wurde - neben der durchgeführten Bestimmung des Gesamtkollagens mittels Picro-Siriusrot-Färbung - zusätzlich ein Nachweis der potentiell entstandenen Kollagenspaltprodukte mit einem Antikörper gegen kollagene Neoepitope durchgeführt.

Es konnte hierbei gezeigt werden, dass Kollagenspaltprodukte sowohl massiv in der Epidermis, als auch in geringerem Ausmaß in der Dermis entstehen (**Abb. 13**). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass unabhängig von der jeweiligen Behandlung der Tiere, praktisch in

jedem Gewebeschnitt zumindest quantitativ geringe Mengen an Kollagenfragmenten vorhanden waren, so dass deren Entstehung sowohl im Verlauf intrinsischer als auch extrinsischer Hautalterung als obligat anzusehen ist.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung zeigte, dass nach 20 Wochen Behandlung in allen UVB-exponierten Gruppen eine signifikante Zunahme dermalen KF im Vergleich zu den jeweils nicht bestrahlten Gruppen detektierbar war (**Abb. 13**). Neben einer massiven Degradation von dermalem Kollagen durch UVB-Exposition, wirkte zudem auch die durchgeführte OVX als Induktor der Kollagenfragmentierung. Dieser Effekt konnte jedoch sowohl während intrinsischer, als auch während extrinsischer Hautalterung (**Abb. 11**) nur in der Tendenz und nicht signifikant gegenüber den Kontrolltieren (S, P und S, P UVB) gezeigt werden. Demgegenüber wurde die Entstehung von Kollagenspaltprodukten unter Applikation von  $E_2$  sowohl im intrinsischen, als auch im extrinsischen Verlauf signifikant gegenüber den ovariectomierten Tieren (X, P und X, P UVB) und den Kontrolltieren (S, P und S, P UVB) reduziert. Interessanterweise war der Effekt einer exogenen  $E_2$ -Applikation im extrinsischen Verlauf derart ausgeprägt, dass sie der UVB-bedingten Entstehung von KF entgegen wirken konnte. Die Gruppe X,  $E_2$  UVB wies hierbei einen signifikant geringeren Gehalt an KF als die Gruppen S, P; S, P UVB und X, P UVB auf, so dass die Anzahl kollagener Neoepitope hier sogar unter der des intrinsischen Kontrollniveaus (S, P) lag (**Abb. 13**). Zusammenfassend zeigte sich, dass  $E_2$  in diesem Versuchsmodell auf der einen Seite die Menge des Gesamtkollagens steigern und auf der anderen Seite die Entstehung biochemisch aktiver KF inhibieren kann. Beide Effekte manifestierten sich sowohl bei endogen als auch bei exogen gealterter Haut, schienen jedoch im extrinsischen Verlauf quantitativ ausgeprägter zu sein (**Abb. 11-13**).



**Abbildung 13: Immunhistochemische Detektion kollagener Neoepitope in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung:** Quantitative Bildauswertung mittels ImageJ®: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); (A) Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der für Kollagenfragmente spezifischen Färbung an Hautschnitten von 14 µm Dicke ,100x Vergrößerung; (B) Statistische Auswertung der Akkumulation kollagener Neoepitope in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung, n = 7 Tiere, \*, p < 0,05 versus S, P; #, p < 0,05 versus S, P UVB; ■ , p < 0,05 versus X, P UVB; •, p < 0,05 versus X, P.

### 7.1.7 Modifikationen im Proliferationsstatus dermalen Zellen

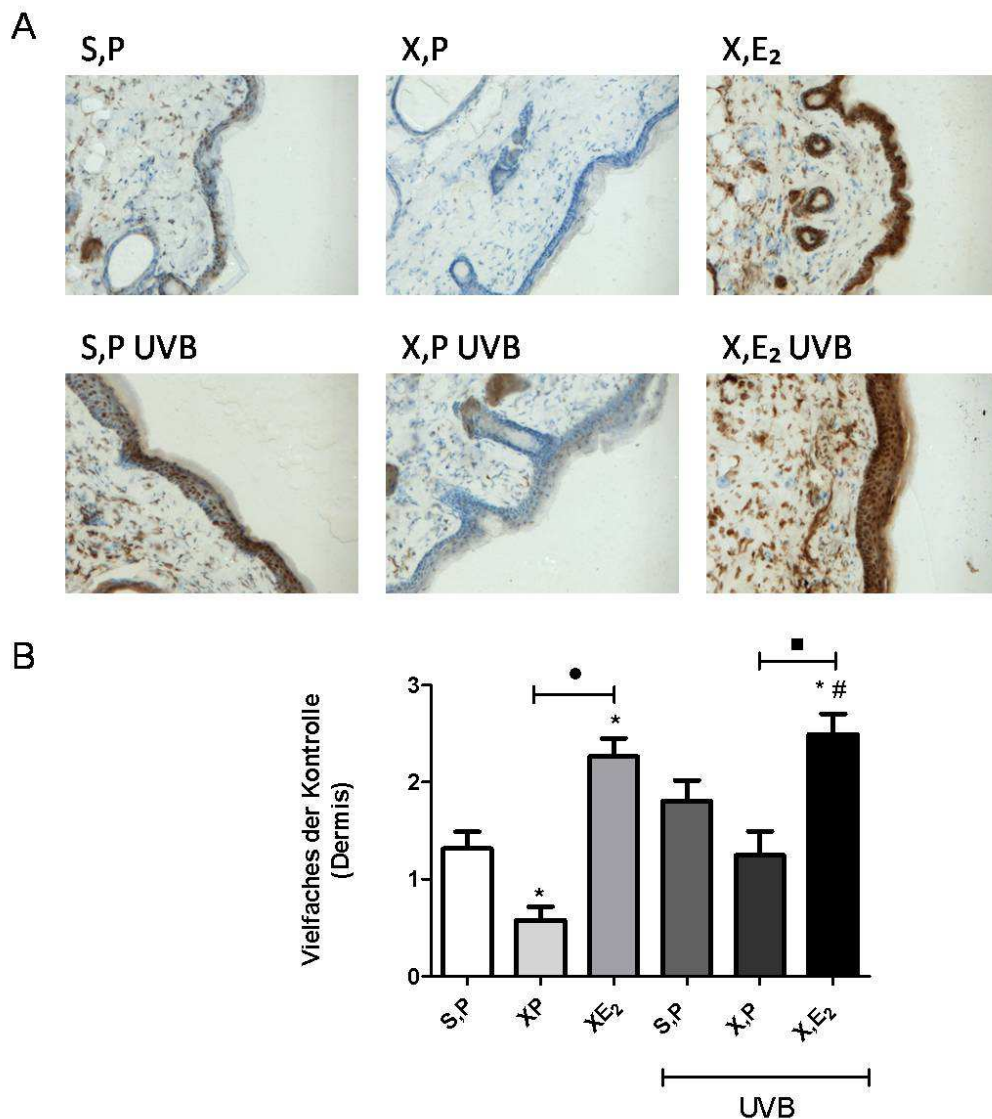
Zur Abschätzung der „Wachstumsfraktion“ innerhalb der dermalen Zellen wurde der Proliferationsmarker Ki67 bestimmt. Die Expression von Ki67, einem großen mit dem Zellkern assoziierten Proteindimer in proliferierenden Zellen, erfolgt während der Mitose, wobei ein kausaler Zusammenhang zwischen Zellproliferation und der Expression von Ki67 besteht [76]. Ein Großteil der proliferierenden Zellen war erwartungsgemäß in der Epidermis lokalisiert. Darüber hinaus zeigte sich eine deutlich geringere Anzahl proliferierender Zellen in der papillären Dermis, sowie innerhalb der retikulären Dermis in Assoziation mit kleinen terminalen Kapillaren (**Abb. 14**).

Unter intrinsischen Bedingungen führte die E<sub>2</sub>-Substitution (X, E<sub>2</sub>) nach 20 Wochen zu einem signifikanten Anstieg der proliferativen Fraktion innerhalb der papillären Dermis im Vergleich zu Kontrolltieren (S, P) und ovariectomierten Tieren (X, P). Die ovariectomierten Tiere (X, P) wiesen darüberhinaus eine signifikant reduzierte Anzahl proliferierender Zellen im Vergleich mit der Kontrollgruppe (S, P) auf.

Auch unter extrinsischen Bedingungen führte die E<sub>2</sub>-Substitution (X, E<sub>2</sub> UVB) zu einer erhöhten Anzahl dermal proliferierender Zellen im Vergleich zu S, P UVB und X, P UVB und auch gegenüber dem intrinsischen Kontrollniveau S, P (**Abb. 14**). Ovariectomiebedingte Reduktionen in der Anzahl dermal proliferierender Zellen waren im extrinsischen Verlauf ebenfalls zu beobachten, jedoch nicht signifikant (S, P UVB vs. X, P UVB).

Die UVB-Exposition ohne Eingriff in den Östrogenhaushalt führte in der Tendenz zwar auch zu einer erhöhten Anzahl Ki67-positiver Zellen innerhalb der papillären Dermis, erreichte jedoch kein signifikantes Ausmaß (S, P vs. S, P UVB).

Zusammenfassend zeigte sich somit sowohl im intrinsischen als auch im extrinsischen Verlauf ein signifikanter Anstieg der Fraktion proliferierender Zellen bei den E<sub>2</sub>-substituierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen und den ovariectomierten Tieren. Ebenso verursachte die Bestrahlung isoliert einen Anstieg der Wachstumsfraktion gegenüber der jeweiligen Vergleichsgruppe, der jedoch nicht durchgehend signifikant war.



**Abbildung 14: Immunhistochemische Detektion Ki67-positiver Zellen in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung:** Quantitative Bildauswertung mittels Zellzählung und Angabe relativer Fraktionen: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB) (A) Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der für Ki67-spezifischen Färbung an Hautschnitten von 14 µm Dicke, 100x Vergrößerung; (B) Statistische Auswertung der Akkumulation Ki67-positiver Zellen in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung, n = 7 Tiere, \*, p < 0,05 versus S, P; #, p < 0,05 versus S, P UVB; ■, p < 0,05 versus X, P UVB; •, p < 0,05 versus X, P.

### 7.1.8 Quantifizierung inflammatorischer Prozesse

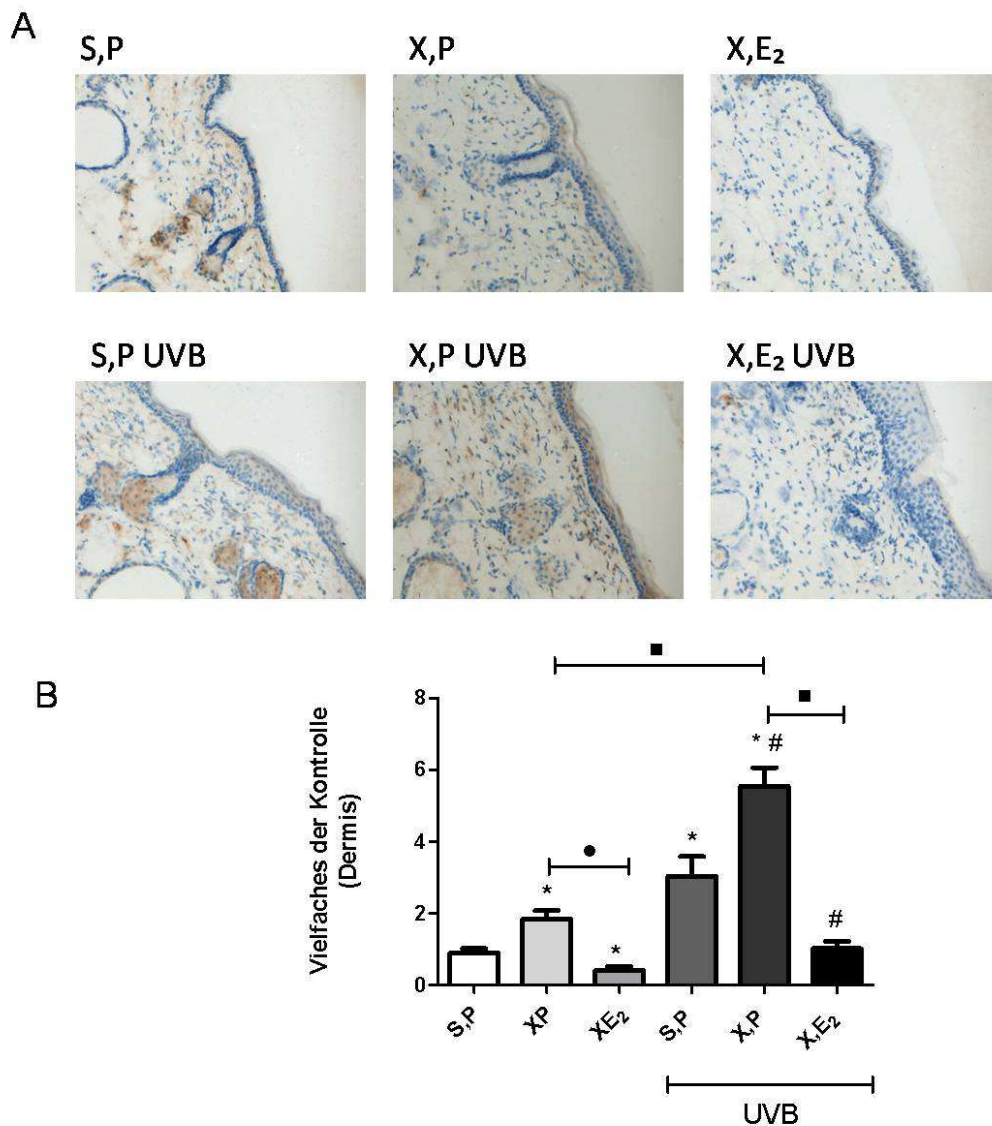
Mit dem Ziel, einen möglicherweise chronologischen Entzündungsverlauf innerhalb der Dermis zu charakterisieren wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem anti-Maus MAC-2-Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper bindet spezifisch an das 32.000 Dalton große Oberflächen-Antigen MAC-2 auf murinen Makrophagen und Langerhans-Zellen.

Unter intrinsischen Bedingungen und E<sub>2</sub>-Substitution war das Vorkommen dermalen Entzündungszellen nach 20 Wochen signifikant reduziert gegenüber ovariectomierten Tieren und Kontrollen (X, E<sub>2</sub> vs. X, P und S, P). Die X führte demgegenüber zu einem signifikant erhöhten Auftreten MAC-2-positiver Zellen innerhalb der papillären Dermis (X, P vs. S, P) (**Abb. 15**).

Unter extrinsischen Bedingungen zeigte sich bei den Kontrolltieren (S, P UVB) und den ovariectomierten Tieren (X, P UVB) nach 20-wöchiger Behandlung eine signifikante Zunahme inflammatorischer Zellen innerhalb der papillären Dermis gegenüber den jeweils nicht bestrahlten Gruppen (S, P und X, P). Eine derart erhöhte Akkumulation inflammatorischer Zellen war jedoch in UVB-exponierten und E<sub>2</sub>-substituierten Tieren nicht nachweisbar (X, E<sub>2</sub> vs. X, E<sub>2</sub> UVB). Die E<sub>2</sub>-Substitution führte hierbei im extrinsischen Verlauf der Hautalterung zu einer verminderten Akkumulation dermalen Entzündungszellen, deren Anzahl nach 20 Wochen signifikant unter der aller anderen bestrahlten Gruppen lag (X, E<sub>2</sub> UVB vs. S, P UVB und X, P UVB). Die X führte - wie im intrinsischen Zeitverlauf - nach 20 Wochen zu einer Enthemmung des Auftretens dermalen Entzündungszellen. Die Effekte von X und UVB-Exposition schienen sich dabei kumulativ auszuwirken, so dass die Gruppe X, P UVB quantitativ doppelt so viele Entzündungszellen aufwies wie alle anderen Versuchsgruppen (**Abb. 15**).

Neben den oben aufgeführten quantitativen Ergebnissen zeigten sich bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Präparate zudem vor allem im epidermopapillären Kompartiment morphologische Zeichen einer progredienten und inflammatorisch beeinflussten Hautalterung. So fiel in den mit UVB-bestrahlten Gruppen eine epidermale Hyperproliferation bis hin zur Akanthose als Regenerationsreaktion auf andauernde Entzündungsprozesse auf, wie von Böcker *et. al.* [77] beschrieben. Des Weiteren konnte nach 20 Wochen Bestrahlung bereits eine partielle Papillomatose im Sinne einer Vermehrung der dermalen Papillen beobachtet werden.



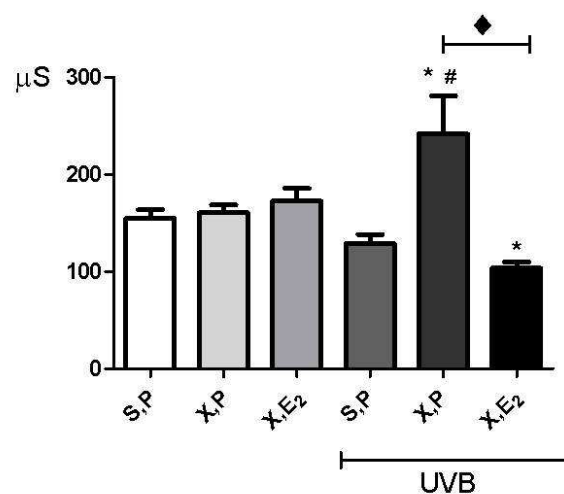


**Abbildung 15: Immunhistochemische Detektion MAC-2-positiver Zellen in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung:** Quantitative Bildauswertung mittels Zellzählung und Angabe absoluter Zellzahlen: Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); (A) Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahmen der für MAC-2-spezifischen Färbung an Hautschnitten von 14 µm Dicke, 100x Vergrößerung; (B) Statistische Auswertung der Akkumulation MAC-2-positiver Zellen in der papillären Dermis nach 20 -wöchiger Behandlung, n = 7 Tiere, \*, p < 0,05 versus S, P; #, p < 0,05 versus S, P UVB; ■, p < 0,05 versus X, P UVB; ●, p < 0,05 versus X, P.

## 7.2 Erfassung funktioneller Hautparameter

### 7.2.1 Feuchtigkeitsgehalt der Haut

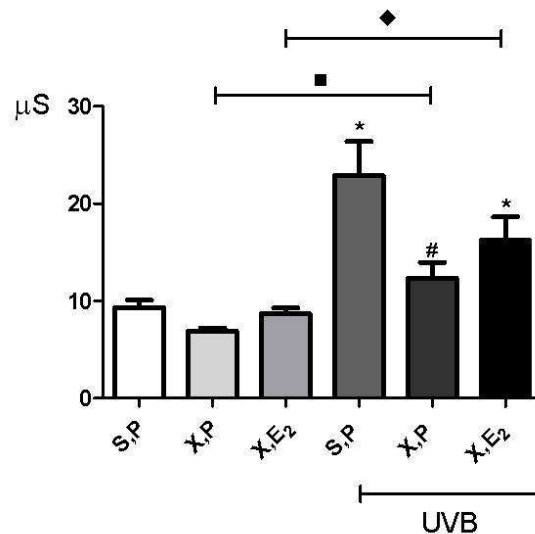
Als gängiger Indikator einer fortgeschrittenen Hautalterung wurde der Feuchtigkeitsgehalt der Haut über eine Erfassung der elektrischen Leitfähigkeit innerhalb der oberen Hautschichten bestimmt. Hierbei zeigte sich unter intrinsischen Bedingungen keine signifikante Veränderung des Hydratisierungsgrades. Weder die durchgeführte E<sub>2</sub>-Substitution, noch die X führten zu einem veränderten Feuchtigkeitsgehalt im Vergleich mit der Kontrollgruppe (S, P vs. X, P und S, P vs. X, E<sub>2</sub>). Demgegenüber führte die Beeinflussung des E<sub>2</sub>-Haushaltes unter UVB-Exposition zu uneinheitlichen Ergebnissen. Während die E<sub>2</sub>-substituierten Tiere und die Sham-operierten Tiere mit Placebo-Pellets mit einem tendenziell - jedoch nicht signifikant - erniedrigten Feuchtigkeitsgehalt assoziiert waren (X, E<sub>2</sub> vs. X, E<sub>2</sub> UVB und S, P vs. S, P UVB), führte die X zu einer Zunahme der Hydratisierung der Haut, sowohl gegenüber bestrahlten, als auch gegenüber unbestrahlten Sham-behandelten Tieren (X, P UVB vs. S, P UVB; X, P UVB vs. S, P). Zusammenfassend konnte somit kein einheitlicher Zusammenhang zwischen E<sub>2</sub> bzw. X und der Hydratisierung der Haut unter intrinsischen und extrinsischen Bedingungen in diesem Versuchsmodell detektiert werden (**Abb. 16**).



**Abbildung 16: Statistische Auswertung des Feuchtigkeitsgehaltes der Haut nach 20 -wöchiger Behandlung:** Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); Erfassung der elektrischen Leitfähigkeit in μS, n = 7 Tiere; \*, p < 0,05 versus S, P; ◆, p < 0,05 versus X, E<sub>2</sub> UVB; #, p < 0,05 versus S, P UVB.

### 7.2.2 Trans-epidermaler Wasserverlust

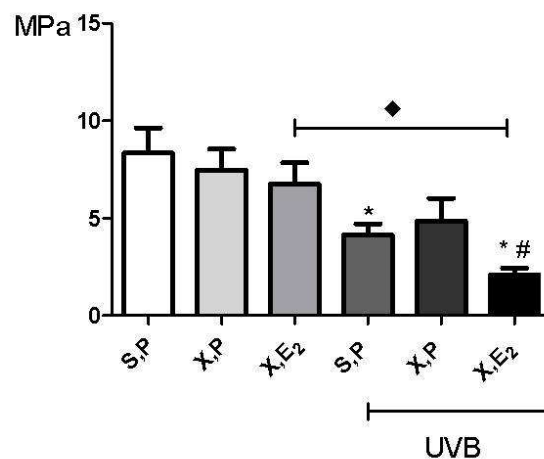
Durch Bestimmung des transepidermalen Wasserverlustes wurde ein funktionell korrespondierender Parameter zu dem bereits dargelegten Feuchtigkeitsgehalt der Haut analysiert. Im intrinsischen Prozess der Hautalterung stellten sich die nach 20 Wochen Behandlung detektierten Messwerte als reziprok zu den Ergebnissen der Erfassung des Feuchtigkeitsgehaltes dar. So hatten die E<sub>2</sub>-Substitution bzw. -Depletion keinen wesentlichen Einfluss auf den Wasserverlust der Haut. Demgegenüber führten jedoch sowohl die E<sub>2</sub>-Substitution, als auch die E<sub>2</sub>-Depletion im extrinsischen Prozess zu einer Verminderung des H<sub>2</sub>O-Verlustes durch Evaporation. Signifikante Unterschiede waren hierbei aber nur im Fall der ovariectomierten Tiere festzustellen (**Abb. 17**). Zusammenfassend zeigte sich also, dass die kutanen Wasserverluste von ovariectomierten Tieren (X, P und X, P UVB) und E<sub>2</sub>-substituierten Tieren unabhängig von intrinsischem oder extrinsischem Prozess der Hautalterung in der Tendenz - jedoch nicht signifikant - jeweils unter dem Kontrollniveau (S, P und S, P UVB) lagen. Ein eindeutig gegenläufiger Effekt einer E<sub>2</sub>-Substitution oder E<sub>2</sub>-Depletion war nicht zu proklamieren. Die UVB-Bestrahlung führte zudem zu einem signifikant erhöhten transepidermalen Wasserverlust aller UVB-exponierten Gruppen im Vergleich zu den jeweils nicht-bestrahlten Gruppen (**Abb. 17**).



**Abbildung 17: Statistische Auswertung des transepidermalen Wasserverlustes der Haut nach 20 - wöchiger Behandlung:** Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); Erfassung der elektrischen Leitfähigkeit in µS, n = 7 Tiere; \*, p < 0,05 versus S, P; ■, p < 0,05 versus X, P UVB; ◆, p < 0,05 versus X, E<sub>2</sub> UVB.

### 7.2.3 Dehnbarkeit der Haut

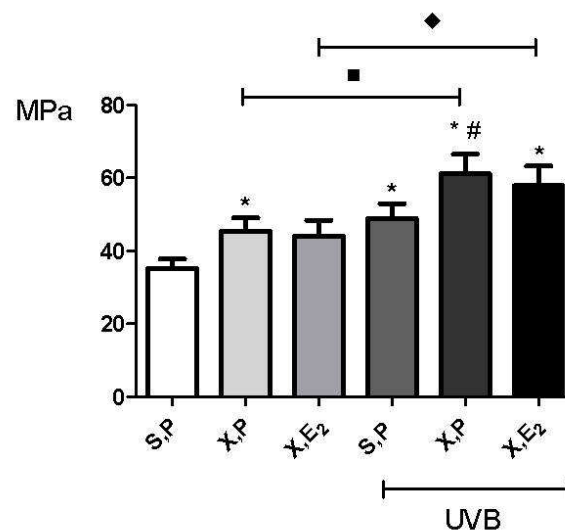
Die Dehnbarkeit der Haut wurde durch die Analyse der *Viskoelastizität* charakterisiert. Da das Vermögen der Haut zu Elevation und Retraktion, welche insgesamt betrachtet die Elastizität darstellen, letztendlich wesentlich vom Status der Hydratisierung abhängt, konnte somit ein weiterer funktionell wichtiger Parameter der Haut untersucht werden. Unter intrinsischen Bedingungen führten weder die X, noch die E<sub>2</sub>-Substitution zu einer signifikanten Veränderung der *Viskoelastizität* der Haut. Unter extrinsischen Bedingungen zeigte sich demgegenüber eine Verminderung der *Viskoelastizität* durch die E<sub>2</sub>-Substitution im Vergleich zur Kontrolle (S, P UVB vs. X, E<sub>2</sub> UVB) und den Sham-operierten Tieren mit Placebo-Pellet (S, P UVB). Die X führte im Umkehrschluss jedoch nicht zu einer signifikanten Zunahme der Elastizität (S, P vs. X, P UVB), so dass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen E<sub>2</sub>-Substitution bzw. E<sub>2</sub>-Depletion und der *Viskoelastizität* der Haut nicht nachgewiesen werden konnte (**Abb. 18**). Analog zu den Ergebnissen eines reduzierten Feuchtigkeitsgehaltes und erhöhten transepidermalen Wasserverlusten der Haut nach UVB-Bestrahlung (**Abb. 16 und 17**), war auch die *Viskoelastizität* nach 20 -wöchiger Behandlung der Tiere in allen UVB-exponierten Gruppen im Vergleich zu den jeweils nicht UVB-exponierten Gruppen – mit Ausnahme der ovariectomierten Tiere (X, P vs. X, P UVB) – signifikant reduziert. Insgesamt waren E<sub>2</sub>-bedingte Effekte uneinheitlich, während die UVB-Exposition zumindest in der Tendenz in allen bestrahlten Gruppen zu einer Verringerung der Elastizität geführt hat.



**Abbildung 18: Statistische Auswertung der Viskoelastizität der Haut nach 20 -wöchiger Behandlung:** Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB) ; Angabe in MPa, n = 7 Tiere; \*, p < 0,05 versus S, P; ◆, p < 0,05 versus X, E<sub>2</sub> UVB.

### 7.2.4 Dehnsteifigkeit der Haut

Als Gegenstück zur *Viskoelastizität* wurde die sogenannte *Dehnsteifigkeit* der Haut quantifiziert. Diese Kenngröße repräsentiert die Kraft, welche benötigt wird um die Haut anzuheben und gibt Auskunft über die Härte der oberen Hautschichten im Sinne eines klassischen Indikators einer progredienten Hautalterung. Im Prozess der intrinsischen Alterung zeigte sich hier eine signifikante Erhöhung der Hautsteifigkeit durch die X (S, P vs. X, P) (**Abb. 19**). Eine Beeinflussung der Dehnsteifigkeit durch die E<sub>2</sub>-Substitution ließ sich nicht validieren. Unter extrinsischen Bedingungen hatte die X ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf die *Dehnsteifigkeit* der Haut, welche durch die E<sub>2</sub>-Depletion signifikant erhöht wurde (S, P UVB vs. X, P UVB). Ein signifikanter Unterschied zwischen E<sub>2</sub>-substituierten Tieren und Kontrollen bestand auch unter extrinsischen Bedingungen nicht (S, P UVB vs. E<sub>2</sub> UVB). Zudem zeigte sich auf quantitativer Ebene erwartungsgemäß eine signifikant erhöhte Steifigkeit bzw. Härte der Haut in allen UVB-exponierten Gruppen im Vergleich zu den jeweils nicht-exponierten Versuchsgruppen (**Abb. 19**). Insgesamt wiesen UVB-exponierte und ovariectomierte Tiere so den höchsten und damit funktionell ungünstigsten Härtegrad aller Versuchsgruppen auf.



**Abbildung 19: Statistische Auswertung der Dehnsteifigkeit der Haut nach 20 -wöchiger Behandlung:** Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet (S,P), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet (X,P), Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet (X,E<sub>2</sub>); Sham-operierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (S,P UVB), Ovariectomierte Tiere mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition (X,P UVB) und Ovariectomierte Tiere mit E<sub>2</sub>-Pellet und UVB-Exposition (X,E<sub>2</sub> UVB); Angabe in MPa pro 1,5 mm Elevation, n = 7 Tiere; \*, p < 0,05 versus S, P; ■, p < 0,05 versus X, P UVB; ◆, p < 0,05 versus X, E<sub>2</sub> UVB.

## 8 Diskussion

### 8.1 Charakteristika der intrinsischen Hautalterung

#### 8.1.1 Verlust von Versikan bei konstantem Hyaluronsäuregehalt

HA gilt im Hinblick auf Elastizität, Feuchtigkeitsgehalt, Barrierefunktion und Interaktion mit anderen EZM-Komponenten als zentrales Molekül der intakten Dermis [3, 5]. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein im Vergleich zu Vorarbeiten [78] konstanter dermaler HA-Gehalt (S, P) der intrinsisch gealterten Haut, während von anderen Autoren ein HA-Verlust innerhalb dieses Zeitintervalls beschrieben wurde [79, 80]. Altersassoziierte Abnahmen des HA-Gehaltes könnten jedoch auf einer unterschiedlichen Extrahierbarkeit aus verschiedenen Geweben beruhen [81]. Zudem scheint die Versuchsdauer von Bedeutung zu sein, so dass die durchgeführte Behandlung von 20 Wochen zeitlich nicht ausreichend sein könnte um mögliche Veränderungen zu determinieren. So konnte beispielsweise in einer früheren Studie gezeigt werden, dass ein HA-Verlust z.B. im Modell der C57/BL6-Mäuse bis zu einem Lebensalter von 400 Tagen nicht zu erwarten ist [82]. Diese Ergebnisse könnten durch einen verlangsamt *HA-Turnover in der Dermis* im Vergleich zum schnellen, *epidermalen* Umsatz, bei verminderter Halbwertszeit des HA-Moleküls begründet sein [3]. Bekanntermaßen existieren eine enge Kopplung und Interaktion von VER und HA [17, 83]. Zudem kann VER über seine GAG-Seitenketten auch unabhängig von HA direkt an CD44 binden und so neben einer mechanischen Verbindung auch funktionell unmittelbar mit durch HA induzierten Effekten interferieren [84]. Das Ergebnis einer intrinsischen Abnahme der VER-Expression (S, P) im Vergleich zu Vorarbeiten [78] deckt sich mit Beobachtungen anderer Autoren [79, 85]. Auf der einen Seite fehlt der dermalen HA somit anteilig ein wesentlicher Interaktionspartner und auf der anderen Seite ist davon auszugehen, dass einem zu erwartenden chronischen HA-Verlust auch zeitlich ein Vorschub geleistet wird. Die Summe dieser Prozesse gefährdet letztlich die Integrität der dermalen EZM, da die Regulation zellulärer Prozesse sowie die übergeordnete EZM-Struktur gestört sind [86]. Zudem spielen auch Veränderungen des GAG-Musters der VER- Seitenketten eine Rolle. *Sorrell et al.* [87] stellten fest, dass - bei AK-Inkubation - bestimmte Epitope des VER-Moleküls in intrinsisch gealterter Haut eine verminderte Reaktivität zeigen. Dies lässt vermuten, dass neben einer verminderten Interaktion mit HA auch andere EZM-Moleküle vermindert gebunden werden und die direkte Interaktion mit Rezeptoren wie CD44 gestört ist.

#### 8.1.2 Konstanter Gehalt von Biglykan und Lumikan

Analog zu den experimentell erhobenen Ergebnissen wurde das Expressionsniveau von BGN während der intrinsischen Hautalterung - sowohl in vergleichbaren tierexperimentellen Modellen (C57/BL6-Mäuse), als auch innerhalb von Untersuchungen an humanen Gewebeproben - bereits von anderen

Autoren als weitgehend konstant bezeichnet [74, 82]. Ein BGN-Verlust konnte an humanen Gewebeproben erst im Alter von über 80 Jahren nachgewiesen werden [79]. Hierbei wird davon ausgegangen, dass Verluste großer Chondroitin-Sulfate wie VER den Verlust der kleinen Dermatan-Sulfate wie BGN überwiegen, so dass ein verschobenes Chondroitin-Sulfat - Dermatan-Sulfat Verhältnis anzunehmen ist [88]. Jedoch war es bisher weder möglich den exakten Zeitpunkt der Veränderung dieses Verhältnisses, noch dessen Konsequenzen für die dermale EZM zu ermitteln. Das Ausmaß möglicherweise intrinsisch relevanter Funktionsverluste - wie, die aus *BGN-Knockout-Modellen* bekannte mangelhafte Kollagenvernetzung, Hyperelastizität und erhöhte Zerreißbarkeit der Haut [89, 90] ist gegenwärtig unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Auch über altersinduzierte Veränderungen von LUM ist wenig bekannt. Es konnten jedoch eine verminderte mRNA-Expression, sowie ein reduziertes Vorkommen des *LUM-Core-Proteins* in der Dermis nachgewiesen werden [74], so dass generell von einer LUM-Reduktion im intrinsischen Verlauf ausgegangen wird. Während das *Core-Protein* in der Lage ist die Synthese von Kollagenen zu inhibieren, kommt es im Zuge des *Knock-Outs* im Mausmodell zur Enthemmung der kollagenen Fibrillogenese. Dermale Kollagenfibrillen sind massiv verdickt, abnorm konfiguriert und besonders subepithelial irregulär verteilt, was zu verbreiterten Spalträumen führt [91]. Dieser Kollagendefekt führt zu extrem weicher und fragiler Haut, deren Widerstandskraft um 80 - 90 % reduziert ist, was über den Spannungsverlusten liegt, die bei einem Mangel von anderen SLRP beschrieben wurden [92]. Es bleibt unklar, inwiefern der hier ermittelte intrinsische LUM-Gehalt dermale Dysfunktionen, wie eine fehlerhafte kollagene Synthese und abnorme dermale kollagene Netzwerke bedeuten könnte.

### 8.1.3 Zunahme kollagener Neoepitope bei konstantem Gesamtkollagen

Der Gehalt des dermalen Gesamtkollagens lag im Vergleich zu Vorarbeiten (10-wöchige Behandlung) auf einem konstanten Niveau [78]. Eine reduzierte Synthese der Kollagene, wie beschrieben [93], konnte somit nicht nachvollzogen werden. Dabei ist zu bedenken, dass ein Verlust dermalen Kollagene hauptsächlich auf zelluläre Faktoren zurückgeführt wird. So geht man davon aus, dass zum einen die Kapazität dermalen Fibroblasten zur Synthese im Alter abnimmt [93]. Zum anderen nimmt auch die Anzahl interstitieller Fibroblasten im Alter ab [94]. Diese Prozesse scheinen jedoch im Modell der *skh-1-Mäuse* bei einem Versuchszeitraum von 20 Wochen nur von begrenzter Bedeutung zu sein. So konnte mittels Ki67-Färbung gezeigt werden, dass die proliferative Aktivität dermalen Zellen im Vergleich zu Vorarbeiten [78] nicht abnimmt, sondern parallel zum Kollagengehalt konstant war. Demgegenüber führte der Nachweis von KF zu dem Ergebnis einer erhöhten Kollagenegradation im Vergleich zum Quantifizierungszeitpunkt nach 10 Wochen (eigene Vorarbeiten) [78]. Dieses Resultat entspricht der Ansicht, dass eine Degradation dermalen Kollagene obligater Teil der Hautalterung ist und einem physiologischen *Turnover* entspricht [50, 94]. Somit muss nicht zwingend ein pathologischer Prozess zu Grunde liegen und es ist denkbar, dass der Abbau von Kollagenen mit dem

Alter zwar zunimmt, aber nach 20 Wochen noch nicht ausreichend ist um den Gesamtgehalt des dermalen Kollagens zu verringern.

#### **8.1.4 Alterationen dermalen PG scheinen dem Kollagenverlust und funktionellen Einbußen im Verlauf der intrinsischen Hautalterung voraus zu gehen**

Sowohl die histologische als auch die funktionelle Analyse zeigten keine beschleunigte bzw. vorzeitige Hautalterung. Epidermis und Dermis wiesen eine reguläre Struktur auf, ohne - wie von anderen Autoren beobachtet - eine erhöhte Anzahl heterogen, dysmorph veränderter Zellen aufzuweisen [95, 96]. Weiterhin war weder die proliferative Aktivität dermalen Zellen reduziert, noch zeigten sich Veränderungen in der Menge MAC-2-positiver Zellen im Vergleich zu Vorarbeiten [78]. Somit scheint die intrinsische Hautalterung im Modell der skh-1-Mäuse nach 20 Wochen nicht mit einem Entzündungsprozess oder einer generalisiert verminderten Zellzahl in der Dermis einherzugehen. Bei Betrachtung der Verluste von VER - sowie der anzunehmenden gestörten Interaktion mit HA - war davon auszugehen, dass neben einer geringeren Hydratisierungsrate und erhöhtem Wasserverlust, die Elastizität der Haut vermindert ist [4, 10]. Dies lies sich anhand der erhobenen Hautparameter nicht nachvollziehen, da keine Ausgangswerte zur Verfügung standen. Insgesamt scheinen die dargestellten Alterationen der EZM-Komponenten den funktionellen und morphologischen Veränderungen zeitlich und möglicherweise auch kausal vorgeschaltet zu sein [97].

## **8.2 Charakteristika der extrinsischen Hautalterung**

### **8.2.1 Zunahme von Hyaluronsäure und Versikan**

Nach 20-wöchiger Behandlung lag der HA-Gehalt in der UVB-exponierten Kontrollgruppe (S, P UVB) über dem der nicht bestrahlten Kontrollen (S, P) und auch über dem der S, P UVB-Tiere nach 10-wöchiger Behandlung [78]. Dieser HA-Anstieg scheint jedoch ein transientes Phänomen [71] zu sein, ehe es zur Inhibition der HAS mRNA-Expression mit nachfolgender Reduktion des dermalen HA-Gehaltes kommt [10, 82]. Sowohl Ursache, als auch Effekte der passageren HA-Augmentation sind unklar. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß dermalen HA-Alterationen nach UVB-Exposition stellt die Tatsache dar, dass unterschiedliche Bestrahlungsprotokolle verwendet wurden, die sich in Dauer der Applikation, Dosis und Messintervallen unterschieden. Um valide Aussagen in Bezug auf Veränderungen des dermalen HA-Gehaltes im Zuge der extrinsischen Hautalterung treffen zu können, scheint es daher von Nöten zu sein zwischen akuten UVB-Effekten und Langzeitschäden durch UVB zu unterscheiden [98]. Die UVB-Bestrahlung führte zu einer erhöhten dermalen VER-Menge (S, P UVB) im Vergleich zu unbestrahlten Kontrolltieren (S, P). Dies ist konform mit Untersuchungen, welche ebenfalls einen extrinsisch gesteigerten VER-Gehalt nachweisen konnten, der mit einer *Stress-induzierten* Genexpression assoziiert war [85, 99]. In diesem Zusammenhang wird oftmals die sogenannte „*solare Elastosis*“, als morphologisches Korrelat einer



dermalen Akkumulation von ELA [100] und VER [17] in aktinisch geschädigter Haut erwähnt. Es ist somit zu unterstellen, dass extrinsisch gealterte Haut nicht von einem erhöhten VER-Gehalt profitieren kann. So wurde durch *Hasegawa et. al.* [101] gezeigt, dass über die durch UVB-Bestrahlung induzierte Expression von MMP-12 das N-terminale Ende des VER-Moleküls zerstört wird. In der Folge ist die Interaktion mit HA-Polymeren reduziert, was die Integrität der dermalen EZM schädigt. Interessanterweise ist diese Degradation nur im UVB-exponierten Modell irreversibel, während intrinsisch gealterte und N-terminal gespaltene VER-Moleküle eine Restfähigkeit zur HA-Bindung haben. Letztendlich könnte so weniger HA gebunden werden, was neben einer verminderten H<sub>2</sub>O-Speicherung und Störung der Diffusion von Nährstoffen und Metaboliten, die mechanische Integrität der EZM beeinflussen könnte. Es bleibt fraglich ob die extrinsische Zunahme des dermalen VER-Gehaltes stressinduziert ist [99], oder ob es sich um eine kompensatorische Hochregulation handelt.

### 8.2.2 Zunahme von Biglykan und Lumikan

Zum ersten Mal konnte hier gezeigt werden, dass die basal niedrige dermale BGN-Expression der *skh-1-Mäuse* durch UVB-Exposition gesteigert wird. Ausgehend von der Hypothese einer UVB-bedingten BGN-Induktion im Zuge entzündlicher Prozesse wurde bereits in Untersuchungen demonstriert, dass die BGN-Expression nicht konstitutiv erfolgt und zudem mit pathologischen Prozessen wie Gewebeläsionen assoziiert sein kann. So konnten *Wegrowski et. al.*[102] nachweisen, dass es sich bei dem BGN-Gen nicht um reguläres *house-keeping-Gen* mit kontinuierlicher Expression handelt. Stets ist eine spezifische Induktion der Transkription nötig, welche u.a. über die Bindung von IL-6, TNF- $\alpha$  und NF $\kappa$ B an Promotorregionen des BGN-Gens reguliert wird [103]. Bekanntermaßen stehen diese Zytokine und Transkriptionsfaktoren in Zusammenhang mit der Induktion und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse in diversen Geweben - unter anderem auch der Dermis - [104, 105]. *Podskochy et. al.*[106] präsentierten zudem Daten, welche belegen, dass die BGN-mRNA- Expression unter UV-Bestrahlung der Cornea zunahm, während die BGN-Expression in den Kontrollgruppen niedrig blieb. Diese Resultate lassen vermuten, dass die durchgeführte Bestrahlung möglicherweise unter Beteiligung der oben genannten Mediatoren eine Entzündung der Dermis verursacht und die BGN-Expression induziert. BGN ist selber wiederum in der Lage den Prozess der Inflammation aufrecht zu erhalten bzw. zu verstärken. Es konnte gezeigt werden, dass lösliche BGN-Moleküle an TLR-2 bzw. -4 auf Makrophagen binden und so die Expression von TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  und MIP-2 induzieren [107]. Unklar bleibt, inwiefern diese Ergebnisse auf extrinsisch gealterte Haut übertragbar sind und welche definitive Bedeutung akkumuliertes dermales BGN einnimmt. Interessant ist hierbei die Frage, ob und inwiefern UVB-Bestrahlung BGN-Moleküle aus dem festen Verbund mit Kollagenen lösen kann, und ob die Degradation von Kollagen ausreichend ist, um erhöhte Mengen an freiem/löslichen BGN mit den oben erwähnten Konsequenzen freizusetzen. Ein Zusammenhang zwischen UVB-Bestrahlung und Alterationen von LUM konnte bisher weder an *skh-1-Mäusen*, noch in einem anderen Versuchsmodell

experimentell evaluiert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass LUM in adulter Haut, neben der niedrig- und hochsulfatierten Form, in einer nichtsulfatierten Form vorliegt, welche exklusiv für dieses Organ ist und spezifische Aufgaben als lokales *Matrikin* übernimmt [108]. Darüber hinaus ist aus Untersuchungen an muriner Cornea bekannt, dass es im Rahmen pathologischer Läsionen zu einer Akkumulation von niedrigsulfatiertem LUM kommt [109]. Diese LUM-Moleküle sind proinflammatorisch. Sie rekrutieren Makrophagen in pathologisch veränderte Areale um dann deren Adhäsion über spezifische Rezeptoren zu fördern [109]. Analog zu Beschreibungen von *Kao et. al.* [29] hängt die Bedeutung von LUM im Rahmen pathologischer Prozesse somit unmittelbar mit seinem Sulfatierungsstatus zusammen. Aufgrund der angeführten Untersuchungen kann daher diskutiert werden, dass die beobachtete Akkumulation von LUM unter UVB-Exposition in erster Linie eine Zunahme nicht- oder niedrigsulfatierter Moleküle sein könnte. Dies könnte mit einem progredienten Entzündungsprozess korrelieren, der wiederum durch die Ergebnisse der durchgeführten Detektion MAC-2-positiver Zellen gestützt würde.

### 8.2.3 Kollagenfragmentierung

Die UVB-induzierte Degradation dermalen Kollagene mit der Folge einer irregulär konfigurierten EZM und assoziierten funktionellen Konsequenzen gilt als zentrales Element der extrinsischen Hautalterung [71] und ließ sich auch in den vorliegenden Experimenten zeigen. Es ist davon auszugehen, dass vor allem die Induktion der MMP 1-, 3-, 9- und 13- unter UVB-Exposition ursächlich von Bedeutung ist [110]. Die MMP-Spiegel steigen einerseits in direkter Antwort auf die Bestrahlung und andererseits im Zeitverlauf als ein prinzipielles Phänomen der Hautalterung [94]. *Dong. et. al.*[111] konnten zudem zeigen, dass UVB-induzierte DNA-Schäden in Keratinozyten zu einer Freisetzung bis dato unbekannter Mediatoren führen, welche die MMP-1 Sekretion in dermalen Fibroblasten induzieren. Die Reduktion funktionell intakter Kollagene wird zusätzlich aggraviert, da die dermalen Zellen nicht mehr in der Lage sind extrinsisch geschädigtes Kollagen „abzuräumen“ und durch neue Polymere zu ersetzen [48, 51]. Somit nimmt die Fragmentierung dermalen Kollagene zu, während die Synthesekapazität dermalen Fibroblasten unter UVB-Einfluss abnimmt [112]. Neben der verminderten Menge dermalen Gesamtkollagens konnte erwartungsgemäß [45, 113] parallel das erhöhte Auftreten kollagener Spaltprodukte eruiert werden. Diese KF führen dazu, dass die mit jeder UVB-Exposition wiederholten Schädigungen der dermalen Matrix nur unzureichend behoben werden [51, 63], da ein Kontakt von KF und Fibroblasten die Synthese der Prokollagene inhibiert [113], so dass eine Reparatur via Neusynthese *de facto* ineffektiv wird. Weiterhin ist bekannt, dass proteolytisch gewonnene KF zu einer starken Aktivierung von NFκB führen [114], wodurch die Freisetzung von MMP -1 und -3 induziert wird und Entzündungsmediatoren wie IL-1, IL-6 und TNF-α freigesetzt werden [105]. Insgesamt resultiert aus diesen Prozessen eine kumulative, irreversible Schädigung der dermalen kollagenen Matrix und ein sich selbst unterhaltender Zyklus aus MMP-Induktion und

Kollagendegradation ohne die Fähigkeit, die notwendigen Mechanismen von Reparatur und Neusynthese initiieren zu können.

### **8.2.4 UVB-Exposition führt zur Verminderung der Elastizität der Haut bei erhöhtem Wasserverlust und induziert einen kutanen Entzündungsprozess**

Die Analyse der Hautparameter ließ auf eine nachhaltige Störung der Integrität der Haut schließen. So führte die UVB-Exposition zu einer reduzierten Elastizität und erhöhter Dehnsteifigkeit, bei gleichzeitig gesteigertem TEWL der Haut. Analoge Ergebnisse wurden im Rahmen vergleichbarer Bestrahlungsintensitäten im Mausmodell beschrieben [115-117]. In weiteren Experimenten wurde zudem nachgewiesen, dass eine einmalige, kurzfristige Bestrahlung nicht ausreichend ist um den TEWL zu steigern, sondern dies nur über repetitive UVB-Exposition erreicht werden kann [118], was die Hypothese einer manifesten Schädigung nach 20-wöchiger Behandlung unterstützt. Trotz unverminderter Hydratisierungsrate und nicht reduziertem HA-Gehalt war die Haut nicht mehr in der Lage physiologisch ausreichende Mengen H<sub>2</sub>O zu speichern. In der Vergangenheit wurde dieser Effekt hauptsächlich auf eine durch UVB induzierte Störung der epidermalen Barrierefunktion zurückgeführt [119, 120]. Die Rolle der Dermis für die Barrierefunktion der Haut stand demgegenüber kaum im Fokus der Forschung. Interessanterweise konnten jedoch strukturelle und funktionelle Unregelmäßigkeiten im Bereich der dermo-epidermalen Verbindungszone und der Basallamina im Zuge der Hautalterung gezeigt werden [121], welche mit Ausnahme der Verluste von Kollagen Typ VII [43] und Fibrillinfasern [122] mechanistisch unklar sind. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob und in wie weit neben HA und VER auch BGN und LUM in die Prozesse der Regulation der Barrierefunktionen der Haut involviert sein könnten, da beide SLRP - wie unter (7.1.2 und 7.1.3, **Abb. 8 und 9**) beschrieben - insbesondere subepithelial und in der papillären Dermis nachgewiesen werden konnten, und ihre Akkumulation im extrinsischen Verlauf nachweislich modifiziert wurde. Entgegen der Ansicht, dass eine chronische UVB-Exposition mit einer Immunsuppression einhergeht [123], ist es mittlerweile akzeptiert, dass eine längerfristige UVB-Bestrahlung - wie die Akutexposition - zu einer kutanen Inflammation führt [43, 124]. So wurde eine Infiltration von Mastzellen, Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in die Dermis extrinsisch gealterter Mäuse nachgewiesen [75, 125-127]. Es ist denkbar, dass die Rekrutierung von Entzündungszellen die Struktur und Funktion von EZM-Molekülen unmittelbar beeinflusst [124]. Zudem sezernieren Mastzellen und Makrophagen weitere Entzündungsmediatoren (TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-6), die u.a. unter Beteiligung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B eine Modifikation verschiedener Komponenten der EZM bedingen können [105, 126, 128, 129]. Darüber hinaus wird die Synthese von Proteinase und MMP induziert, welche wiederum Kollagene und PG im Entzündungsgebiet degradieren [63, 124] und so die Hautalterung beschleunigen können.

### 8.3 Rolle von Östrogenen im zeitlichen Verlauf der Hautalterung

#### 8.3.1 Östrogen erhöht Hyaluronsäure und Versikan während intrinsischer und extrinsischer Hautalterung

Ein erhöhter dermaler HA-Gehalt unter E<sub>2</sub>-Substitution (7.1.1) wurde bereits mehrfach übereinstimmend beobachtet [61, 130]. Es ist davon auszugehen, dass E<sub>2</sub> die HA-Synthese über einen Eingriff in die transkriptionelle Regulation der HAS-Isoformen induziert, so dass ein paralleler Anstieg von HA und HAS-Expression eruiert wurde [61]. Einhergehend mit der Akkumulation von HA war die Dermis der E<sub>2</sub>-substituierten Tiere in den vorliegenden Untersuchungen sowohl unter intrinsischen, als auch unter extrinsischen Bedingungen durch eine erhöhte Anzahl proliferierender Zellen sowie einen erhöhten Kollagengehalt charakterisiert [12]. Demgegenüber führte die X zu einer Abnahme von dermalen HA, Gesamtkollagen und proliferativer Kapazität. Dies lässt vermuten, dass Veränderungen der erwähnten Parameter unmittelbar mit der Menge an HA assoziiert sein könnten. Es ist bekannt, dass HA-Verluste eine Störung des Stoff- und H<sub>2</sub>O-Transportes zwischen Dermis und Epidermis bedingen können, was in der Folge zu typischen Alterserscheinungen wie Faltenbildung und H<sub>2</sub>O-Verlust führt [10, 54]. Es kann diskutiert werden, dass die Haut der Mäuse von dem erhöhten HA-Gehalt und der Erhaltung der extrazellulären Mikroumgebung unter Behandlung mit E<sub>2</sub> prinzipiell „profitieren“ kann, auch wenn die Analyse der Hautparameter dies funktionell nicht widerspiegeln konnte. Interessanterweise scheint der E<sub>2</sub>-Effekt auf die HA-Synthese zusätzlich vom Faktor der Bestrahlung beeinflusst zu werden. So wiesen die Tiere mit E<sub>2</sub>-Substitution und UVB-Exposition den höchsten HA-Gehalt aller Gruppen auf. Es erscheint denkbar, dass speziell im Rahmen der extrinsischen Alterung die HA-Synthese hochreguliert wird um Schäden der dermalen EZM und ihrer Organisation zu reduzieren. So lies sich evaluieren, dass E<sub>2</sub> die Freisetzung von EGF aus Keratinozyten während der extrinsischen Hautalterung induziert, was dann wiederum die Menge an dermalem HA steigern kann [78, 131-134]. Darüber hinaus existieren Hinweise für eine wechselseitige Beeinflussung von HA und E<sub>2</sub>. Demzufolge induziert E<sub>2</sub> nicht nur die HA-Synthese, sondern HA bewirkt über CD44 und ERK2 eine Phosphorylierung und Aktivierung von E<sub>2</sub>-Rezeptoren, so dass E<sub>2</sub>-Effekte vermittelt bzw. verstärkt werden [135]. Sowohl intrinsisch als auch extrinsisch konnte eine gesteigerte Expression von VER demonstriert werden. Die isolierte UVB-Exposition führte ebenfalls zu einer Erhöhung des dermalen VER. Es kann spekuliert werden, dass VER - unter dem Einfluss der durch UVB vermehrt synthetisierten MMP - N-terminal degradiert wird, so dass die Fähigkeit zur direkten Interaktion mit HA irreversibel gestört ist [101]. In der Konsequenz ist von einem funktionellen VER-Verlust auszugehen. Unter dieser Annahme könnte eine E<sub>2</sub>-Substitution die Anzahl intakter VER-Moleküle erhöhen und die Integrität der HA-VER-Matrix bewahren [78, 134]. E<sub>2</sub> wurde als potenter Induktor der VER-Synthese in verschiedenen Geweben beschrieben [136], ohne dass bisher konkrete Daten im Zusammenhang mit der Hautalterung erhoben

wurden. Untersuchungen an Gewebeproben der Haut haben jedoch gezeigt, dass neben Interaktionen mit einer Vielzahl von EZM-Molekülen, v. a. die direkte Bindung von VER an HA-Moleküle von wesentlicher Bedeutung ist [31, 99]. Sie trägt zum Aufbau hochmolekularer EZM-Netzwerke und der Etablierung eines definierten perizellulären Milieus mit optimalen Bedingungen für zelluläre Prozesse bei [32, 137]. Zudem ist bekannt, dass VER auch direkt an den HA-Rezeptor CD44 binden kann und so zusätzlich die Integrität der HA-Matrix stabilisiert [84]. Darüber hinaus könnte VER in proliferative Prozesse innerhalb der Dermis involviert sein. In diesem Kontext wurde beschrieben, dass in stark proliferierenden Geweben - bedingt durch den Einfluss von Mediatoren wie PDGF und TGF- $\beta$  - eine gesteigerte VER-Expression zu erwarten ist [138]. Gleichzeitig fungiert VER selber als *Mitogen* und induziert proliferative Prozesse [139]. In der Konsequenz könnte die E<sub>2</sub>-induzierte VER-Synthese eine gesteigerte zelluläre Proliferation bedeuten, wie die Detektion Ki67-positiver Zellen nahe legt (**7.1.7, Abb. 14**). Es ist möglich, dass über eine Proliferationssteigerung einer zunehmenden zellulären Dysfunktion und damit einer Atrophie der Haut im Verlauf der extrinsischen [63, 127] bzw. intrinsischen Hautalterung [140] zumindest anteilig entgegengewirkt werden kann. Nichtsdestotrotz ist die Komplexität der Bedeutung dermalen VER-Moleküle in die Interpretation der beschriebenen Resultate einzubeziehen. Vor allem die wiederholt beschriebene Akkumulation von VER innerhalb entzündlicher Gewebsareale [32, 141], sowie im Zuge kutaner Tumorgenese [142] sind zu nennen und erfordern eine kritische Betrachtung der durch E<sub>2</sub>-vermittelten Erhöhung des dermalen VER-Gehaltes.

### **8.3.2 Östrogen erhöht Biglykan und Lumikan während intrinsischer und extrinsischer Hautalterung**

Durch die Substitution mit exogenem E<sub>2</sub> war es möglich eine Erhöhung von dermalem BGN und LUM zu validieren [131, 132]. Bezüglich der Rolle von BGN in der Haut wurden bislang jedoch weder ein möglicher Zusammenhang zwischen UVB und BGN, noch eine mögliche Interaktion zwischen E<sub>2</sub> und BGN untersucht. In Übereinstimmung mit der Literatur ist eine repetitive UVB-Exposition über einen Zeitraum der hier durchgeführten Bestrahlung als Auslöser einer kutanen Entzündung mit massiver Gewebeschädigung anzunehmen [63, 124]. Interessanterweise existieren jedoch Untersuchungen, in welchen eine erhöhte BGN-Expression nicht nur im Prozess der unmittelbaren Entzündung, sondern auch im Zuge nachfolgender Gewebereparaturen demonstriert werden konnte. Sowohl *Siméon et. al.* [143], als auch *Hunzelmann et. al.* [24] zeigten eine zeitlich verzögerte Zunahme von BGN nach willkürlicher Induktion von Gewebeerletzungen in dermalen Fibroblastenkulturen bzw. im Modell der Ratte. Diese Beobachtung ist vereinbar mit dem Ergebnis eines Anstieges von BGN nach 20-wöchiger Bestrahlung. Die Autoren gehen hierbei ursächlich von einer modifizierten EZM-Regulation aus. Demzufolge könnte es sich im Hinblick auf die extrinsische BGN-Akkumulation im Modell der skh-1-Mäuse nicht nur um eine Beteiligung an Entzündungsvorgängen, sondern auch um Prozesse der Gewebereparatur und -Regeneration handeln. Weiterhin ist bekannt, dass BGN-Moleküle über eine

spezifische Bindungsstelle die dermalen Hauptkollagene Typ I und III binden und so die Stabilität der EZM beeinflussen [20]. Diese Tatsache und der Nachweis einer  $E_2$  induzierten Kollagensynthese [41, 60] legen einen Zusammenhang zwischen Kollagengehalt und BGN-Synthese unter  $E_2$ -Einfluss im Verlauf der Hautalterung nahe. Zudem konnte in anderen Geweben eine Augmentation von BGN durch Applikation von  $E_2$  nach X demonstriert werden [144]. Ob und inwiefern die Dermis von dem erhöhten BGN-Gehalt profitiert, ist fraglich. In der Theorie könnte die Induktion der BGN-Expression durch  $E_2$  zumindest dem beschriebenen intrinsischen BGN-Verlust entgegenwirken und so die Struktur und Funktion der dermalen EZM positiv beeinflussen [79, 89]. Neben BGN wurde mit LUM ein weiteres Zielmolekül östrogenen Wirkungen detektiert. So führte die  $E_2$ -Substitution unter intrinsischen Bedingungen zu einem Anstieg von LUM und erhöhte das extrinsisch augmentierte LUM noch weiter. Zwar wurde eine Reduktion der dermalen LUM-Expression durch X von *Markiewicz et. al.* [70] validiert, jedoch existieren nur wenige experimentelle Daten bezüglich möglicher Zusammenhänge von LUM, UVB und  $E_2$  im Rahmen der Hautalterung. Interessanterweise konnte vor kurzem demonstriert werden, dass die Interaktion von LUM mit Kollagenfasern nicht nur auf einer direkten Bindung und Kontrolle von Fibrillogenese und struktureller Kollagenanordnung beruht [145], sondern über diese Interaktion zudem protektive Aufgaben übernommen werden. LUM-Moleküle können dimerisieren und sitzen in dieser stabilen Konformation den Fibrillen vom Typ I und II direkt auf. Dies führt dazu, dass Kollagene durch sterische Abschirmung vor der Proteolyse durch MMP-1 und -13 geschützt sind [146]. Da die Dermis hauptsächlich aus Typ I Kollagen besteht [17] und bei *skh-1*-Mäusen die kritische Hochregulation von MMP-1 und -13 im Rahmen der extrinsischen Hautalterung bekannt ist [45], könnte die  $E_2$ -vermittelte Erhöhung des dermalen LUM in diesem Zusammenhang einen effektiven Schutzmechanismus darstellen. Darüber hinaus wurde bereits - ähnlich der Rolle von BGN - von einer reaktiven LUM-Erhöhung im Rahmen von Wundheilungsvorgängen und damit assoziierter zellulärer Proliferation berichtet [29]. Analog dazu wurde eine durch  $E_2$ -vermittelte Förderung der kutanen Wundheilung durch beschleunigte EZM-Deposition nachgewiesen [60]. Möglicherweise sind LUM und BGN hierbei kausal involviert, da dass unter  $E_2$ -Einfluss sezernierte TGF- $\beta$  [147] die Synthese beider Moleküle induzieren kann und in Modellversuchen humaner Wundheilungsprozesse parallel zu den zwei genannten SLRP in erhöhtem Maß nachgewiesen werden konnte [148]. Neben reparativen und protektiven Effekten von BGN und LUM darf die pro-inflammatorische Funktion dieser zwei Moleküle, die vermutlich extrinsisch von Bedeutung ist [107, 109], nicht außer Acht gelassen werden. Unter Substitution mit  $E_2$  kam es jedoch nicht zu einer vermehrten Rekrutierung von Entzündungszellen in die Dermis, so dass in dem beschriebenen Versuchsaufbau eine Stimulation pro-inflammatorischer Effekte durch die SLRP bei gleichzeitiger  $E_2$ -Applikation nicht anzunehmen ist.

### **8.3.3 Östrogen steigert den dermalen Gesamtkollagengehalt und inhibiert dermale Kollagenfragmentierung**

Ein stimulierender Einfluss von  $E_2$  auf den dermalen Kollagengehalt konnte wiederholt gezeigt werden [56, 149]. Auch innerhalb der vorliegenden Experimente war das exogen applizierte  $E_2$  in der Lage dermalen Gesamtkollagen sowohl unabhängig von UVB, als auch bei Bestrahlung zu erhöhen (7.1.5 und 7.1.6) und so einer Abnahme der Hautdicke und anzunehmenden assoziierten funktionellen Verlusten [54] entgegen zu wirken. Prinzipiell sind zwei Mechanismen denkbar, welche zu einer Augmentation dermalen Kollagene führen könnten: Eine gesteigerte Neusynthese [57], sowie eine Inhibition der Proteolyse durch MMP [55]. Untersuchungen von *Rittié et. al.* [57] legen nahe, dass im Verlauf der intrinsischen Alterung v.a. die Neusynthese von Bedeutung ist. So konnte bei humanen Probanden bereits nach wenigen Tagen  $E_2$ -Applikation eine erhöhte Expression der Prokollagene Typ I und III nachgewiesen werden, während zu diesem Zeitpunkt noch kein diesbezüglicher Effekt im extrinsischen Verlauf evaluiert wurde. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass über eine durch  $E_2$ -induzierte Inhibition der MMP-Aktivität das Auftreten von dermalen KF vermindert werden kann [55, 60]. Auch dieser Effekt lies sich validieren. Auffällig war hierbei eine mehrwöchige Latenzzeit. Erst zum Quantifizierungszeitpunkt nach 20 Wochen war die Akkumulation von dermalen KF im Vergleich zu Voruntersuchungen (10-wöchige Behandlung, Daten nicht gezeigt) reduziert. Auch der Gesamtkollagengehalt war erst nach 20 Wochen erhöht. Dies legt einen möglicherweise kausalen Zusammenhang zwischen  $E_2$ , Kollagen-Gehalt und -Degradation nahe und unterstützt die Theorie einer untergeordneten Bedeutung der Neusynthese im Verlauf der extrinsischen Hautalterung [57]. KF können zudem eine Hemmung der HA-Synthese durch Herabregulation der HAS-2 Expression bewirken [114]. Somit ist denkbar, dass beschriebene Verluste dermalen HA - zumindest teilweise - auch über eine, UVB-induziert erhöhte MMP-Aktivierung und Kollagenfragmentierung mit Inhibition der HA-Synthese vorangetrieben werden könnten. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente weisen darauf hin, dass diese Prozesse durch  $E_2$ -Substitution verhindert bzw. verlangsamt werden könnten. Zusammenfassend erlauben die beschriebenen Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass der Abnahme des Kollagengehaltes und damit assoziierter Atrophie der Haut im intrinsischen Prozess der Hautalterung [40] durch eine via  $E_2$ -Substitution induzierte gesteigerte Neusynthese entgegengewirkt werden kann, während unter UVB-Exposition und ausgedehnter Proteolyse von Kollagen [150] vermutlich die Inhibition der MMP im Vordergrund steht.

### **8.3.4 Östrogen wirkt anti-inflammatorisch und fördert dermale zelluläre Proliferation**

Veränderungen der proliferativen Kapazität dermalen Zellen, sowie die Rekrutierung von Entzündungszellen sind zum einen entscheidende Begleitfaktoren altersassoziierten Veränderungen und zum anderen durch  $E_2$  beeinflusste Prozesse [54, 60]. In der Vergangenheit konnte der Einfluss von  $E_2$  hauptsächlich auf die Proliferation epidermaler Zellen nachgewiesen werden [60], während der

Fokus - innerhalb der Dermis - eher auf Modifikationen der Synthese von HA und Kollagen, als auf Veränderungen der numerischen Zellzahl bzw. proliferativen Prozessen lag [151]. Sowohl während intrinsischer, als auch während extrinsischer Hautalterung führte die E<sub>2</sub>-Applikation zu einer erhöhten Fraktion proliferierender Zellen in der Dermis. Dies könnte einem numerischen Verlust dermalen Fibroblasten und nachlassender Synthesekapazität während der intrinsischen Hautalterung entgegen wirken [140]. Bezüglich des Proliferationsmusters im Zuge extrinsischer Schädigungen konnte kein generalisierter Zellverlust gezeigt werden [40, 43]. Es wurde vielmehr eine Erhöhung der Fibroblastenzahl mit modifiziertem Phänotyp, veränderten biosynthetischen Eigenschaften und verminderter Adhärenz an EZM-Moleküle beschrieben [152]. Es ist denkbar, dass E<sub>2</sub> nicht nur die Anzahl dermalen Fibroblasten erhöht, sondern möglicherweise auch die Menge funktionell intakter Zellen im extrinsischen Verlauf steigern kann. Letztendlich sind zelluläre Proliferation und Synthese von EZM-Komponenten unter E<sub>2</sub>-Einfluss als sich gegenseitig beeinflussende Vorgänge zu verstehen [54]. So kann E<sub>2</sub> *in vivo* und *in vitro* - u.a. in dermalen Fibroblasten - die Freisetzung von TGF- $\beta$  induzieren [153], was zu einer gesteigerten Synthese von HA, BGN, LUM und Kollagen führen kann [103, 154-156]. Bei Applikation von E<sub>2</sub> und TGF- $\beta$ -Antagonisten *in vitro* blieb der Effekt auf die EZM-Synthese weitestgehend aus, was auf eine wesentliche Bedeutung der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion in diesem Zusammenhang hinweist [157]. Auf der anderen Seite sind die oben erwähnten EZM-Moleküle in der Lage reziprok die Proliferation von dermalen Fibroblasten zu stimulieren [12, 29, 32]. Diverse Untersuchungen konnten anti-inflammatorische Effekte von E<sub>2</sub> in der Haut zeigen [33, 60]. Einhergehend mit diesen Resultaten wies die Dermis im Zuge der E<sub>2</sub>-Substitution eine verminderte Anzahl MAC-2-positiver Zellen auf. Im Gegensatz dazu führte die X zu einer gesteigerten zellulären Infiltration. Dies könnte u.a. durch eine Beeinflussung der Zytokinmuster von Fibroblasten und Entzündungszellen bedingt sein und über den ER- $\beta$ -Rezeptor vermittelt werden [78, 158]. Kanda *et al.* [60] konnten zeigen, dass E<sub>2</sub> die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (u.a. CXCL-8, CXCL-10, CLL-5, IL-12) inhibiert, die APC-Aktivität senkt und die Freisetzung von immunsupprimierendem IL-10 verstärkt. Darüber hinaus ist bekannt, dass E<sub>2</sub> die NF $\kappa$ B-Produktion muriner Makrophagen hemmt [159], was neben einer verminderten Sekretion von Entzündungsmediatoren die MMP-Aktivität senken und so zu einer gesteigerten HA-Synthese führen könnte. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass makroskopisch intakt erscheinende, aber extrinsisch gealterte Haut bereits von Entzündungszellen infiltriert ist und morphologisch-histologische Anzeichen einer chronischen Inflammation aufweist, was nach X noch ausgeprägter war [124]. Folglich ist die Rekrutierung von Entzündungszellen als frühes Ereignis im Prozess der aktinischen Schädigung anzusehen und die im Zuge der MAC-2-Detektion erhobenen Ergebnisse deuten in diesem Kontext an, dass E<sub>2</sub> eine Progression der Hautalterung potentiell effektiv verhindern könnte.



## 9 Schlussfolgerungen

Vergangene Arbeiten [63, 160] haben gezeigt, dass Alterationen der dermalen EZM eine Schlüsselrolle in der Pathogenese und Progression der Hautalterung spielen. So liegen sowohl der intrinsischen/chronologischen, als auch der extrinsischen/aktinischen Hautalterung histologische und ultrastrukturelle Veränderungen definierter PG und Kollagene zugrunde. In der vorliegenden Studie konnten zum ersten Mal systematische Zusammenhänge zwischen verschiedenen Spiegeln des Hormons E<sub>2</sub> und altersassoziierten EZM-Modifikationen aufgezeigt werden. So führte E<sub>2</sub> zu einer gesteigerten Synthese diverser Matrixkomponenten (HA, BGN, LUM, VER, Kollagen), bei antiinflammatorischen Effekten, gesteigerter Proliferation und Inhibition der Entstehung von Kollagenfragmenten. Es ist anzunehmen, dass somit der Status sowohl intrinsisch, als auch extrinsisch gealterter Haut verbessert wird. Interessanterweise werden im Rahmen diverser *anti-aging-Konzepte* HA und Kollagene inzwischen sowohl intrakutan injiziert, als auch topisch aufgetragen ohne deren genaue Rolle während der Hautalterung zu kennen. Analog dazu haben Studien wie die *Women`s-Health-Initiative Studie* (WHI) [161] und die *Million-Women Studie* [162] gezeigt, dass eine hochdosierte perorale Behandlung mit E<sub>2</sub> im Rahmen einer Hormonersatztherapie (HRT) nicht durchgeführt werden sollte, da sie die Inzidenz von Mammakarzinomen, Herzinfarkten und Schlaganfällen erhöhen. Die vorliegende Arbeit und die durchgeführte systemische Behandlung mit E<sub>2</sub> sind daher als grundlagenwissenschaftliche Ansätze zu verstehen, auf deren Basis in Zukunft eine transdermale bzw. lokale Applikation von E<sub>2</sub> als therapeutische Option in Betracht gezogen werden könnte, falls die in dieser Arbeit untersuchten, durch E<sub>2</sub> induzierten Effekte auf die EZM der Haut eine klare Verbesserung der im Rahmen der Hautalterung auftretenden destruktiven Effekte zeigen. Dies bleibt zumindest bei Betrachtung der hautphysiologischen Parameter nach 20-wöchiger E<sub>2</sub>-Substitution fraglich und erfordert weitere Untersuchungen. Nichtsdestotrotz scheint es im Gegensatz zur systemischen Therapie bei einer transdermalen Anwendung von E<sub>2</sub> keinen hepatischen „*first-pass-Effekt*“ mit konsekutiver Induktion von Gerinnungsfaktoren in der Leber zu geben [163]. Dies könnte einer der Faktoren sein, der eine topische und ggfs. auch längerfristige E<sub>2</sub>-Anwendung aufgrund fehlender unerwünschter systemischer Nebenwirkungen in Zukunft attraktiv und sinnvoll macht.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Welsch, U., *Lehrbuch Histologie*. 3. ed. Vol. 3. 2010, München: Elsevier. 596.
2. Iozzo, R.V., *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 609-52.
3. Stern, R., *Complicated hyaluronan patterns in skin: enlightenment by UVB?* *J Invest Dermatol*, 2007. **127**(3): p. 512-3.
4. Tammi, R., et al., *Hyaluronan synthase induction and hyaluronan accumulation in mouse epidermis following skin injury*. *J Invest Dermatol*, 2005. **124**(5): p. 898-905.
5. Berthel, U. and S. Hellstrom, *The distribution of hyaluronan in human skin and mature, hypertrophic and keloid scars*. *Br J Plast Surg*, 1994. **47**(7): p. 483-9.
6. Knudson, W., et al., *CD44-anchored hyaluronan-rich pericellular matrices: an ultrastructural and biochemical analysis*. *Exp Cell Res*, 1996. **228**(2): p. 216-28.
7. Fraser, J.R., T.C. Laurent, and U.B. Laurent, *Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover*. *J Intern Med*, 1997. **242**(1): p. 27-33.
8. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.
9. Jiang, D., J. Liang, and P.W. Noble, *Hyaluronan in tissue injury and repair*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 435-61.
10. Manuskhatti, W. and H.I. Maibach, *Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging*. *Int J Dermatol*, 1996. **35**(8): p. 539-44.
11. Toole, B.P., T.N. Wight, and M.I. Tammi, *Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(7): p. 4593-6.
12. Yoneda, M., et al., *Hyaluronic acid modulates proliferation of mouse dermal fibroblasts in culture*. *J Cell Sci*, 1988. **90 ( Pt 2)**: p. 265-73.
13. Toole, B.P., *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(7): p. 528-39.
14. Stern, R., *Hyaluronan catabolism: a new metabolic pathway*. *Eur J Cell Biol*, 2004. **83**(7): p. 317-25.
15. Noble, P.W., *Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair*. *Matrix Biol*, 2002. **21**(1): p. 25-9.
16. Burgeson, R.E., *Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa*. *J Invest Dermatol*, 1993. **101**(3): p. 252-5.
17. Bernstein, E.F. and J. Uitto, *The effect of photodamage on dermal extracellular matrix*. *Clin Dermatol*, 1996. **14**(2): p. 143-51.
18. Burgeson, R.E., et al., *The structure and function of type VII collagen*. *Ann N Y Acad Sci*, 1990. **580**: p. 32-43.
19. Hocking, A.M., T. Shinomura, and D.J. McQuillan, *Leucine-rich repeat glycoproteins of the extracellular matrix*. *Matrix Biol*, 1998. **17**(1): p. 1-19.
20. Iozzo, R.V., *The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1997. **32**(2): p. 141-74.
21. Ameye, L. and M.F. Young, *Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases*. *Glycobiology*, 2002. **12**(9): p. 107R-16R.
22. Bianco, P., et al., *Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues*. *J Histochem Cytochem*, 1990. **38**(11): p. 1549-63.

23. Hunzelmann, N., et al., *Altered immunohistochemical expression of small proteoglycans in the tumor tissue and stroma of basal cell carcinoma*. J Invest Dermatol, 1995. **104**(4): p. 509-13.
24. Hunzelmann, N., et al., *Co-ordinate induction of collagen type I and biglycan expression in keloids*. Br J Dermatol, 1996. **135**(3): p. 394-9.
25. Corsi, A., et al., *Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(7): p. 1180-9.
26. Antonsson, P., D. Heinegard, and A. Oldberg, *Structure and deduced amino acid sequence of the human fibromodulin gene*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1174**(2): p. 204-6.
27. Chakravarti, S. and T. Magnuson, *Localization of mouse lumican (keratan sulfate proteoglycan) to distal chromosome 10*. Mamm Genome, 1995. **6**(5): p. 367-8.
28. Chakravarti, S., et al., *Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican*. J Cell Biol, 1998. **141**(5): p. 1277-86.
29. Kao, W.W., et al., *Focus on molecules: lumican*. Exp Eye Res, 2006. **82**(1): p. 3-4.
30. Zimmermann, D.R. and E. Ruoslahti, *Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican*. EMBO J, 1989. **8**(10): p. 2975-81.
31. Wu, Y.J., et al., *The interaction of versican with its binding partners*. Cell Res, 2005. **15**(7): p. 483-94.
32. Wight, T.N., *Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 617-23.
33. Aspberg, A., et al., *Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican*. J Biol Chem, 1999. **274**(29): p. 20444-9.
34. Isogai, Z., et al., *Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4565-72.
35. Ito, K., et al., *Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing*. J Biol Chem, 1995. **270**(2): p. 958-65.
36. Zimmermann, D.R., et al., *[Expression of the extracellular matrix proteoglycan, versican, in human skin]*. Verh Dtsch Ges Pathol, 1994. **78**: p. 481-4.
37. Rattan, S.I., *Aging, anti-aging, and hormesis*. Mech Ageing Dev, 2004. **125**(4): p. 285-9.
38. Roshan, S., S. Nader, and P. Orlander, *Review: Ageing and hormones*. Eur J Clin Invest, 1999. **29**(3): p. 210-3.
39. Lock-Andersen, J., et al., *Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 1997. **13**(4): p. 153-8.
40. Uitto, J., *Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin*. Dermatol Clin, 1986. **4**(3): p. 433-46.
41. Sator, P.G., et al., *Skin aging and sex hormones in women -- clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy*. Exp Dermatol, 2004. **13 Suppl 4**: p. 36-40.
42. Oikarinen, A., *The aging of skin: chronoaging versus photoaging*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 1990. **7**(1): p. 3-4.
43. Wlaschek, M., et al., *Solar UV irradiation and dermal photoaging*. J Photochem Photobiol B, 2001. **63**(1-3): p. 41-51.
44. Fisher, G.J., et al., *Mechanisms of photoaging and chronological skin aging*. Arch Dermatol, 2002. **138**(11): p. 1462-70.
45. Brennan, M., et al., *Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin*. Photochem Photobiol, 2003. **78**(1): p. 43-8.

46. Scharffetter-Kochanek, K., et al., *Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms*. *Exp Gerontol*, 2000. **35**(3): p. 307-16.
47. Bruls, W.A., H. van Weelden, and J.C. van der Leun, *Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose*. *Photochem Photobiol*, 1984. **39**(1): p. 63-7.
48. Talwar, H.S., et al., *Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin*. *J Invest Dermatol*, 1995. **105**(2): p. 285-90.
49. Yamauchi, M., et al., *Collagen cross-linking in sun-exposed and unexposed sites of aged human skin*. *J Invest Dermatol*, 1991. **97**(5): p. 938-41.
50. Fligiel, S.E., et al., *Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro*. *J Invest Dermatol*, 2003. **120**(5): p. 842-8.
51. Varani, J., et al., *Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro*. *Am J Pathol*, 2001. **158**(3): p. 931-42.
52. Werth, V.P., et al., *Elastic fiber-associated proteins of skin in development and photoaging*. *Photochem Photobiol*, 1996. **63**(3): p. 308-13.
53. Chanda, S., et al., *17beta-estradiol and ICI-182780 regulate the hair follicle cycle in mice through an estrogen receptor-alpha pathway*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. **278**(2): p. E202-10.
54. Verdier-Sevrain, S., F. Bonte, and B. Gilchrist, *Biology of estrogens in skin: implications for skin aging*. *Exp Dermatol*, 2006. **15**(2): p. 83-94.
55. Tsukahara, K., et al., *Ovariectomy is sufficient to accelerate spontaneous skin ageing and to stimulate ultraviolet irradiation-induced photoageing of murine skin*. *Br J Dermatol*, 2004. **151**(5): p. 984-94.
56. Brincat, M., et al., *Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy*. *Obstet Gynecol*, 1987. **70**(1): p. 123-7.
57. Rittie, L., et al., *Induction of collagen by estradiol: difference between sun-protected and photodamaged human skin in vivo*. *Arch Dermatol*, 2008. **144**(9): p. 1129-40.
58. Affinito, P., et al., *Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen*. *Maturitas*, 1999. **33**(3): p. 239-47.
59. Sauerbronn, A.V., et al., *The effects of systemic hormonal replacement therapy on the skin of postmenopausal women*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2000. **68**(1): p. 35-41.
60. Kanda, N. and S. Watanabe, *Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology*. *J Dermatol Sci*, 2005. **38**(1): p. 1-7.
61. Uzuka, M., et al., *The mechanism of estrogen-induced increase in hyaluronic acid biosynthesis, with special reference to estrogen receptor in the mouse skin*. *Biochim Biophys Acta*, 1980. **627**(2): p. 199-206.
62. Zouboulis, C.C. and A. Boschnakow, *Chronological ageing and photoageing of the human sebaceous gland*. *Clin Exp Dermatol*, 2001. **26**(7): p. 600-7.
63. Fisher, G.J., et al., *Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light*. *N Engl J Med*, 1997. **337**(20): p. 1419-28.
64. Brincat, M.P., *Hormone replacement therapy and the skin*. *Maturitas*, 2000. **35**(2): p. 107-17.
65. Shah, M.G. and H.I. Maibach, *Estrogen and skin. An overview*. *Am J Clin Dermatol*, 2001. **2**(3): p. 143-50.
66. Benavides, F., et al., *The hairless mouse in skin research*. *J Dermatol Sci*, 2009. **53**(1): p. 10-8.
67. Various, <http://www.cortex.dk/RESEARCHequip.htm>. 2000.

68. Puchtler, H., F.S. Waldrop, and L.S. Valentine, *Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA*. Beitr Pathol, 1973. **150**(2): p. 174-87.
69. Bulut, E. and B. Sahin, *A new method of assessing the size of mandibular cysts on orthopantomograms: projection area fraction*. J Craniofac Surg, 2009. **20**(6): p. 2020-3.
70. Markiewicz, M., et al., *Distinct effects of gonadectomy in male and female mice on collagen fibrillogenesis in the skin*. J Dermatol Sci, 2007. **47**(3): p. 217-26.
71. Schwartz, E., *Connective tissue alterations in the skin of ultraviolet irradiated hairless mice*. J Invest Dermatol, 1988. **91**(2): p. 158-61.
72. Chakravarti, S., et al., *Collagen fibril assembly during postnatal development and dysfunctional regulation in the lumican-deficient murine cornea*. Dev Dyn, 2006. **235**(9): p. 2493-506.
73. Neame, P.J., et al., *Independent modulation of collagen fibrillogenesis by decorin and lumican*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(5): p. 859-63.
74. Vuillermoz, B., et al., *Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2005. **277**(1-2): p. 63-72.
75. Fisher, G.J., et al., *Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 335-9.
76. du Manoir, S., et al., *Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment*. Cytometry, 1991. **12**(5): p. 455-63.
77. Böcker, W., *Pathologie*. 17. ed. 2008, München: Urban & Fischer Verlag.
78. Röck, K., et al., *Estradiol protects the dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging by release of epidermal growth factor from keratinocytes*. J Biol Chem, 2012
79. Carrino, D.A., J.M. Sorrell, and A.I. Caplan, *Age-related changes in the proteoglycans of human skin*. Arch Biochem Biophys, 2000. **373**(1): p. 91-101.
80. Ghersetich, I., et al., *Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging*. Int J Dermatol, 1994. **33**(2): p. 119-22.
81. Meyer, L.J. and R. Stern, *Age-dependent changes of hyaluronan in human skin*. J Invest Dermatol, 1994. **102**(3): p. 385-9.
82. Dai, G., et al., *Chronic ultraviolet B irradiation causes loss of hyaluronic acid from mouse dermis because of down-regulation of hyaluronic acid synthases*. Am J Pathol, 2007. **171**(5): p. 1451-61.
83. Bernstein, E.F., et al., *Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans*. Br J Dermatol, 1996. **135**(2): p. 255-62.
84. Kawashima, H., et al., *Binding of a large chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan, versican, to L-selectin, P-selectin, and CD44*. J Biol Chem, 2000. **275**(45): p. 35448-56.
85. Bernstein, E.F., et al., *Differential expression of the versican and decorin genes in photoaged and sun-protected skin. Comparison by immunohistochemical and northern analyses*. Lab Invest, 1995. **72**(6): p. 662-9.
86. Toole, B.P., *Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins*. Curr Opin Cell Biol, 1990. **2**(5): p. 839-44.
87. Sorrell, J.M., D.A. Carrino, and A.I. Caplan, *Structural domains in chondroitin sulfate identified by anti-chondroitin sulfate monoclonal antibodies. Immunosequencing of chondroitin sulfates*. Matrix, 1993. **13**(5): p. 351-61.
88. Fleischmajer, R., J.S. Perlish, and R.I. Bashey, *Human dermal glycosaminoglycans and aging*. Biochim Biophys Acta, 1972. **279**(2): p. 265-75.

89. Wallace, J.M., et al., *The mechanical phenotype of biglycan-deficient mice is bone- and gender-specific*. Bone, 2006. **39**(1): p. 106-16.
90. Young, M.F., et al., *Biglycan knockout mice: new models for musculoskeletal diseases*. Glycoconj J, 2002. **19**(4-5): p. 257-62.
91. Vogel, K.G. and J.A. Trotter, *The effect of proteoglycans on the morphology of collagen fibrils formed in vitro*. Coll Relat Res, 1987. **7**(2): p. 105-14.
92. Danielson, K.G., et al., *Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility*. J Cell Biol, 1997. **136**(3): p. 729-43.
93. Varani, J., et al., *Decreased collagen production in chronologically aged skin: roles of age-dependent alteration in fibroblast function and defective mechanical stimulation*. Am J Pathol, 2006. **168**(6): p. 1861-8.
94. Varani, J., et al., *Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(3): p. 480-6.
95. Engelke, M., et al., *Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation*. Br J Dermatol, 1997. **137**(2): p. 219-25.
96. Grove, G.L. and A.M. Kligman, *Age-associated changes in human epidermal cell renewal*. J Gerontol, 1983. **38**(2): p. 137-42.
97. Yaar, M. and B.A. Gilchrist, *Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function*. Clin Geriatr Med, 2001. **17**(4): p. 617-30, v.
98. Averbeck, M., et al., *Differential regulation of hyaluronan metabolism in the epidermal and dermal compartments of human skin by UVB irradiation*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 687-97.
99. Knott, A., et al., *Deregulation of versican and elastin binding protein in solar elastosis*. Biogerontology, 2009. **10**(2): p. 181-90.
100. Sellheyer, K., *Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation?* J Cutan Pathol, 2003. **30**(2): p. 123-7.
101. Hasegawa, K., et al., *Versican, a major hyaluronan-binding component in the dermis, loses its hyaluronan-binding ability in solar elastosis*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(7): p. 1657-63.
102. Wegrowski, Y., et al., *The murine biglycan: complete cDNA cloning, genomic organization, promoter function, and expression*. Genomics, 1995. **30**(1): p. 8-17.
103. Ungefroren, H. and N.B. Krull, *Transcriptional regulation of the human biglycan gene*. J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15787-95.
104. Kessler-Becker, D., T. Krieg, and B. Eckes, *Expression of pro-inflammatory markers by human dermal fibroblasts in a three-dimensional culture model is mediated by an autocrine interleukin-1 loop*. Biochem J, 2004. **379**(Pt 2): p. 351-8.
105. Lee, Y.R., et al., *Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF-kappaB pathway in human dermal fibroblasts*. Exp Mol Med, 2009. **41**(8): p. 548-54.
106. Podskochny, A., et al., *Biglycan gene expression in UVR-exposed rabbit corneas*. Acta Ophthalmol Scand, 2004. **82**(2): p. 200-4.
107. Schaefer, L., et al., *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2223-33.
108. Grover, J., et al., *The human lumican gene. Organization, chromosomal location, and expression in articular cartilage*. J Biol Chem, 1995. **270**(37): p. 21942-9.
109. Funderburgh, J.L., et al., *Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(6): p. 1159-67.
110. Brenneisen, P., et al., *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*, 2000. **275**(6): p. 4336-44.
111. Dong, K.K., et al., *UV-induced DNA damage initiates release of MMP-1 in human skin*. *Exp Dermatol*, 2008. **17**(12): p. 1037-44.
  112. Varani, J., et al., *Molecular mechanisms of intrinsic skin aging and retinoid-induced repair and reversal*. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 1998. **3**(1): p. 57-60.
  113. Varani, J., et al., *Inhibition of type I procollagen production in photodamage: correlation between presence of high molecular weight collagen fragments and reduced procollagen synthesis*. *J Invest Dermatol*, 2002. **119**(1): p. 122-9.
  114. von Wnuck Lipinski, K., et al., *Integrin-mediated transcriptional activation of inhibitor of apoptosis proteins protects smooth muscle cells against apoptosis induced by degraded collagen*. *Circ Res*, 2006. **98**(12): p. 1490-7.
  115. Bissett, D.L., D.P. Hannon, and T.V. Orr, *An animal model of solar-aged skin: histological, physical, and visible changes in UV-irradiated hairless mouse skin*. *Photochem Photobiol*, 1987. **46**(3): p. 367-78.
  116. Haratake, A., et al., *UVB-induced alterations in permeability barrier function: roles for epidermal hyperproliferation and thymocyte-mediated response*. *J Invest Dermatol*, 1997. **108**(5): p. 769-75.
  117. Li, M.J., S.Y. Lin, and R.C. Liang, *Changes in the skin moisture contents, skin color, and skin protein conformational structures of sprague-dawley rats after ultraviolet B irradiation*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 1999. **12**(6): p. 336-43.
  118. Faurischou, A., S.R. Wiegell, and H.C. Wulf, *Transepidermal water loss after photodynamic therapy, UVB radiation and topical corticosteroid is independent of inflammation*. *Skin Res Technol*, 2007. **13**(2): p. 202-6.
  119. Hirotsune, M., et al., *Effect of ingested concentrate and components of sake on epidermal permeability barrier disruption by UVB irradiation*. *J Agric Food Chem*, 2005. **53**(4): p. 948-52.
  120. Jiang, S.J., et al., *Ultraviolet B-induced alterations of the skin barrier and epidermal calcium gradient*. *Exp Dermatol*, 2007. **16**(12): p. 985-92.
  121. Moragas, A., C. Castells, and M. Sans, *Mathematical morphologic analysis of aging-related epidermal changes*. *Anal Quant Cytol Histol*, 1993. **15**(2): p. 75-82.
  122. Watson, R.E., et al., *Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin. Distribution at the dermal-epidermal junction*. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(5): p. 782-7.
  123. Beissert, S. and T. Schwarz, *Mechanisms involved in ultraviolet light-induced immunosuppression*. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 1999. **4**(1): p. 61-4.
  124. Bosset, S., et al., *Photoageing shows histological features of chronic skin inflammation without clinical and molecular abnormalities*. *Br J Dermatol*, 2003. **149**(4): p. 826-35.
  125. Kligman, L.H. and G.F. Murphy, *Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor*. *Photochem Photobiol*, 1996. **63**(1): p. 123-7.
  126. McCormick, T.S., S.R. Stevens, and K. Kang, *Macrophages and cutaneous inflammation*. *Nat Biotechnol*, 2000. **18**(1): p. 25-6.
  127. Trautinger, F., *Mechanisms of photodamage of the skin and its functional consequences for skin ageing*. *Clin Exp Dermatol*, 2001. **26**(7): p. 573-7.
  128. Kaarsen, L.L., et al., *Mast cells and elastosis in ultraviolet-irradiated hairless mice*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 1995. **11**(1): p. 1-5.
  129. Lee, Y.M., et al., *Benzyl isothiocyanate exhibits anti-inflammatory effects in murine macrophages and in mouse skin*. *J Mol Med*, 2009. **87**(12): p. 1251-61.
  130. Grosman, N., E. Hvidberg, and J. Schou, *The effect of oestrogenic treatment on the acid mucopolysaccharide pattern in skin of mice*. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 1971. **30**(5): p. 458-64.

131. Röck K., M.M., Fuchs N., Zipper P., Freudenberger T., Krutmann J., Reifenberger J., Fischer JW, *Estrogen reverses the loss of dermal hyaluronan and proteoglycans during extrinsic skin aging in mice*, in *Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)*. 2010: Mainz.
132. Röck K., M.M., Fuchs N., Zipper P., Freudenberger T., Krutmann J., Reifenberger J., Fischer J.W. , *Estrogen augments dermal hyaluronan and proteoglycans during extrinsic skin ageing in mice*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2010. **381**: p. 1-92.
133. Röck K., M.M., Fuchs N., Zipper P., Tigges J., Homey B., Fritsche E., Reifenberger J., Fischer J.W, *Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photo aging by release of EGF from keratinocytes*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 2011. **383**: p. 71.
134. Röck K., M.M., Fuchs N., Tigges J., Zipper P., Fritsche E., Krutmann J., Homey B., Reifenberger J., Fischer JW, *Estradiol induced paracrine release of EGF from keratinocytes protects the dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging*. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* , 2012: p. 76.
135. Bourguignon, L.Y., et al., *Hyaluronan-CD44 interaction with IQGAP1 promotes Cdc42 and ERK signaling, leading to actin binding, Elk-1/estrogen receptor transcriptional activation, and ovarian cancer progression*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(12): p. 11961-72.
136. Salgado, R.M., et al., *Hormone-regulated expression and distribution of versican in mouse uterine tissues*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2009. **7**: p. 60.
137. LeBaron, R.G., D.R. Zimmermann, and E. Ruoslahti, *Hyaluronate binding properties of versican*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(14): p. 10003-10.
138. Evanko, S.P., J.C. Angello, and T.N. Wight, *Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(4): p. 1004-13.
139. Yang, B.L., et al., *Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican*. *J Cell Biochem*, 1999. **72**(2): p. 210-20.
140. Makrantonaki, E. and C.C. Zouboulis, *William J. Cunliffe Scientific Awards. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin*. *Dermatology*, 2007. **214**(4): p. 352-60.
141. Hirose, J., et al., *Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 5228-34.
142. Touab, M., et al., *Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development*. *Am J Pathol*, 2002. **160**(2): p. 549-57.
143. Simeon, A., et al., *Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu(2+)*. *J Invest Dermatol*, 2000. **115**(6): p. 962-8.
144. Hatano, H., et al., *Identification of estrogen-regulated genes during fracture healing, using DNA microarray*. *J Bone Miner Metab*, 2004. **22**(3): p. 224-35.
145. Svensson, L., I. Narlid, and A. Oldberg, *Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils*. *FEBS Lett*, 2000. **470**(2): p. 178-82.
146. Geng, Y., D. McQuillan, and P.J. Roughley, *SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases*. *Matrix Biol*, 2006. **25**(8): p. 484-91.
147. Ashcroft, G.S., et al., *Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels*. *Nat Med*, 1997. **3**(11): p. 1209-15.
148. Honardoust, D., et al., *Localization of small leucine-rich proteoglycans and transforming growth factor-beta in human oral mucosal wound healing*. *Wound Repair Regen*, 2008. **16**(6): p. 814-23.
149. Castelo-Branco, C., M. Duran, and J. Gonzalez-Merlo, *Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy*. *Maturitas*, 1992. **15**(2): p. 113-9.



150. Trautinger, F., et al., *UVA- and UVB-induced changes in hairless mouse skin collagen*. Arch Dermatol Res, 1994. **286**(8): p. 490-4.
151. Gendimenico, G.J., et al., *Topical estrogens: their effects on connective tissue synthesis in hairless mouse skin*. Arch Dermatol Res, 2002. **294**(5): p. 231-6.
152. Varani, J., et al., *Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(6): p. 1471-9.
153. Stevenson, S., et al., *17beta-estradiol regulates the secretion of TGF-beta by cultured human dermal fibroblasts*. J Biomater Sci Polym Ed, 2008. **19**(8): p. 1097-109.
154. Carre, A.L., et al., *Interaction of wntless protein (Wnt), transforming growth factor-beta1, and hyaluronan production in fetal and postnatal fibroblasts*. Plast Reconstr Surg, 2010. **125**(1): p. 74-88.
155. Hosokawa, M., et al., *Estrogen induces different responses in dermal and lung fibroblasts: special reference to collagen*. Connect Tissue Res, 1981. **9**(2): p. 115-20.
156. Melching, L.I. and P.J. Roughley, *Modulation of keratan sulfate synthesis on lumican by the action of cytokines on human articular chondrocytes*. Matrix Biol, 1999. **18**(4): p. 381-90.
157. Son, E.D., et al., *Topical application of 17beta-estradiol increases extracellular matrix protein synthesis by stimulating tgf-Beta signaling in aged human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(6): p. 1149-61.
158. Chang, K.C., et al., *Estrogen receptor beta is a novel therapeutic target for photoaging*. Mol Pharmacol, 2010 **77**(5): p. 744-50.
159. Deshpande, R., et al., *Estradiol down-regulates LPS-induced cytokine production and NFkB activation in murine macrophages*. Am J Reprod Immunol, 1997. **38**(1): p. 46-54.
160. Rittie, L., et al., *Retinoid-induced epidermal hyperplasia is mediated by epidermal growth factor receptor activation via specific induction of its ligands heparin-binding EGF and amphiregulin in human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(4): p. 732-9.
161. Rossouw, J.E., et al., *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial*. JAMA, 2002. **288**(3): p. 321-33.
162. Beral, V., *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 419-27.
163. Aktories, K., Förstermann, Ulrich, Starke, Klaus, Hofmann, Franz Bernhard, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10. ed. 2009, München: Elsevier.

# 11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düren, den 26.10.2016

Michael Meusch, geb. 10.05.1983 in Aachen

(Unterschrift)

## 12 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. J.W. Fischer für die Überlassung des interessanten Themas, die gute und stets motivierende Betreuung, sowie die Chance dieses Forschungsprojekt zu realisieren.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Institute für Pharmakologie der Universitätskliniken Essen und Düsseldorf für die fachliche Unterstützung im Labor und das sehr angenehme Arbeitsklima. Besonders danken möchte ich in diesem Zusammenhang:

Meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Katharina Röck für die gute Zusammenarbeit, die kontinuierliche Unterstützung bei sämtlichen Fragestellungen, ihre Geduld und nicht zuletzt ihrem unermüdlichen Korrekturlesen.

Herrn Dr. rer. nat. Till Freudenberger für seine freundliche und kompetente Mithilfe im Labor, den angenehmen menschlichen Umgang und die vielen netten Gespräche, auch im privaten Umfeld.

Frau Annika Zimmerman für ihre Unterstützung und ständige Hilfsbereitschaft im Labor.

Frau Dipl. -Biologin Petra Zipper und Frau PD Dr. med. Julia Reifenberger für die gute Kooperation und die professionelle interdisziplinäre Zusammenarbeit.

Meiner Mutter, meiner Großmutter und meinem Bruder Thomas danke ich von ganzem Herzen, für all die Unterstützung, die Aufmunterungen und Nachsicht, wenn es darum ging meine Launen zu ertragen. Ich verdanke euch die Ermutigung nie aufzugeben. Ihr wart bzw. seid ein derart wichtiger Rückhalt für mich, dass ich ohne euch das „Gesamtprojekt Promotion“ in vielerlei Hinsicht nicht gemeistert hätte.

Abschließend gilt mein herzlicher Dank Nikola Fuchs, für die uneingeschränkte Unterstützung in den vergangenen Jahren, für all die aufgebrachte Geduld, die Entbehrungen und das Gefühl mich immer auf dich verlassen zu können.