

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. J.W. Fischer

**Langzeitauswirkungen von 17β -Östrogen auf die differentielle
Zusammensetzung der extrazellulären Matrix der intrinsisch
und extrinsisch gealterten murinen Dermis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nikola Fuchs

2017

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

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

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

***„Angesichts von Hindernissen mag die kürzeste
Linie zwischen zwei Punkten die krumme sein.“***

Bertolt Brechts, Leben des Galilei 1938

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 JW. „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 JW. „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

Demographische Veränderungen des durchschnittlichen Lebensalters der Weltbevölkerung und die hiermit einhergehenden Herausforderungen führten in den letzten Jahren u.a. zu einem vermehrten wissenschaftlichen Bestreben, die der Hautalterung zugrundeliegenden Mechanismen zu erforschen. Bei der Hautalterung unterscheidet man zwei verschiedene Formen: die intrinsische und die extrinsische Hautalterung. Beide Prozesse sind gekennzeichnet durch ein extensives *Remodelling* der Haut. Die extrinsische Alterung wird durch exogene Faktoren wie die UV-Strahlung begünstigt, wohingegen die intrinsische Alterung sowohl von genetischen, als auch von endokrinen Faktoren, wie dem Östrogen (E_2)- Spiegel, beeinflusst ist. Die extrazelluläre Matrix (EZM) spielt eine entscheidende Rolle beim Alterungsprozess. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Östrogen modulierend auf die Zusammensetzung der EZM wirkt, jedoch sind die genauen Mechanismen bislang unbekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Evaluation EZM-assoziiierter Veränderungen durch Östrogen-Mangel und extrinsische Alterungsprozesse sowie die Untersuchung, inwiefern diese Veränderungen durch eine E_2 -Substitution und/oder eine UVB-freie Erholungsphase reversibel sind. Hierzu wurde auf molekularer Ebene in einem Mausmodell (*skh-1-Mäusen*) die Expression von Hyaluronsäure (HA), Kollagen, der Proteoglykane Versikan, Biglykan und Lumikan sowie zelluläre Prozesse, wie die Inflammation und Proliferation, untersucht. Zudem wurden als funktionelle Parameter der Haut Feuchtigkeitsgehalt, Elastizität und transepidermaler Wasserverlust quantifiziert. Der Einfluss von E_2 wurde durch eine bilaterale Ovariectomie mit anschließendem Einsatz eines Placebopellets zur Östrogendepletion sowie eine Ovariectomie mit anschließender Östrogenpelletimplantation (1,1 μg 17β -Östradiol/kg Maus/Tag) untersucht. Zur Nachstellung einer extrinsischen Hautalterung wurde jeweils die Hälfte der oben genannten Tiere über einen Zeitraum von 20 Wochen mit 1,5 MED (80 mJ/cm^2) bestrahlt, gefolgt von einer 10-wöchigen bestrahlungsfreien Periode. Es konnte gezeigt werden, dass UV- Bestrahlung und die damit ausgelöste extrinsische Hautalterung auch nach einer Rekonvaleszenz von 10 Wochen noch zu tiefgreifenden *Remodellingvorgängen* führte. Dies wurde ersichtlich durch einen Verlust von HA sowie einer vermehrten Kollagenfragmentierung im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe. Die operative Östrogendepletion verstärkte diesen Effekt. Weiterhin zeigte sich eine Akkumulation, verstärkt durch Östrogensubstitution, der Proteoglykane Versikan, Biglykan und Lumikan als Langzeitfolge von chronischer Bestrahlung in den extrinsisch gealterten Gruppen.

Durch chronische UVB-Bestrahlung erhöhte sich zudem die Proliferationsrate. Außerdem ließ sich eine verstärkte dermale Rekrutierung von Entzündungszellen als Zeichen eines protrahierten Inflammationsgeschehens nach Bestrahlungspause nachweisen. Unter Östrogen kam es demgegenüber zwar auch zu einer erhöhten Proliferationsrate, jedoch zu einer tendenziellen Verminderung der o. g. Entzündungsreaktion. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die UVB-abhängigen *Remodellingvorgänge* mit einem verminderten Hydratationsgrad sowie mit einem erhöhten transepidermalen Wasserverlust assoziiert waren. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit somit gezeigt werden, dass eine chronische UVB-Bestrahlung auch nach einer Rekonvaleszenzphase von 10 Wochen zu relevanten *Remodellingvorgängen* in der EZM führte, die u.a. mit einem Verlust von HA und Kollagen sowie mit einem Anstieg der Kollagenfragmentierung und einem bis dato unbekanntem Anstieg der dermalen Proteoglykane einhergeht. Des Weiteren zeichnete sich ab, dass eine Östrogensubstitution diese Veränderungen beeinflusst und ihnen in einem gewissen Maße vermutlich positiv entgegenwirken kann.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Haut	1
1.2 Extrazelluläre Matrix	2
1.2.1 Hyaluronsäure	2
1.2.2 Kollagen	3
1.2.3 Die Proteoglykane: Biglykan, Versikan und Lumikan	4
1.3 Hautalterung	5
1.3.1 Intrinsische Hautalterung	5
1.3.2 Extrinsische Hautalterung	5
1.3.3 Inflammaging	6
1.4 Östrogen und Östrogeneffekte auf die Haut	7
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Lösungen	9
2.2 Substanzen	10
2.3 Farbstoffe und Farbstofflösungen	10
2.4 Geräte, Material und Software	11
2.5 Tierversuche	12
2.5.1 Versuchstiere	12
2.5.2 Versuchsgruppen	12
2.5.3 Operative Entfernung der Ovarien	13
2.5.4 Implantation der Östrogen- und Plazebo- Pellets	13
2.5.5 UV-Bestrahlung	13
2.5.6 Versuchszeitplan	14
2.6 Anfertigung der histologischen Präparate	14
2.6.1 Entnahme der Hautbiopsien	14
2.6.2 Einfrieren der Gewebeexplantate und Anfertigen von Kryoschnitten	14
2.7 Konventionell-histologische Färbung: Picrosirius-Rot-Färbung	15
2.8 Immunhistochemische Färbungen	16
2.8.1 Ablauf der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen	16
2.8.2 Primär- und Sekundär-Antikörper	18
2.8.3 DAB- Einwirkzeit der jeweiligen Färbungen	19
2.9 Quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen	20
2.10 Erhebung der Hautparameter	20
2.11 Statistik	21
3. Ergebnisse	22
3.1. Quantifizierung des HA-Gehaltes der murinen Dermis	22

3.2 Differenzielle Effekte von E₂-Substitution und UVB-Bestrahlung auf den Gesamtkollagengehalt der papillären Dermis sowie auf die Entstehung von Kollagenfragmenten	24
3.2.1 Bestimmung der Gesamt- Kollagenpackungsdichte	24
3.2.2 Quantifizierung der Kollagenfragmente	26
3.3 Quantifizierung des Biglykangehaltes in der papillären Dermis	28
3.4 Quantifizierung des Lumikangehaltes in der papillären Dermis	30
3.5 Quantifizierung des Versikangehaltes in der papillären Dermis	32
3.6 Quantifizierung der Proliferationsrate der papillären Dermis	34
3.7 Quantifizierung der Makrophagenanzahl in der papillären Dermis	36
3.8 Auswertung der an den Wasserhaushalt gebundenen Hautparameter	38
3.8.1 Hydratationsgrad und trans-epidermaler Wasserverlust	38
3.8.2 Auswertung des <i>Young's modulus</i> und der Viskoelastizität	39
4. Diskussion	41
4.1 Veränderung des HA-Gehaltes	41
4.1.1 Veränderungen des HA-Gehaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	41
4.1.2. Veränderungen des HA-Gehaltes in der papillären Dermis durch Langzeit UVB Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	41
4.2 Veränderungen des Kollagenhaushaltes	43
4.2.1 Veränderungen des Kollagenhaushaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	43
4.2.2. Veränderungen des Kollagenhaushaltes in der papillären Dermis durch Langzeit UVB Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	44
4.3 Veränderungen im Proteoglykanhaushalt	45
4.3.1 Veränderungen des Biglykanhaushaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	45
4.3.2. Veränderungen des Biglykanhaushaltes in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	45
4.3.3 Veränderungen des Lumikanhaushaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	46
4.3.4. Veränderungen des Lumikangehaltes in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	46
4.3.5 Veränderungen des Versikanhaushaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	47
4.3.6. Veränderungen des Versikangehaltes in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	47
4.4 Veränderungen der Proliferationsrate	48
4.4.1 Veränderungen der Proliferationsrate in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	48
4.4.2 Veränderungen der Proliferationsrate in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	49
4.5 Veränderung der Makrophagendetektion	49
4.5.1 Veränderungen der Makrophagendetektion in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	49
4.5.2 Veränderungen der Detektion von Makrophagen in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	50
4.6 Veränderungen der Hautparameter	51
4.6.1 Veränderungen des Hydratationsgrades in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	51

4.6.2 Veränderungen des Hydratationsgrades in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	52
4.6.3 Veränderungen der Elastizität in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung	52
4.6.4 Veränderungen der Elastizität in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase	53
4.7 Überblick über die Veränderungen in der Komposition der EZM durch chronische Bestrahlung auch nach einer Rekonvaleszenzphase	54
4.8 Ausblick und Schlussfolgerung	55
5.Literaturverzeichnis	56
6. Anhänge	66
6.1 Danksagung	66
6.2 Eidesstaatliche Versicherung	67

Abkürzungsverzeichnis

Anova	<i>Analysis of variance</i>
AK	Antikörper
BGN	Biglykan
BSA	Bovines- Serum Albumin
KOL	Kollagendomäne
Da	Dalton
DAB	3,3'- Diaminobenzidin
E₂	17β- Östradiol
ER	Östrogenrezeptor
ERα ERβ	Östrogenrezeptor α &- β
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	Fetales Kälber Serum
GAG	Glykosaminoglykane
HA	Hyaluronsäure
HABP	Hyaluronsäure-bindendes Protein
HAS	Hyaluronsäure-Synthase
HRP	Meerrettichperoxidase
HRT	Hormonersatztherapie
Hyal	Hyaluronidase
i.p.	intra peritoneal
ICAM	Interzelluläre Adhäsionsmoleküle
IgG	Immunglobulin G
iNOS	induzierte Stickstoffsynthase
KF	Kollagenfragmente
Lum	Lumikan
M1- M2	Makrophage Typ 1 und Typ 2

Mac2	Makrophagen Protein
MED	einfache minimale Erythemdosis
MIF	Makrophagen migrationsinhibierender Faktor
MMP	Matrix Metalloprotease
NF-κB	<i>Nuclear Factor κB</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NO	Stickstoffmonoxid
P	Plazebo
PE	Probeentnahme
PG	Proteoglykan
rER	rauhes endoplasmatisches Retikulum
RHAMM	Rezeptor für HA- medierte Mobilität
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SLRP	small leucine rich proteoglycan
S	<i>sham</i>
TAMs	Tumorassoziierte Makrophagen
TEWL	Trans-epidermaler Wasserverlust
TGF β	transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	Matrixmetallo- Gewebeinhibitor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Ver	Versikan
X	Ovariectomie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Darstellung der Haut und der Hautschichten	1
2	Struktureller Aufbau eines Hyaluronsäure	2
3	Darstellung des Versuchszeitplans	14
4	Hyaluronsäuregehalt der murinen Dermis nach 10-wöchiger Bestrahlungspause und E ₂ Behandlung	14
5	A: Repräsentative Bilder der Picrosirius-Rot-Färbung in polarisiertem Licht. B:Quantitative Auswertung des Gesamtkollagengehaltes durch Bestimmung der Packungsdichte der Kollagenfibrillen	25
6	Kollagenfragmentgehalt der murinen Dermis nach in Abschnitt 2.2- 2.3 beschriebener Behandlung	27
7	Biglykangehalt der murinen Dermis nach in Abschnitt 2.1 beschriebener Behandlung	29
8	Gesamtlumikangehalt der murinen Dermis nach in Abschnitt 2.1 beschriebener Behandlung	31
9	Versikangehalt in der murinen Dermis nach in Abschnitt 2.1-2-3 beschriebener Behandlung	33
10	Anzahl der proliferierenden Zellen in der murinen Dermis nach 10-wöchiger Bestrahlungspause und E ₂ Behandlung wie in Abschnitt 2.1-2.3 beschrieben	35
11	Detektion der Makrophagen in muriner Dermis nach 10-wöchiger Bestrahlungspause und E ₂ - Behandlung wie in Abschnitt 2.1-2.3 beschrieben	37
12	Erfassung der Hautparameter wie in Abschnitt 2.5 beschrieben	40

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
1	Darstellung der verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung	9
2	Auflistung der verwendeten Substanzen	10
3	Aufzählung der verwendeten Farbstoffe und Farbstofflösungen, sowie deren genaue Zusammensetzung wie sie in den konventionellen histologischen Färbungen zum Einsatz kamen	10
4	Geräte, Materialien und Softwareprogramme die für die unten genannten Tierversuche zum Einsatz kamen	10
5	Einteilung und Erläuterung der Versuchsgruppen	12
6	Ablauf der durchgeführten konventionell- histologischen Picrosirius- Rot- Färbung mit Auflistung aller Substanzen und der jeweiligen Einwirkzeit.	16
7	Standardablauf einer immunhistochemischen Färbung, mit detaillierter Auflistung aller Arbeitsschritte, verwendeten Lösungen und Einwirkzeiten, wie sie im Folgenden zum Einsatz kamen.	17
8	Auflistung aller verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper, deren Herkunft sowie der zum Einsatz gekommenen Verdünnung in den immunhistochemischen Färbungen	19
9	Auflistung der jeweiligen DAB- Einwirkungszeiten der einzelnen immunhistochemischen Färbungen	20
10	Detaillierte Darstellung, Zustandekommen, Erläuterung sowie der verwendeten Einheit der erhobenen Hautparameter	21

1 Einleitung

1.1 Die Haut

Die Haut ist mit bis zu 2 m² Fläche das größte Organ des Menschen. Sie stellt eine Begrenzung zur Außenwelt dar und erfüllt hierbei zahlreiche wichtige Aufgaben, wie z.B. das Wahrnehmen von Sinnesempfindungen, die Ausbildung einer effektiven Schutzbarriere gegen chemische und physikalische Reize und den Aufbau einer immunologischen Barriere [1]. Die Haut besteht von innen nach außen aus drei Schichten: Subkutis, Dermis und Epidermis (Abb. 1). Zu den integralen Bestandteilen zählen verschiedene Anhangsgebilde wie: Hautdrüsen, Haarfollikel und Nägel [1].

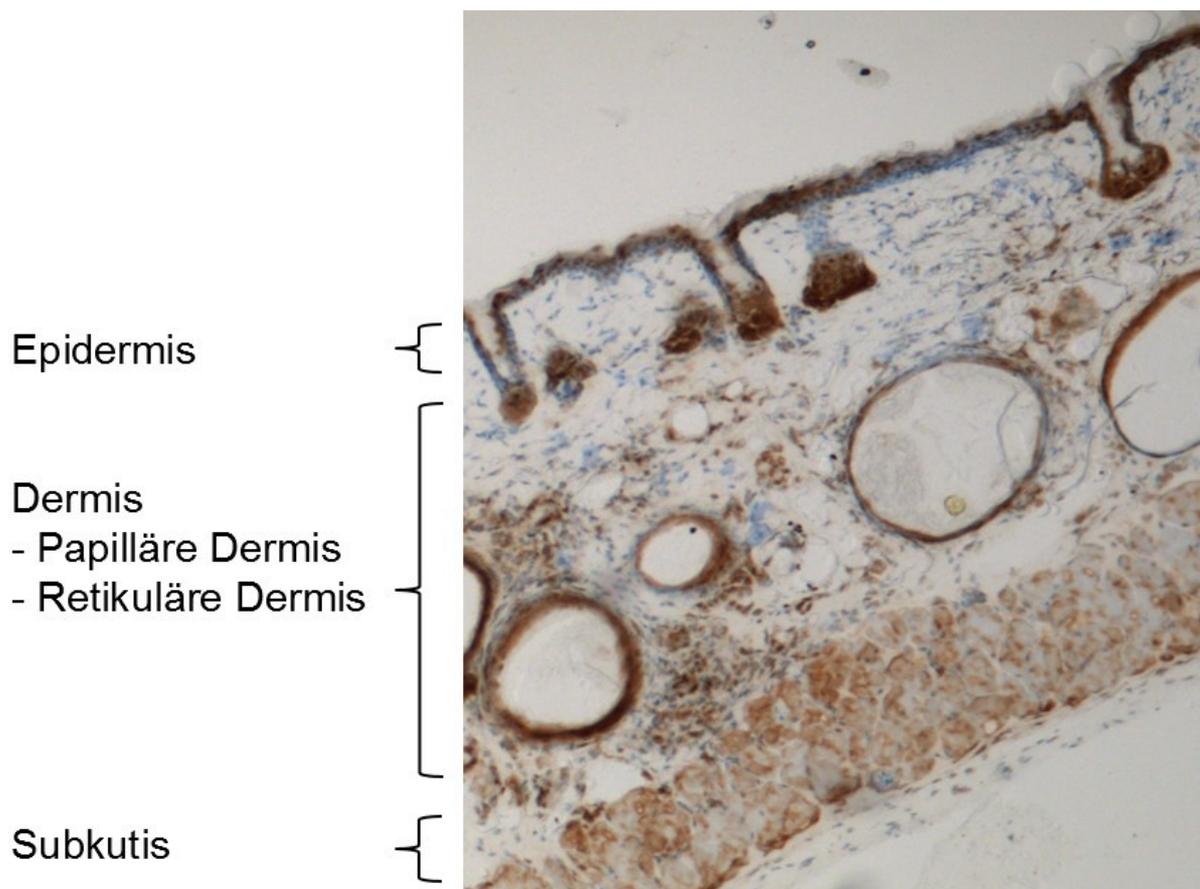


Abbildung 1: Darstellung der Haut und der Hautschichten anhand eines Beispielbildes der in der Arbeit angefertigten Hautpräparaten: Schematischer Aufbau der Haut mit Schichten von oben nach unten: Epidermis, Dermis mit papillärer und retikulärer Dermis und Subkutis

Die Subkutis bildet den Übergang der Haut zu den darunterliegenden Geweben wie Muskeln oder Sehnen. Sie besteht hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe und regional unterschiedlichen Anteilen von Fettgewebe, in das die epifaszialen Leitungsbahnen der Haut zum Schutz eingebettet sind [1].

Die darüber gelegene Dermis besteht aus zwei Schichten: der papillären Dermis und der retikulären Dermis [1]. Die der Subkutis aufliegende breite retikuläre Dermis besteht aus einem straffen, geflechtartig angeordneten Bindegewebe (BGW). Das BGW besteht hauptsächlich aus Kollagenfasern und elastischen Fasern. In der Tiefe entspringen Schweißdrüsen und Haarfollikel [2]. Die retikuläre Dermis verleiht der Haut ihre mechanische Widerstandsfähigkeit [1].

Die oberflächliche, dünnere papilläre Dermis erstreckt sich über die Räume zwischen den epidermalen Reteleisten. Die papilläre Dermis enthält zahlreiche Zelltypen, wie Fibroblasten, Histozyten, Mastzellen und Langerhanszellen [1]. Histozyten, in ihrer aktiven Form als Makrophagen bezeichnet, phagozytieren u.a. abgestorbene Zellen, Melaninabbaustoffe und Antigene. Langerhanszellen fungieren als Antigen-präsentierende Zellen. Mastzellen sind durch die Ausschüttung von Histamin hauptverantwortlich für die typischen Entzündungsreaktionen der Haut [1, 2]. Somit spielen die hier genannten Zellen eine wichtige Rolle während der Entzündungsvorgänge der Haut und können durch die Anfärbung eines Oberflächenproteins der Makrophagen, - Mac2 -, sichtbar gemacht werden. Neben den zellulären Komponenten besteht die Dermis aus extrazellulärer Matrix, welche ihrerseits durch Fibroblasten synthetisiert wird. Die Hauptbestandteile der EZM der retikulären Dermis sind Elastin, Glykosaminoglykane (GAG) sowie Proteoglykane (PG) [3].

Über der Dermis befindet sich die Epidermis. Die Epidermis ist ein zellreiches, mehrschichtig verhornetes Plattenepithel, das zu 90 % aus Keratinozyten besteht. Über vier Schichten findet eine Differenzierung der Keratinozyten zu Korneozyten statt. Mit der Ausbildung der Korneozyten erfüllt die Epidermis ihre wichtigste Aufgabe, die Aufrechterhaltung einer chemischen und mechanischen Barriere gegenüber der Umwelt [1, 2].

1.2 Extrazelluläre Matrix

Die EZM stellt ein komplexes Netzwerk von Makromolekülen dar, welche den interzellulären Raum ausfüllen und den größten Volumenanteil innerhalb der Binde- und Stützgewebe einnimmt. Die EZM besteht hauptsächlich aus fibrillären Proteinen wie Kollagen und Elastin sowie aus Glykosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen (PG) [1]. Neben ihrer stabilisierenden Funktion spielt sie eine Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen, wie der Proliferation, Adhäsion und Migration [4-6].

1.2.1 Hyaluronsäure

Hyaluronsäure (HA) ist ein Hauptbestandteil der EZM und zählt zur Gruppe der GAG. GAG nehmen den weitaus größten Anteil innerhalb der EZM ein. Aufgebaut sind GAG aus sich stetig wiederholenden Disaccharideinheiten, bestehend aus einem Aminozucker und einer Uronsäure. HA besteht dementsprechend aus einer sich wiederholenden Sequenz der Disaccharideinheit N- Azetyl- Glukosamin und Glukuronsäure, welche β -glykosidisch miteinander verknüpft sind (Abb. 2) [7].

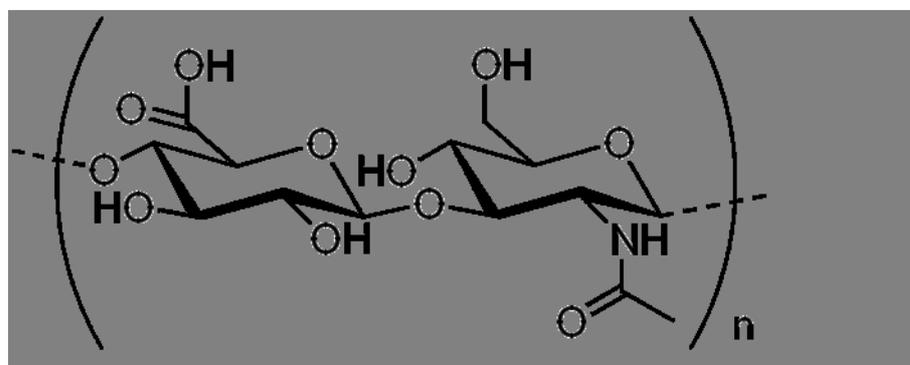


Abbildung 2: Struktureller Aufbau eines Hyaluronsäure- Disaccharides. Hyaluronsäure besteht aus sich wiederholenden Disaccharid [- β (1, 4)- Glukuronsäure- β (1,3)- N- Azetylglukosamin-] $_n$ Einheiten modifiziert nach Kapoor et al [8].

Der HA-Gehalt der Haut unterliegt lokalen Schwankungen. In der Epidermis ist sie nur im Stratum Spinosum und im Stratum Basale anzutreffen, in der Dermis hingegen ist sie reichlich vorhanden [9, 10]. HA übernimmt neben Kollagen viele mechanische und biochemische Aufgaben. Dazu zählt u.a. die

Regulation des Wasserhaushaltes, welche wiederum durch Volumenexpansion im großen Maße die Elastizität der Haut bestimmen kann [11].

Für die Biosynthese der HA sind drei membranständige Isoenzyme, die Hyaluronsynthasen 1,2 und 3 (HAS 1, -2, -3), verantwortlich [12]. HAS gehören zu einer großen Multigen-Familie und werden unterschiedlich reguliert [13]. Eine HA-Kette entsteht transmembranär durch eine glykosidische Verknüpfung von N-Azetyl-D-Glukosamin und Glukuronsäure und kann zwischen 250 und 30.000 Disaccharideinheiten (10^5 - 10^7 DA) lang sein [14]. HA wird zum einen durch spezifische Hyaluronidasen und zum anderen durch nicht enzymatische Degradation wie z.B. freie Radikale abgebaut [15]. Entscheidend für die biologische Funktion der HA ist die Größe der HA- Fragmente [16]. Hochmolekulare HA- Fragmente scheinen neben der Vermittlung von immunsuppressiven und anti- angiogenetischen Wirkungen auch an migrationsfördernden und proliferationsfördernden Prozessen beteiligt zu sein [12]. Kleine HA-Fragmente können im Gegensatz dazu inflammatorische und immunogene Prozesse vermitteln [12]. In der Epidermis konnte gezeigt werden, dass HA auch während der Wundheilung und der anschließenden Regeneration induziert wird [9].

HA liegt zu großen Teilen ungebunden vor, kann aber zu geringen Teilen auch nicht-kovalent an HA-interagierende Moleküle, die Hyaladherine, wie z.B. Versikan oder Aggrekan gebunden sein [17, 18]. Zusätzlich ist HA in der Lage Oberflächen-HA Rezeptoren zu aktivieren. Hierzu zählen u.a. CD44 sowie der Rezeptor für HA-medierte Mobilität (RHAMM). Dadurch werden Signalwege initiiert, die zum einen Proliferation und Migration in Fibroblasten fördern und zum anderen Apoptose hemmen [14, 19].

1.2.2 Kollagen

Die EZM besteht zu großen Teilen auch aus Kollagenen, dem mengenmäßig häufigsten Protein des menschlichen Körpers [7]. Bisher sind 29 verschiedene Kollagene bekannt [20]. Allen gemeinsam ist der gleiche Grundaufbau, die Zusammensetzung aus der typischen Kollagen- α -Kette [7]. Die Aminosäuresequenz der Kollagen- α -Kette besteht charakteristischerweise aus einer repetitiven Tripleteinheit aus Glyzin-X-Y. Glyzin belegt stets jede dritte Position, die Positionen X- und Y sind variabel gestaltbar. An Position X findet sich meist Prolin, an Position Y finden sich meist Hydroxyprolin, Lysin oder auch Hydroxylysin [7]. Die Kollagene lassen sich in zwei große Gruppen aufteilen: Fibrillen-bildende Kollagene und Fibrillen-assoziierte Kollagene [7]. Fibrillen-bildende Kollagenmoleküle bilden mit 90 % den Hauptanteil aller Körperkollagene. Dazu zählen die Kollagen- Typen I, II, III, V und IX [7, 21]. Fibrilläre Kollagene zeichnen sich durch die Ausbildung von Kollagenfibrillen, welche sich schließlich zu Kollagenfasern oder Kollagenfaserbündeln zusammenlagern, aus [7]. Die Synthese der Kollagenfibrillen findet sowohl intrazellulär in Fibroblasten, als auch extrazellulär statt [1]. Im rauen ER wird die dort produzierte Kollagen α -Kette wichtigen Modifikationen unterzogen. Dazu zählen v.a. Hydroxylierungs- und Glykolisierungsschritte, die dem Kollagen die spätere Stabilität verleihen [3, 7, 21]. Jeweils drei modifizierte Kollagen- α Ketten lagern sich durch Ausbildung von Disulfidbrücken zu einer Tripelhelix zusammen [7]. Extrazellulär lagern sich anschließend jeweils fünf Tripelhelices durch eine stabilitätsgebende Quervernetzung zu einer Kollagenfibrille zusammen [7]. Fibrillen-assoziierte Kollagene stellen demgegenüber eine heterogene Gruppe dar, welche keine Fibrillen ausbildet [7]. Anders als beim fibrillenbildenden Kollagen, wird die tripelhelikale Struktur durch nichthelikale Segmente unterbrochen [7]. Fibrillen-assoziierte Kollagene sind somit beweglicher [7]. Kollagen Typ IV ist das bekannteste Fibrillen-assoziierte Kollagen. Es bildet ein flächiges Netzwerk in der Basalmembran aus [21]. Der Abbau des Kollagens erfolgt über Kollagenasen (Matrix- Metallo-Proteinasen: MMP). MMP sind in zahlreiche Vorgänge, u.a. in EZM-Umbauprozesse involviert [22]. Darüber

hinaus spielen MMP eine Rolle in der Regulation der Angiogenese, der Morphogenese, der Tumordinvasion sowie deren Metastasierung [22]. Expression, Aktivität und Repression werden über Wachstumsfaktoren, Zytokine und durch natürlich vorkommende MMP-hemmende Proteine geregelt (engl.: „*Tissue Inhibitors of Metallo Proteinases*“:TIMP) [22, 23]. Die MMP-Aktivität kann jedoch auch durch extrinsische Faktoren wie UV-Strahlung gesteigert werden, was zu einem gesteigerten Kollagenabbau führt [24].

Zu den in der Haut vorkommenden Kollagenen zählen Kollagen Typ I, III und VII [7, 25]. Kollagen Typ I macht etwa 50-80 % des Trockengewichts der Dermis aus. Es verleiht der retikulären Dermis Festigkeit. Kollagen III spielt mengenmäßig eine untergeordnete Rolle. Es kommt v.a. in der papillären Dermis vor und ist bekannt für seine Verformbarkeit [25-27].

1.2.3 Die Proteoglykane: Biglykan, Versikan und Lumikan

PG sind eine heterogene Gruppe von Makromolekülen, die aus Proteinen und kovalent gebundenen GAG bestehen [7]. Sie lassen sich hauptsächlich in zwei große Gruppen unterteilen. Zum einen die Gruppe der kleinen leuzin-reichen Proteoglykane, (engl. „*small leucine-rich proteoglykan*“) (SLRP), die charakteristischerweise entsprechend eine kleine leuzin-reiche Domäne enthalten [28]. Hierzu zählen u.a. die PG Dekorin, Lumikan und Biglykan [28]. Zum Anderen die Gruppe der Hyaladhärienen, die über eine hyaluronbindende Domäne an HA binden können, wie Versikan, Aggrekan, Neurocan und Brevikan. Neben einer essentiell stabilisierenden Stützfunktion sind PG maßgeblich an der Regulation der Zellmigration, Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung beteiligt [29].

Biglykan

Biglykan (Bgn) ist ein kleines PG, das ebenfalls der Gruppe der SLRP angehört. Bgn ist aus einem 331 Aminosäuren großen Core-Protein, an welches am N-terminalen Ende zwei Chondroitin/Dermatansulfat Ketten angelagert sind, aufgebaut [30]. Bgn scheint u.a. an der Regulation der Anordnung und Ausgestaltung von Matrixbestandteilen wie Kollagen und der Kontrolle von Zellproliferationen beteiligt zu sein [29, 31, 32]. Darüber hinaus ist Bgn in der Lage an den Wachstumsfaktor, (engl.: „*transforming-growth factor β* “) (*TGF- β*), einen potenten Regulator in der Formation von Bindegewebe, mit hoher Affinität zu binden. Bgn kann mit diesem interagieren und ihn in seiner Aktivität modulieren [33, 34]. Diese Interaktion spielt eine Rolle während der Wundheilung sowie innerhalb der Pathogenese dermalen Fibrose [33, 35]. In der Epidermis ist Bgn im Bereich differenzierender Keratinozyten und Gefäßepithelzellen lokalisiert [36]. Darüber hinaus wird Bgn in zahlreichen soliden Tumoren wie Ovarialtumoren, Lebertumoren sowie kolorektalen Tumoren hochreguliert und scheint dort eine wichtige Rolle in der formalen Pathogenese zu übernehmen [37].

Versikan

Der Name Versikan (Vcan) wird abgeleitet aus den zwei Wörtern „vielseitig“ (engl.: „*versatile*“) und „Proteoglykan“ (engl.: „*Proteoglycan*“) [38]. Vcan ist der schwerste Vertreter aus der PG-Gruppe der Hyaladherine [39]. Es verfügt über eine kalzium-abhängige Lektindomäne im Bereich des C-terminalen Ende und über ein N-terminales Ende, an welches HA gebunden vorliegen kann [40]. Vcan scheint eine Rolle in der Regulation von Zell-Adhäsion, *Zell-Survival*, Proliferation sowie bei dem Zusammenbau der EZM zu spielen [40]. Zurzeit sind vier Spleißvarianten von Vcan, die sich hinsichtlich der Kernproteingröße und der Anzahl der gebundenen GAG unterscheiden, im menschlichen Körper bekannt [41].

In der Haut ist Vcan v.a. in der Basallamina der Epidermis und in der Dermis-assoziert mit dem elastischen Fasersystem um Haarfollikel-sowie in der unmittelbaren Umgebung von Schweißdrüsen lokalisiert [42].

Lumikan

Lumikan (Lum) zählt wie Bgn zu den SLRP [43]. Lum besteht aus vier Domänen: Einem Signalpeptid, einem negativ geladenen N-terminalen Ende, einer für alle SLRP charakteristische leuzin-reichen Domäne, über die Lumikan u.a. Kollagen binden kann, sowie einem C-terminalen Ende aus 50 Aminosäuren [44]. Über die Rolle von Lum in der Haut ist bis dato sehr wenig bekannt. Lum ist an der Fibrillogenese und am Kollagenfibrillenwachstum während der Sehnenentwicklung beteiligt [45]. Zudem zeigen Lum-defiziente Mäuse eine lichtundurchlässige Cornea, abnormal lange Kollagenfibrillen sowie eine ausgeprägte Hautbrüchigkeit [46]. Darüber hinaus scheint Lum eine Rolle bei der Zellmigration und proliferation während der Embryogenese sowie während der Wundheilung und der Immunantwort zu spielen [44].

1.3 Hautalterung

Hautalterung stellt nicht nur ein kosmetisches, sondern auch ein klinisch relevantes Problem dar. So entstehen bestimmte Formen von malignen Hauttumoren häufig in UV-geschädigter Haut. Hautkrebs ist die Krebsform mit dem höchsten Inzidenzanstieg aller Malignomen und nach dem Mamma-Karzinom bei Frauen und dem Bronchial-Karzinom bei Männern die zweithäufigste Krebsform des Menschen [47]. Bei der Hautalterung lässt sich darüber hinaus die physiologische bzw. intrinsische von der vorzeitigen, d.h. umweltbedingten extrinsischen Hautalterung unterscheiden. Beide Prozesse sind gekennzeichnet durch extensives Remodelling der Haut.

1.3.1 Intrinsische Hautalterung

Die intrinsische Hautalterung lässt sich nur bedingt beeinflussen und entsteht kontinuierlich im Laufe der Zeit. Sie wird bestimmt durch genetische Einflüsse bzw. Veranlagungen sowie von inneren Faktoren, wie dem natürlichen Hormonhaushalt [48, 49]. Charakteristisch für die intrinsisch gealterte Haut ist die Dichteabnahme von Kollagen- und Elastinfasern sowie eine Ausdünnung des subkutanen Fettgewebes, der Dermis und der Epidermis. Dies führt letztlich zur Ausbildung vieler feiner Fältchen [50]. Zusätzlich erscheint die Haut durch den zunehmenden Verlust von Wasser und den Änderungen der epidermalen Lipidzusammensetzung häufig trocken, rau und schuppig [51].

1.3.2 Extrinsische Hautalterung

Die vorzeitige, extrinsische Hautalterung wird durch externe Umwelteinflüsse verursacht. Sie ist unabhängig von internen Faktoren und kann durch entsprechende Verhaltensänderungen beeinflusst werden. Zu den bekannten extrinsischen Faktoren zählen neben UV-Strahlung auch klimatische Faktoren, Umwelttoxinen, Ernährung und der individuelle Lebensstil [52, 53]. Hierbei ist die durch UV-Strahlung induzierte Hautalterung, die aktinische Form der wichtigste Faktor und mit circa 80 % für alle sichtbaren Hautalterungsprozesse verantwortlich [54]. Charakterisiert wird die extrinsische Hautalterung im Wesentlichen durch differenzierte histologische und ultrastrukturelle Veränderungen der dermalen EZM.

Zu den akuten Folgen zählen u.a. die Dermatitis solaris und eine mögliche Immunsuppression [55]. Dermatitis solaris ist besser bekannt als „Sonnenbrand“ und entspricht einer akuten Entzündung der Haut, die durch UV- Bestrahlung induziert wird [2]. UV-Bestrahlung bewirkt u.a. einen Anstieg von Wasserstoffperoxidasen und reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [56, 57] sowie eine verringerte Anzahl

von Antioxidantien. Dies führt zu DNA-Schäden, Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und in der Folge zur Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Über verschiedene Wege wird die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) hochreguliert und eine EZM-Degradation induziert [53].

Zu den chronischen Folgen zählen die bereits erwähnten Effekte einer vorzeitigen Hautalterung sowie die Entstehung von UV-induzierten Präkanzerosen und UV-induzierten Malignomen [58, 59]. Klinisch ist diese Form der Hautalterung gekennzeichnet durch eine lederartige Haut mit zahlreichen tiefen Falten und Furchen sowie einer verringerten Elastizität. Es kommt zu Pigmentverschiebungen im Sinne von Epheliden, Lentiginen und Hypopigmentierungen [48]. UV-Bestrahlung führt zur verminderten Expression von Kollagen Typ I und –III und zu einer Aktivierung von MMP 1,-3 und 9. Dies führt zu einer Entstehung von Kollagenfragmenten und letztlich zu einem verminderten Kollagengehalt [60-62]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die entstandenen Kollagenfragmente über verschiedene Mechanismen die Kollagenneusynthese und somit die Reparaturprozesse in den Hautfibroblasten hemmen [63]. Dieser Kollagenverlust wird durch die Ablagerung von elastotischem Material (Syn. solare Elastose), bestehend aus Elastin und Fibrillin, nur unzureichend ersetzt [25]. Veränderungen des Kollagenhaushaltes unter chronischer UVB-Bestrahlung sind in der Vergangenheit detailliert beschrieben worden. Letztlich kommt es über verschiedene Wege zu einer extensiven Kollagenfragmentierung, einem Verkleben von Kollagenfragmenten sowie einer verminderten Kollagensynthese [63]. Bezüglich HA liegen insgesamt widersprüchliche Ergebnisse vor. So wurde bisher gezeigt, dass eine 10-wöchige UV-Bestrahlung den HA-Gehalt ansteigen lässt, [64] während eine längere Bestrahlungsperiode hingegen zu einer Abnahme von HA führte [65].

1.3.3 Inflammaging

UVB-Bestrahlung gilt darüber hinaus als potenter, externer Stimulus und ist geeignet eine Immunreaktion der Haut, inflammatorische Hauterkrankungen und Neoplasien der Haut hervorzurufen [66]. So weist extrinsisch gealterte Haut viele histologische Merkmale auf, die einem Inflammationsprozess entsprechen. UV-Exposition induziert zudem eine definierte, charakteristische Form der Wundheilung. Im Detail handelt es sich um einen sogenannten chronisch niedrig proinflammatorischen Prozess, der auch *Inflammationsalterung*, oder englisch „*Inflammaging*“ genannt wird. Dieser Inflammationsprozess ist charakterisiert durch eine primäre Degradation von Kollagen, eine Akkumulation von elastotischem Material und einen Einstrom von Makrophagen und Mastzellen in exponierte Hautareale mit anschließend sekundärer Induktion von Reparatur und Wundheilungsprozessen [67, 68]. Die Wundheilung läuft in mehreren koordinierten Phasen ab, die Hämostase, Entzündungsphase oder Inflammationsphase, Proliferationsphase und Remodellingphase genannt werden [69]. Im Bezug auf die EZM läuft während der Wundheilung ein fein abgestimmter Prozess mit Neubildung von Bindegewebe, genauer gesagt der Synthese, Degradation und Umlagerung von Kollagen und Produktion neuer GAG und PG, ab [70]. Von chronischen Wunden, deren Merkmal u. a. die chronische Inflammation ist, spricht man ab einem Zeitraum von über vier Wochen, wobei dieser Zeitraum in der Literatur teilweise sehr unterschiedlich beschrieben wird [70, 71].

1.4 Östrogen und Östrogeneffekte auf die Haut

Östrogene gehören zu der Gruppe der Steroidhormone, deren gemeinsame Vorstufe das Cholesterin ist. Über Androstendion und Testosteron als Zwischenstufen werden sie hauptsächlich im Ovar und in der Plazenta, sowie in geringen Mengen auch in den Leydig-Zellen des Hodens und in der Nebennierenrinde produziert [72]. Ihre Wirkung vermitteln Östrogene über Östrogenrezeptoren (ER), welche zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren zählen und als Liganden-induzierte Transkriptionsfaktoren wirken [73]. Man unterscheidet den „klassischen“ Östrogenrezeptor- α (ER α) von dem später entdeckten Östrogenrezeptor- β (ER β). Dimerisiert können die Östrogenrezeptoren an Transkriptionsfaktoren, wie den stark proinflammatorisch wirkenden Mediator Nf κ B, binden [74]. 17 β -Östradiol (E₂) ist das wichtigste und physiologisch am stärksten wirksame Östrogen. Die Östrogenwirkungen sind umfassend und komplex. Zu nennen sind u.a. die Regulation der Expression diverser Gene, Wachstumsinduktion, die Modifikation zellulärer Differenzierung und die übergeordnete Einflussnahme auf unterschiedliche Zielgewebe wie die Brust, den Skelettsystem, das zentrale Nervensystem, die Leber, das kardiovaskuläre System sowie die Haut [75-78]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Tierpopulation exprimiert nur den ER α Rezeptor.

Schon früh (circa 1941) ließ sich ein Zusammenhang zwischen sinkendem Östrogenspiegel und Hautveränderungen vermuten [79]. Die Menopause geht bekanntermaßen mit einem verminderten Östrogenspiegel einher. So lässt sich neben der Ausdünnung der Haut auch ein vermehrtes, sowie verstärktes Auftreten von Falten und Trockenheit der Haut feststellen [80]. UV-bestrahlte, ovariectomierte Ratten zeigen im Vergleich zu nicht-ovariectomierten Tieren eine beschleunigte Faltenbildung und eine phänotypisch schlaffer erscheinende Haut [81]. Darüber hinaus ist Östrogen in der Lage, durch eine Veränderung der Zusammensetzung der Lipide der Epidermis sowie einem Anstieg der GAG in der Dermis, den Wassergehalt der Haut positiv zu verändern [82].

Östrogen scheint auch in der Regulation der Wundheilung eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnten Ashcroft et al. beobachten, dass Wunden von älteren Menschen mit vermutlich niedrigerem Östrogengehalt langsamer heilten und folgende funktionelle Charakteristika aufwiesen: verzögerte Reepithelisierungsraten sowie ausbleibende Neovaskularisierung, erhöhte Inflammationsraten und eine insgesamt reduzierte Matrixdeposition [83].

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Modell der Hautalterung hat zunehmend an Bedeutung gewonnen, da es bereits augenscheinliche Veränderungen des Gewebes deutlich aufführt. Sowohl die Bedeutung von intrinsischen Faktoren, z.B. Östrogenverlust nach der Menopause, wie auch von extrinsischen Faktoren, z.B. UV-Strahlung, für die Progression der Hautalterung konnte bereits in diversen klinischen Studien eindrucksvoll gezeigt werden.

Beide Prozesse sind assoziiert mit tiefgreifenden *Remodellingvorgängen* und strukturellen Veränderungen der extrazellulären Matrix. Eine systematische Studie im Sinne einer Übersichtsarbeit, welche die Einflüsse der unterschiedlichen Alterungsfaktoren auf die Bestandteile der EZM untersucht steht bislang jedoch aus. Zudem ist bislang nicht geklärt, ob und inwiefern die durch eine chronische UVB-Bestrahlung hervorgerufenen *Remodellingvorgänge* auch nach einem definierten, bestrahlungsfreiem Intervall entsprechend einer Erholungs bzw. Rekonvaleszenzphase, weiterhin bestehen.

Aus diesen Gründen sollten anhand des *skh-1-Mausmodells* insbesondere folgende Aspekte untersucht werden:

- Vergleichende deskriptive Untersuchung der extrazellulären Matrixbestandteile nach intrinsischem Alterungsverlauf im Vergleich mit chronisch, aktinisch gealterter Haut nach einer Rekonvalenzphase von 10 Wochen
- Einfluss des Östrogenspiegels auf die Zusammensetzung der EZM und das Regenerationspotential der EZM nach chronischer UV-Bestrahlung
- Auswirkungen von Östrogensupplementation und UVB-Bestrahlung auf funktionelle Hautparameter (Feuchtigkeit, Elastizität und transepidermaler Wasserverlust) und inflammatorische sowie proliferative Prozesse

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen

Tabelle 1: Darstellung der verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung.

Name	Zusammensetzung
Blockierlösung	10% TB, 10% FBS, 1% BSA
4 % Formalin nach Lillie	Selber hergestellt aus reinem Formalin
10 x PBS	2 g KCL; 2 g KH ₂ PO ₄ ; 80 g NaCL; 11,5 g NaHPO ₄ (ad 1l, pH 7,4), für den Gebrauch 1:10 mit dH ₂ O verdünnen
10 x TBS	24,2 g Tris; 80,0g NaCl (ad 1l, pH 7,6), für den Gebrauch 1:10 mit dH ₂ O verdünnen
TRIS (TB Buffer)	Tris 6,07g ad 1l pH 7,6
Ethanol abs. (Gewebefixierung)	Gebrauchsfertig von Merck
95 % Ethanol	Gebrauchsfertig von Merck
70 % Ethanol	Gebrauchsfertig von Merck
Xylol	Gebrauchsfertig von Merck
FKS	Gebrauchsfertig von PAN, South American
DAB	Gebrauchsfertiges Kit, SycTek
HCL	Gebrauchsfertig von Merck

2.2 Substanzen

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Substanzen

Substanzen	Hersteller
Aquatex	Merck, Darmstadt, DEU
Chondroitinase ABC	Sigma Aldrich, Steinheim, DEU
Diaminobenzidin (DAB)	Zytomed Systems, Berlin, DEU
Entellan (Eindeckmedium)	Merck, Darmstadt, DEU
Tissue Tek- Einbettmedium	Sakura Finetek, Torrance USA
Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator	Merck, Darmstadt, DEU
Estrogenpellets	Innovative Research of America
Esketaminhydrochlorid	Pfizer, PARKE- Davis GmbH, Karlsruhe, DEU
Xylazin	Bayer, Leverkusen, DEU
Hoechst 33344	Sigma- Aldrich, Deisenhofen
Betaisodona- Lösung	Mundipharma GmbH, Limburg
Carprofen	Pfizer, Berlin, DEU

2.3 Farbstoffe und Farbstofflösungen

Tabelle 3: Aufzählung der verwendeten Farbstoffe und Farbstofflösungen sowie deren genaue Zusammensetzung, wie sie in den konventionellen histologischen Färbungen zum Einsatz kamen.

Farbstoff	Färbelösung
Picosirius-Rot	Gebrauchsfertige Lösungen: 0,1g Direct Red 80 ad 100ml gesättigte Pikrinsäure
Cölestinblau	2,5 g Ammonium- Eisen III- Sulfat über Nacht in 50 ml aqua dest. lösen; 0,25 g Cölestinblau zugeben, 30 Minuten kochen und filtrieren, 7 ml Glyzerin zugeben
Hämalaun nach Mayer	Gebrauchsfertig von Merck

2.4 Geräte, Material und Software

Tabelle 4: Geräte, Materialien und Softwareprogramme, die für die unten genannten Tierversuche zum Einsatz kamen

Gerät, Material, Software	Herstellername	Herkunft
Dermalap	Dermalap®USB	Cortex Technology, Hadsund, Dänemark
Gefrierschrank	Liebherr Comfort	Liebherr, Biberach an der Riss, DEU
ImageJ	ImageJ	National Institutes of Health
Kamera	Leica DFC420C	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kryostat	Leica CM 1850	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Kryomolds	Disposable basemolds	Electron Microscopy sciences, Hatfield, England
Mikroskop	Leica DM 2000	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Polarisationsfilter	Leica LICT/P	Leica Microsystems, Wetzlar
Zentrifuge	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad	Ecoline Staredition E100	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Mikroskop	Olympus CX 41	Olympus, Hamburg, Deutschland
Färbekammer	Färbekammer	Thermo Electron Corporation, Marietta, Ohio, USA
Ölstift	Dako- Pen	Dako Denmark, Dänemark
Objektträger	HistoBond®	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland
Kamerasoftware	Leica V.3.3.0	Leica Microsystems, Wetzlar
Nahtmaterial	Resorbierbare Fäden	Johnson & Johnson, Norderstedt

Auswertungssoftware

GraphPad Prism 5

GraphPad Software, La Jolla,
USA

2.5 Tierversuche

2.5.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche erfolgten im zentralen Tierversuchslabor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Anzeige und genehmigungspflichtigen Tierversuche wurden, in Übereinstimmung mit § 8 des Tierschutzgesetzes, bei der zuständigen Behörde, dem Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) beantragt und durch dieses genehmigt (Aktenzeichen: 8.87-50.10.34.08.022). Durchgeführt wurden die Versuche an genetisch veränderten, weiblichen Nacktmäusen (*hairless skh-1-Mäuse der Firma Charles River Laboratories*) welche unter Standardbedingungen in einem klimatisierten Raum der zentralen Tierversuchsanstalt an der Heinrich-Heine-Universität gehalten wurden.

2.5.2 Versuchsgruppen

Um die endogene Steroidhormonproduktion der Ovarien der weiblichen Nacktmäuse zu unterbinden, wurden diese im Alter von sieben Wochen ovariektomiert (X). Dazu wurden die Versuchsmäuse zufällig einzelnen Gruppen zugeordnet, wobei eine Gruppe ovariektomiert und die andere Gruppe placebo operiert wurde, *sham* (S). Die Gruppe der ovariektomierten Nacktmäuse wurde dann weiter unterteilt. Einer Hälfte wurden Östrogen-(E₂)-Pellets, der andern Hälfte wirkstofffreie Placebo-(P)-Pellets implantiert. So entstanden zunächst drei Versuchsgruppen, die Kontroll/ S,P-Gruppe, die ovariektomierte Placebo/ X,P-Gruppe und die ovariektomierte, östrogenpelletimplantierte/ X,E₂-Gruppe. Diese drei Versuchsgruppen wurden dann wiederum in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für 20 Wochen mit UVB-Licht bestrahlt, die andere hingegen nicht. Somit sind insgesamt sechs Versuchsgruppen entstanden (Tab. 5).

Tabelle 5: Einteilung und Erläuterung der Versuchsgruppen. Im Alter von 7 Wochen wurden weibliche *skh-1-Mäuse* entweder ovariektomiert (X) oder placebo (P) operiert. Im Anschluss erhielten die Mäuse entweder ein Placebo (P)-Pellet oder ein Östrogen (E₂)-Pellet. Eine Hälfte der jeweiligen Gruppe wurde im Anschluss für 20 Wochen mit UVB-Licht bestrahlt, die andere Hälfte nicht. Diese Versuchskonstellation ergibt im Folgenden sechs Tiergruppen.

<u>Unbestrahlte Gruppen</u>	<u>Bestrahlte Gruppen</u>
Kontrollgruppe (sham placebo, → S,P-Gruppe	Kontrollgruppe + UVB-Bestrahlung → S,P+ UVB-Gruppe
Ovariektomierte Gruppe + Placebo → X,P-Gruppe	Ovariektomierte Gruppe +Placebo+ UVB-Bestrahlung → X,P+UVB-Gruppe

Ovariectomie+ Implantation von Östrogenpellets

→ *X,E₂-Gruppe*

Ovariectomie+ Implantation von Östrogenpellets+ UVB- Bestrahlung

→ *X,E₂+ UVB-Gruppe*

2.5.3 Operative Entfernung der Ovarien

Um den Einfluss von Östrogen zu evaluieren, wurde die endogene Hormonproduktion durch Ovariectomie depletiert. Zur präoperativen Narkotisierung erfolgte eine intraperitoneale Applikation von 100 mg/kg Esketaminhydrochlorid (Pfizer, PARKE-Davis GmbH, Karlsruhe) und 5 mg/kg Xylazin (Bayer, Leverkusen). Intraoperativ erfolgte die Überwachung der Narkosetiefe durch Überprüfung des ausbleibenden Korneal- und Lidreflexes. Ausreichend narkotisiert wurden die Tiere auf dem Operationstisch gelagert und befestigt, Augen und Zunge wurden kontinuierlich feucht gehalten. Anschließend erfolgte die Desinfektion des Rückenbereichs mittels 70% Alkohols. Die 1 cm lange Hautinzision durch Kutis und Subkutis erfolgte 1 cm lateral der Wirbelsäule. Das Peritoneum wurde eröffnet und die Ovarien wurden stumpf vorgelagert und abgetrennt. Die Uterushörner sowie das Peritoneum wurden mittels resorbierbaren 5.0 Fäden (Johnson & Johnson, Norderstedt) verschlossen. Subkutis und Kutis wurden mit Einzelknopfnähten der Stärke 4.0 (Johnson & Johnson, Norderstedt) verschlossen und mit Betaisodona-Lösung desinfiziert. Um eine ausreichende Analgesie zu gewährleisten erfolgte postoperativ eine subkutane Injektion von 5 mg/kg Carprofen (Pfizer, Berlin). Diese wurde bis einschließlich dem dritten postoperativen Tag einmal täglich wiederholt. Der gesamte operative Eingriff wurde am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der HHU Düsseldorf durchgeführt.

2.5.4 Implantation der Östrogen- und Plazebo- Pellets

Die Östrogen- und Plazebo-Pellets sind von ovaler Form bei einem Durchmesser von 0,5 cm und einer Dicke von maximal 4 mm. Über einen Zeitraum von 90 Tagen setzen die Östrogen-Pellets (Innovative Research of America) kontinuierlich und gleichmäßig 1,1 µg/kg/Tag und Maus 17β-E₂ frei. Die Implantation erfolgte in der siebten Woche, kurz vor Beginn der Bestrahlungsperiode (Abb. 3). Dazu wurden die Tiere erneut wie oben beschrieben narkotisiert. Die Pellets wurden anschließend lateral des Nackens zwischen Ohr und Schulter implantiert. Hierzu wurde die Haut im lateralen Nacken angehoben, ein Schnitt von der Größe des zu implantierenden Pellets gesetzt und anschließend mit einer Pinzette eine Hauttasche geformt, in welche die Pellets hineingelegt wurden. Verschlossen wurde die Haut mit Einzelknopfnähten und resorbierbaren Fäden der Stärke 4.0 (Johnson & Johnson, Norderstedt). Der gesamte operative Eingriff wurde am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der HHU Düsseldorf durchgeführt.

2.5.5 UV-Bestrahlung

Für die Bestrahlung mit UVB-Licht wurden die *skh-1-Nacktmäuse* mit einer Gesamtdosis von 4,8 J/cm² (entsprechend 3 x 1,5 MED (80 mJ/ cm²) pro Woche) über einen Zeitraum von 20 Wochen dreimal wöchentlich bestrahlt. Für die UVB-Bestrahlung dienten vier UV-Lampen vom Modell TL 20W/12 mit einer Wellenlänge von 280 bis 320 nm der Firma Phillips (Phillips, Eindhoven, Niederlande). Die Bestrahlung erfolgte über den gesamten Rücken der *skh-1-Nacktmäuse* in einer eigens dafür konstruierten Apparatur, in welche die Tiere leicht in den Käfig gesetzt und wieder entnommen werden konnten. Nach oben verschlossen wurde der Käfig durch ein UV-durchlässiges Quarzschiebeglas. Die Bestrahlungszeit

betrug je 1 Min. 36 Sek. Die Bestrahlung erfolgte in der Tierversuchsanstalt der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf.

2.5.6 Versuchszeitplan

Im Alter von sieben Wochen wurden die weiblichen *skh-1-Nacktmäuse* ovariectomiert oder *sham* operiert, um anschließend die Implantation von Östrogen- oder Placebopellets vorzunehmen. Im weiteren Verlauf wurde die Tiergruppe, welche einer Bestrahlung mit UVB-Licht unterzogen werden sollte, für 20 Wochen dreimal wöchentlich bestrahlt. Es folgte anschließend eine zehnwöchige, bestrahlungsfreie Periode, in deren Anschluss die Tiere getötet wurden und Hautbiopsien entnommen wurden.

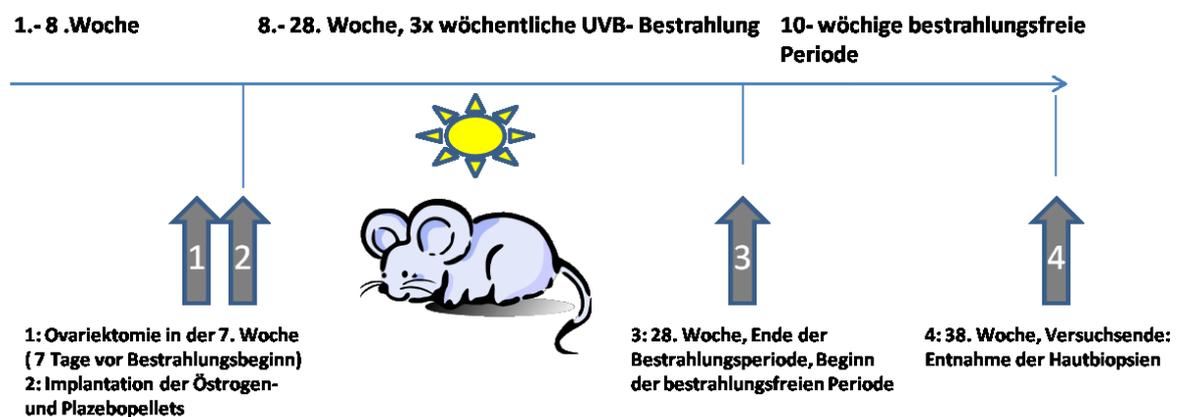


Abbildung 3: Darstellung des Versuchszeitplans 1: Ovariectomie (7 Tage vor Bestrahlungsbeginn); 2: 8.-28. Woche, Implantation der Östrogenpellets mit 17β - Östradiol ($1,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ Maus x Tag) und Beginn der Bestrahlungsperiode, 3xWoche mit UVB ($80 \text{ mJ}/\text{cm}^2$); 3: 28 Woche, Ende der Bestrahlungsperiode, Beginn der 10-wöchigen bestrahlungsfreien Periode; 4: 38. Woche: Versuchsende, Entnahme der Hautbiopsien

2.6 Anfertigung der histologischen Präparate

2.6.1 Entnahme der Hautbiopsien

Zur Durchführung der geplanten histologischen Untersuchungen der EZM-Komponenten wurden den Tieren nach einer 10-wöchigen, bestrahlungsfreien Periode Gewebeproben entnommen. Dazu wurden die Tiere mittels Kohlendioxid getötet und anschließend eine im Durchmesser 5 mm große Stanzbiopsie im Rückenbereich entnommen.

2.6.2 Einfrieren der Gewebeexplantate und Anfertigen von Kryoschnitten

Die nativen Hautproben wurden in Tissue-Tek[®] Kryogefäße (Sakura Finetak, Staufen) überführt und anschließend zur Schonung in Tissue-Tek[®] Medium (Sakura Finetak, Staufen) eingebettet. Nach langsamem, schonendem Einfrieren bei -40°C in flüssigem Isopentan wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Vor Anfertigung der Schnitte wurden die Proben für zwei Stunden bei -20°C gelagert. Der Leica-Kryostat (CM 1850, Leica Microsystems, Wetzlar) wurde auf eine Kammer-temperatur von -27°C eingestellt. Das Kryotom wurde so ausgerichtet, dass in jedem Längsschnitt der Haut die physiologische Schichtung von Epidermis, Dermis und Subkutis erhalten wurde. Anschließend wurden aus den einzelnen Hautbiopsien jeweils zwei Schnitte pro Objektträger mit einer Schichtdicke von $14 \mu\text{m}$ angefertigt. Um Feuchtigkeitsniederschläge auf den Objektträgern zu verhindern und die

Gefrierschnitte vorzufixieren, wurden die Proben anschließend unter einem Luftstrom vorsichtig getrocknet. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Gefrierschnitte unter Ausschluss von Feuchtigkeit in Präparatkästen mit zugefügtem Kieselgel bei -20°C gelagert.

2.7 Konventionell-histologische Färbung: Picrosirius-Rot-Färbung

Zur Detektion des Hautkollagens wurden die Kryoschnitte mittels Picrosirius-Rot [84] gefärbt. Tab. 6 zeigt den genauen Ablauf der Picrosirius-Rot-Färbung. Mit dieser Färbung lässt sich der Gesamtkollagen-Gehalt bestimmen.

Tabelle 6: Ablauf der durchgeführten konventionell-histologischen Picrosirius-Rot-Färbung mit Auflistung aller Substanzen und der jeweiligen Einwirkzeit.

Fixierung	10 Minuten in EtHO 70 %
Waschung	2 x für 5 Minuten in PBS
Spülung	1 x 1 Minuten in Aqua dest
1. Färbung	10 Minuten in Cölestinblaulösung
Kernbläuung	5 Minuten unter fließendem Wasser
2. Färbung	15 Minuten in Picrosirius- Rot Lösung
Aufsteigende Alkoholreihe	1 x 2 Minuten EtHO 70 %
	1 x 2 Minuten EtHO 95 %
	1 x 2 Minuten EtHO abs.
	1 x % Minuten Xylol
Eindeckung	Entellan

2.8 Immunhistochemische Färbungen

Die Immunhistochemie ist eine Methode, mit der Proteine mittels monoklonaler Antikörper spezifisch markiert und anschließend mit einem Detektionssystem kombiniert werden können. Die Methode der Immunhistochemie ermöglicht somit die Erfassung und Lokalisierung von Proteinen bereits im Lichtmikroskop. Im ersten Schritt wird ein spezifischer Antikörper, der Primärantikörper, auf das zu untersuchende Gewebe gegeben. Im zweiten Schritt wird ein Antikörper eingesetzt, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, der Sekundärantikörper. Dieser Sekundärantikörper ist mit einem Enzym (Peroxidase) gekoppelt und löst die Farbstoffentstehung aus. Um unspezifische Bindungen vom Antikörper mit anderen Strukturen zu verhindern, werden die histologischen Präparate mit einer Blockierlösung behandelt. Bei Färbeverfahren mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) kommt 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zum Einsatz. DAB bildet durch Oxidation am Ort des Zielantigens ein braunes Präzipitat, welches im Lichtmikroskop darstellbar ist. Die im Nachfolgenden vorgestellten Färbungen dienen der differenzierten Evaluation ausgewählter EZM-Moleküle.

2.8.1 Ablauf der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen

Die EZM-Moleküle wurden mit spezifischen Antikörpern (AK), die gegen bestimmte Regionen des Proteinanteils gerichtet waren, gefärbt. Tab. 7 zeigt den grundsätzlichen Ablauf der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen. Tab. 8 und 9 zeigen eine Übersicht über die Modifikationen und die zum Einsatz gekommenen primären und sekundären Antikörper der jeweiligen Färbungen.

Tabelle 7: Standardablauf einer immunhistochemischen Färbung, mit detaillierter Auflistung aller Arbeitsschritte, verwendeten Lösungen und Einwirkzeiten, wie sie im Folgenden zum Einsatz kamen.

Arbeitsschritt	Verwendete Lösung	Einwirkzeit
1: Fixierung bei 4 ° C	Ethanol bei: HA-, KF-, und Mac-2- Färbung	
	Formalin bei: BGN-, VER- und Ki- 67- Färbung	15- 30 Minuten
	Azeton bei: LUM- Färbung	
2: Waschung:	PBS	3 x 5 Minuten
3: Enzymatische Spaltung von GAG- Ketten vom Kernprotein	Chondroitinase Nur bei der KF-, VER-, und BGN- Färbung	60 Minuten bei 37 ° C
4: Unterbinden von unspezifischen Bindungen des Primär- AK	Blockierlösung	60 Minuten

5: Inkubation des Primär-AK	Jeweiliger Primär-AK, siehe Tab. 2.2	Über Nacht bei 4 ° C
6: Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
7: Peroxidase Block:	H ₂ O ₂ , nur bei Mac-2-Färbung	20 Minuten
7.1 Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
8: Inkubation des Sekundär-AK	Jeweiliger Sekundär-AK, siehe Tab. 2.2	60- 90 Minuten
9: Waschung	PBS	3 x 5 Minuten
10: Waschung	TB	10 Minuten bei 37 ° C
11: Detektion der Primär-AK	DAB-Peroxidase -Set	2- 10 Minuten siehe Tab. 2.4
12: Waschung	TB	5 Minuten
13: Waschung	Aqua dest	1 Minute
14: Kernfärbung	Hämalaun	1 Minute
15: Spülung	HCL	Kurz, < 1 Minute
16: Bläuen	Fließendes, kaltes Wasser	10 Minuten
17: Spülung	Aqua dest	1 Minute
18: Eindeckung	Aquatex	

2.8.2 Primär- und Sekundär-Antikörper

In den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen kamen die in Tab. 8 gezeigten Primär- und Sekundär-AK zum Einsatz.

Tabelle 8: Auflistung aller verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper, deren Herkunft sowie der zum Einsatz gekommenen Verdünnung in den immunhistochemischen Färbungen.

Zu färbende Struktur	Primär- AK	Sekundär- AK
Hyaluronsäure	HABP (Seikagaku, Tokyo, Japan)	Streptavidin, HRP (Sigma-Aldrich, Deisenhofen)
	Verdünnung: 1:250	Verdünnung: 1:500
Kollagenfragmente	Kollagenlagenepitope C1, C2 (IBEX Technologies, Montreal, Quebec)	IgG Anti- Rabbit, HRP (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA)
	Verdünnung: 1:100	Verdünnung: 1:600
Biglykan	LF 159 (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Larry Fischer, National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, Bethesda, Md)	IgG Anti- Rabbit, HRP (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA)
	Verdünnung: 1:1000	Verdünnung: 1:400
Versikan	LF 99 (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Larry Fischer, National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, Bethesda, Md)	IgG Anti-Rabbit, HRP (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA)
	Verdünnung: 1:5000	Verdünnung: 1:400
Lumikan	Goat anti- Lumican (Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Larry Fischer, National Institute of Dental and Craniofacial Research, NIH, Bethesda, Md)	Donkey anti goat HRP (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA)
	Verdünnung: 1:200	

Makrophagen	Mac- 2 (Cederlane Laborato- ries, Burlington, Ontario, Canada)	Anti rat IgG2a HRP (Novus biological, Littleton, CO, USA)
	Verdünnung: 1:400	Verdünnung: 1:400
Proliferierende Zellen	Anti Ki-67 Novus biological, (Littleton, CO, USA)	IgG Anti-Rabbit, HRP (Santa Cruz, Biotechnology, CA, USA)
	Verdünnung: 1:50	Verdünnung: 1:500

2.8.3 DAB- Einwirkzeit der jeweiligen Färbungen

In Tab. 9 sind die unterschiedlichen DAB-Einwirkzeiten der verschiedenen Färbungen dargestellt.

Tabelle 9: Auflistung der jeweiligen DAB- Einwirkungszeiten der einzelnen immunhistochemischen Färbungen.

Färbung	DAB- Einwirkzeit
Hyaluronsäure- Färbung	5 Minuten
Kollagenfragment- Färbung	5 Minuten
Biglykan- Färbung	10 Minuten
Versikan- Färbung	2 Minuten
Lumikan- Färbung	7 Minuten
Makrophagen- Färbung	7 Minuten
Proliferations- Färbung	8 Minuten

2.9 Quantitative Analyse der immunhistochemischen Färbungen

Von allen durchgeführten Färbungen wurden Hellfeldbelichtungsbilder (*8-Bit-Images*) mittels Leica DM2000 Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) in 100 x Vergrößerung aufgenommen. Für die quantitative Auswertung der Bilder wurde die *ImageJ Software* 1.41v (NIH, USA, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) verwendet. *ImageJ* trennt die Farbkanäle der Kernfärbung von der spezifisch angefärbten Struktur. Dadurch kann das Farbsignal dieser Zielstrukturen quantitativ ausgewertet werden. Für die jeweiligen Färbungen wurde ein Schwellenwert definiert, der störende unspezifische Hintergrundfärbungen minimiert und zugleich die spezifisch gefärbten Areale maximiert. Oberhalb des Schwellenwerts liegende Bereiche können somit als positiv gewertet werden. Der Schwellenwert wurde während der Analyse einer Färbung konstant gehalten. Ermittelt wurde der Flächenanteil (*Area Fraction*), welcher definiert ist als Anteil der DAB-positiv gefärbten Fläche. Die Messung erfolgte anschließend in 14 zufällig ausgewählten Arealen in der papillären Dermis, Haarfollikel ausgeschlossen. Zum besseren Vergleich der Daten wurden diese als Vielfaches der Kontrollgruppe angegeben. Die Ermittlung der Mac-2 und Ki-67 positiven Zellen der papillären Dermis erfolgte per manueller Zählung. Für Mac-2 wurden die Präparate hierzu in drei Gesichtsfeldern untersucht und gezählt. Für Ki-67 wurden jeweils sämtliche kernhaltigen Zellen sowie sämtliche Ki- 67 positive Zellkerne in der gesamten papillären Dermis gezählt. Somit wurde die Fraktion proliferierender Zellen im Vergleich zu der Gesamtanzahl der vorhandenen Zellen in der papillären Dermis ermittelt.

2.10 Erhebung der Hautparameter

Zur Analyse der Hautparameter wurde das *DermaLab® Skin Analysis System* der Firma Cortex Technology (Hadsund, Dänemark) genutzt. Die Messung erfolgte im lateralen, bestrahlten Bereich des Rückens. In Tab.10 werden die erfassten Hautparameter Feuchtigkeit, transepidermaler Wasserverlust (TEWL) und Elastizität erklärend dargestellt.

Tabelle 10: Detaillierte Darstellung, Zustandekommen, Erläuterung sowie der verwendeten Einheit der erhobenen Hautparameter.

	Erfasst:	Prinzip:	Einheit:
1: „Feuchtigkeit“	Hydratationsgrad der Haut	Misst die Leitfähigkeit der Haut	μS
2: „TEWL“	Transepidermalen Wasserverlust	Misst den Diffusionsgradient (die Evaporationsrate) der Haut	g/m ² /hr
3. „Elastizität“:	Dehnungsfähigkeit der Haut	Misst die Dehnung/ die mechanische Beanspruchung der Haut und wird durch die folgenden zwei Parameter erfasst	
3.1: “Young´s modulus“	Die Kraft die aufgewendet werden muss, um die Haut zwischen zwei Infrarotsensoren 1,5 mm anzuheben, entspricht der Steifheit der Haut	Anhebung der Haut	MPa
3.2: “Viskoelastizität“:	vereint die Retraktion und die Elevation, entspricht der Elastizität der Haut	Youngs´ modulus / R normalized (Durchschnittswert gemessen am Unterarm von 28- 51 jährigen Probanden, er beträgt 260ms)	MPa

2.11 Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mittels one-way ANOVA mit einem Signifikanzniveau von 95 %. Anschließend erfolgte ein Datenvergleich mittels Bonferroni-Post-Hoc-Test für paarweisen Vergleich. Das Signifikanzniveau p für alpha wurde mit 0,05 festgelegt. Bei der statistischen Auswertung kam die Software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, USA) zum Einsatz.

3. Ergebnisse

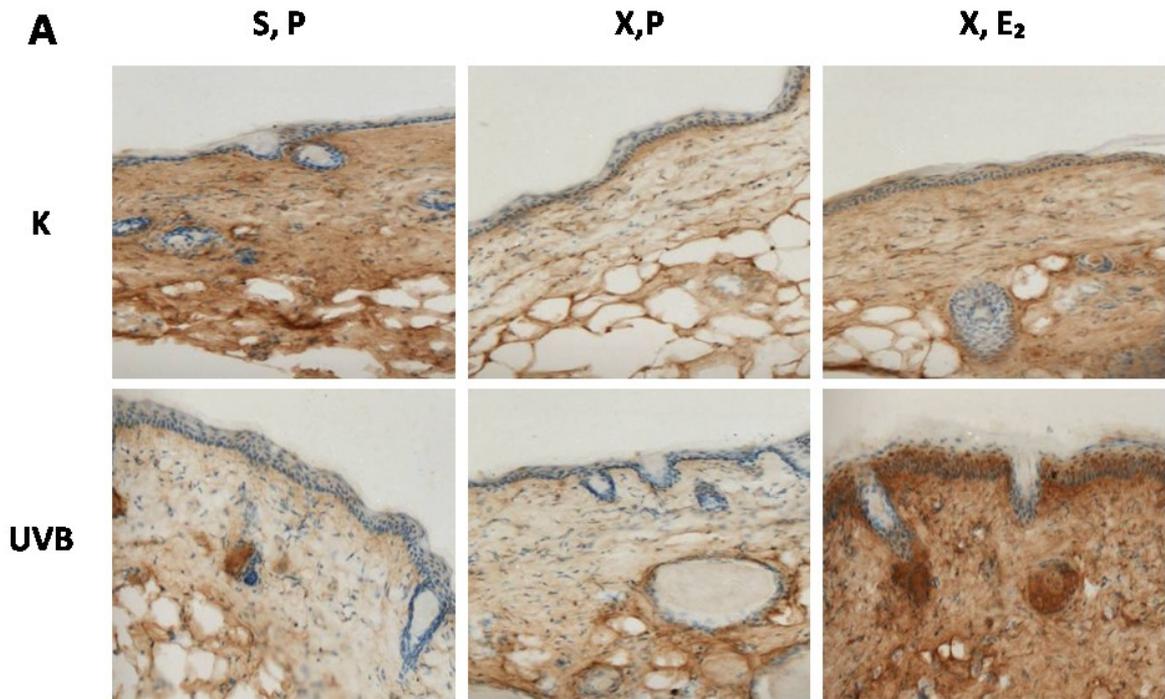
3.1. Quantifizierung des HA-Gehaltes der murinen Dermis

Zur Quantifizierung des HA-Gehaltes der papillären Dermis wurden die histologischen Präparate, wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, mittels biotinyliertem HABP und HRP/DAB angefärbt. Anschließend wurde anhand von mikroskopischen Bildern der HA-Gehalt der papillären Dermis unter Zuhilfenahme des Programms ImageJ[®] ausgewertet.

In den intrinsisch gealterten Gruppen zeigte sich, dass eine 30-wöchige E₂-Depletion (*X,P*) den HA-Gehalt gegenüber den östrogensubstituierten Tieren und den kontroll Tieren tendenziell verminderte. Die durchgeführte E₂- Substitution führte jedoch nicht zu einem erhöhten dermalen HA-Vorkommen.

Eine signifikante Reduktion des dermalen HA-Gehaltes wurde in den extrinsisch gealterten, UVB bestrahlten Tieren (*S,P-UVB*) im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen (*S,P*) detektiert.

Diese UVB bedingte Reduktion des HA- Gehalts konnte durch gleichzeitige Behandlung mit E₂ (*XE₂-UVB*) aufgehoben und sogar deutlich überkompensiert werden. Auch im Vergleich mit den intrinsisch gealterten E₂ behandelten Tieren (*XE₂*) zeigte sich der HA-Gehalt der UVB bestrahlten Tiere deutlich erhöht.



Hyaluronsäuregehalt

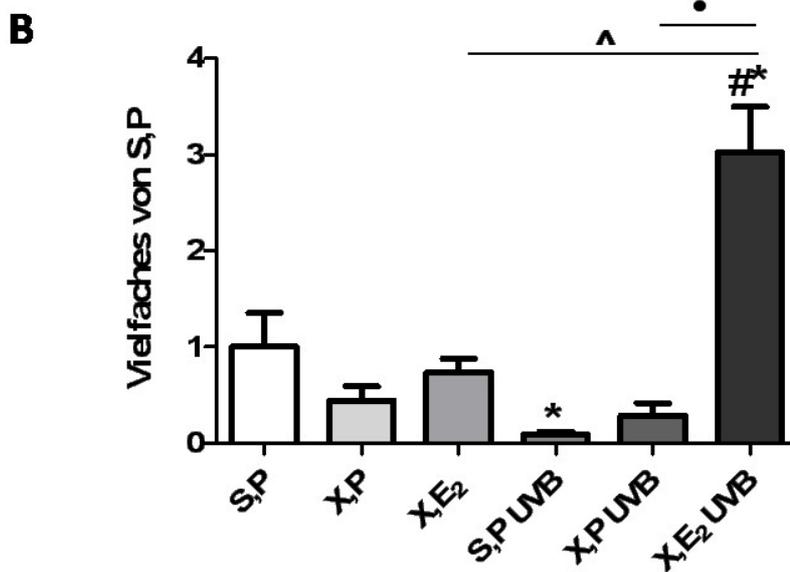


Abbildung 4: Hyaluronsäuregehalt der murinen Dermis nach 10-wöchiger Bestrahlungspause und E₂ Behandlung: Immunhistochemische Färbung der murinen Hautbiopsien. Dargestellt wird die quantitative Bildauswertung mittels ImageJ® als vielfaches der Kontrolle. S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet. X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen- Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo- Pellet und UVB- Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen- Pellet und UVB-Exposition. (A) Repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbung des Hyaluronsäuregehalt der murinen Dermis in 100 x Vergrößerung mit einer Schnittdicke von 14 µm. (B) Quantitative Auswertung des Hyaluronsäuregehaltes der murinen Dermis. n = 5-12, Mittelwert ± SEM; *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB; • p < 0,05 gegenüber X, P UVB; ^, p < 0,05 gegenüber X, E₂

3.2 Differenzielle Effekte von E₂-Substitution und UVB-Bestrahlung auf den Gesamt-Kollagengehalt der papillären Dermis sowie auf die Entstehung von Kollagenfragmenten

Um Veränderungen des Kollagenhaushaltes nach 20-wöchiger UVB-Bestrahlung mit anschließender 10-wöchiger Bestrahlungspause zu evaluieren, wurden die Kollagenfragmente mittels immunhistochemischer Färbung mit dem Primär-AK: *Kollagenneoepitope C1, C2*; (IBEX Technologies; Montreal-Quebec) und dem Sekundär-AK: *Goat anti rabbit- IgG* (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA-USA) wie in Abschnitt 2.8 beschrieben angefärbt. Ausgewertet wurde in der papillären Dermis mit Hilfe von *ImageJ*[®].

3.2.1 Bestimmung der Gesamt- Kollagenpackungsdichte

Um eine Aussage über die Kollagenpackungsdichte zu treffen wurden die Präparate mit Picro-Sirius-Rot wie in Abschnitt 2.7 beschrieben gefärbt und mit Hilfe von *ImageJ*[®] ausgewertet.

In den intrinsischen Gruppen ließ sich beobachten, dass die Packungsdichte durch OVX signifikant erhöht wurde. Zwischen Kontrollgruppe *S,P* und E₂-Gruppe *X,E₂* ließ sich kein signifikanter Unterschied beobachten.

In den extrinsischen Gruppen führte die UVB-Bestrahlung zu einer signifikanten Verringerung der Packungsdichte der ovariectomierten *X, P-UVB Gruppe* sowohl gegenüber der unbestrahlten Gruppe (*X,P*), als auch gegenüber unbestrahlten und bestrahlten Kontrolltieren (*S,P* und *S,P-UVB*).

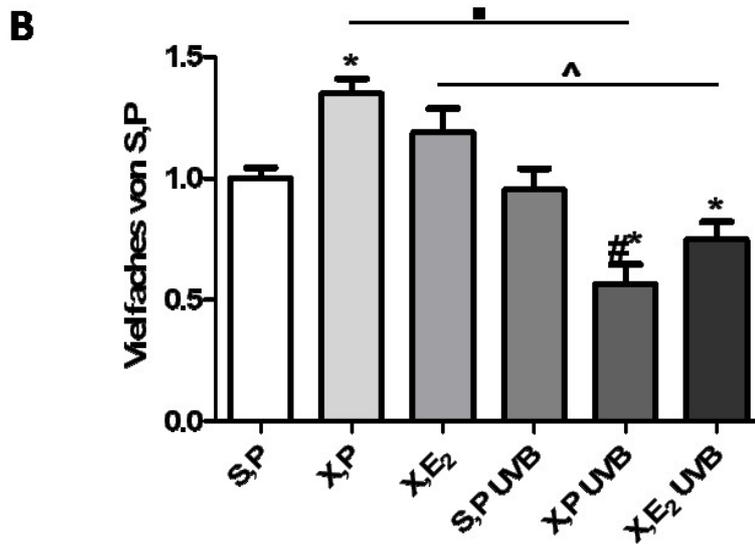
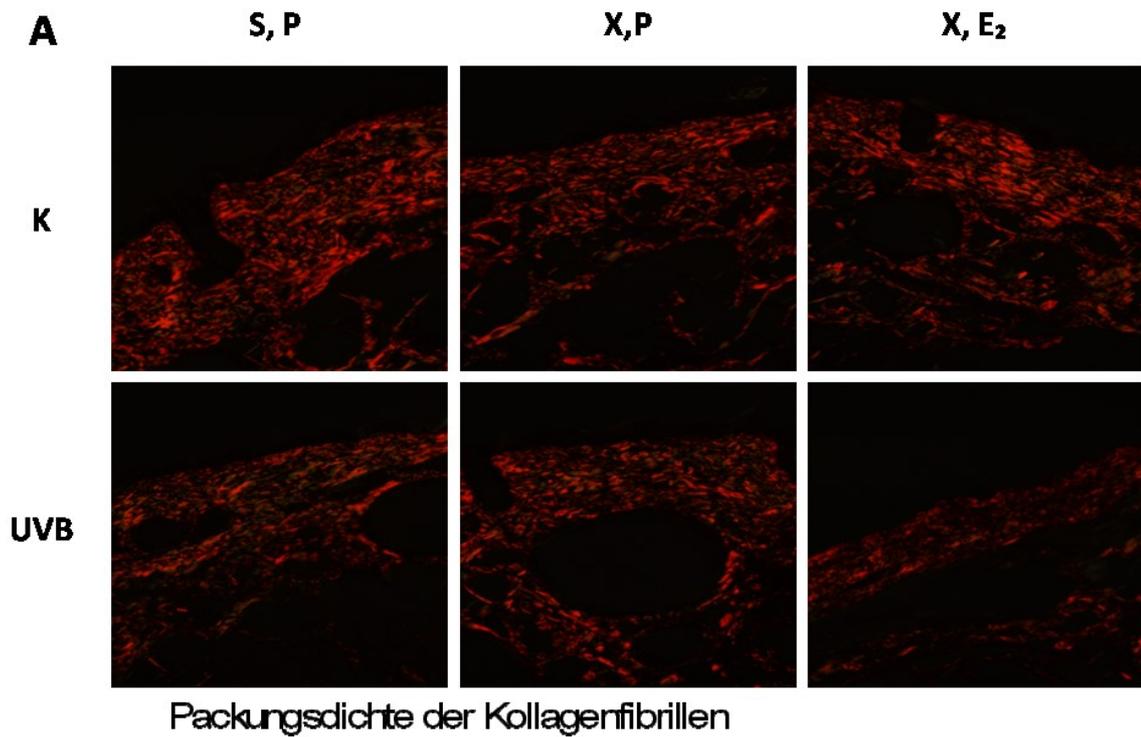


Abbildung 5: Darstellung der Packungsdichte von Kollagenfasern anhand der Picosirius-Rot-Färbung der murinen Hautbiopsien. Dargestellt wird die quantitative Bildauswertung mittels ImageJ® als vielfaches der Kontrolle. S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet. X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen-Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen-Pellet und UVB Exposition. (A) Repräsentative, mikroskopische Bilder unter Polarisationslicht der konventionellen Färbung Picosirius-Rot zur Darstellung der Packungsdichte der Kollagenfasern der papillären Dermis in 100 x Vergrößerung mit einer Schnittdicke von 14 µm. (B): Quantitative Auswertung des Gesamtkollagengehaltes durch Bestimmung der Packungsdichte der Kollagenfibrillen. n= 3-5, Mittelwert ± SEM; *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB; ■, p < 0,05 gegenüber X,P; ●, p < 0,05 gegenüber X, P UVB; ^, p < 0,05 gegenüber X, E

3.2.2 Quantifizierung der Kollagenfragmente

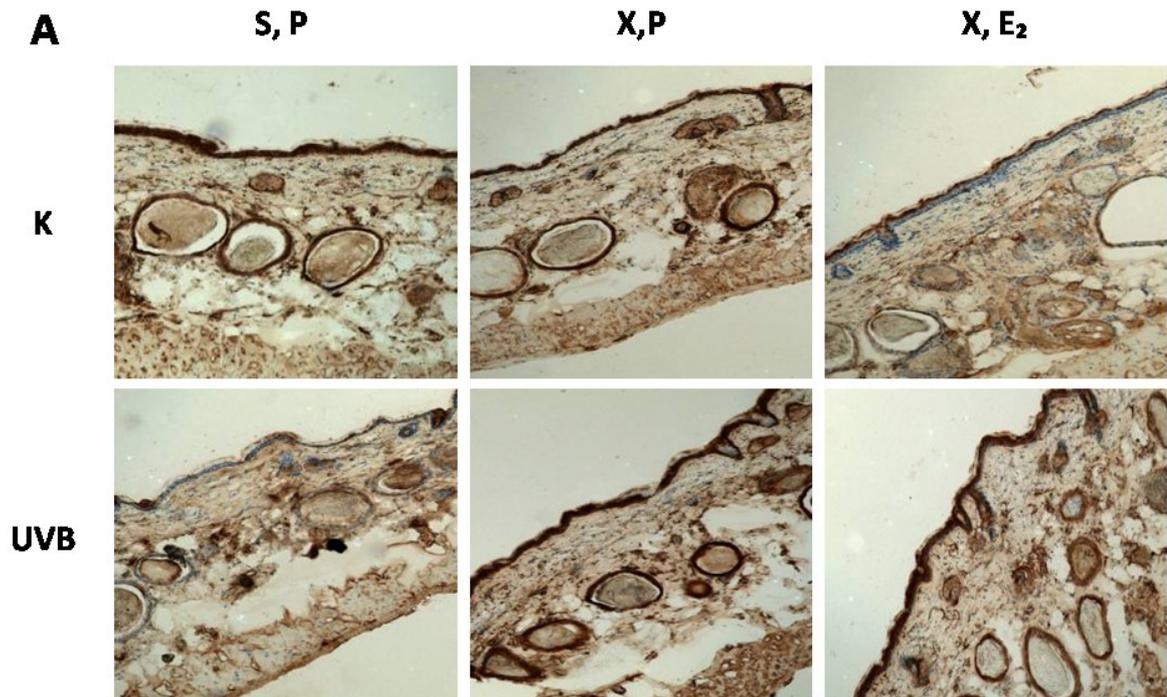
In den intrinsischen Gruppen ließ sich unter OVX ein signifikanter Anstieg von Kollagenfragmenten in der papillären Dermis gegenüber der Kontrollgruppe *S,P* beobachten. Die E₂- Substitution hingegen halbierte die Entstehung von Kollagenfragmenten im Vergleich mit der OVX Gruppe, sowie reduzierte die Anzahl kollagener Neoepitope gegenüber der Kontrollgruppe *S,P* tendenziell, aber nicht signifikant (vgl. Abb. 6).

Unter UVB-Bestrahlung zeigte sich in der Kontrollgruppe *S,P UVB* ein signifikanter Anstieg von Kollagenfragmenten gegenüber dem intrinsischen Kontrollniveau *S,P*. Zudem enthemmte die OVX das Auftreten von Kollagenfragmenten weiter. In der ovariektomierten Gruppe *X,P UVB* schien die UVB-Bestrahlung jedoch den absoluten Wert nicht mehr weiter zu beeinflussen (vgl. *S,P UVB* versus *X,P UVB*).

In den extrinsischen Gruppen ließ sich dementsprechend insgesamt keine signifikante Korrelation zwischen E₂-Gehalt und Ausmaß der Kollagenfragmentbildung ausmachen. Jedoch schien die E₂-Substitution die Entstehung von Kollagenfragmenten tendenziell zu minimieren.

Interessanterweise zeigte sich durch E₂-Behandlung und UVB-Bestrahlung ein geringerer, nicht signifikanter Anstieg der Kollagenfragmente wie es unter Ovariektomie und zeitgleicher Bestrahlung der Fall war.

Zusammenfassend konnte unter UVB-Bestrahlung ein erhöhter Anstieg von Kollagenfragmenten in der papillären Dermis nachgewiesen werden. Zum anderen schien ein erhöhter E₂-Gehalt der Entstehung von Kollagenfragmenten entgegenzuwirken.



Kollagenfragmente

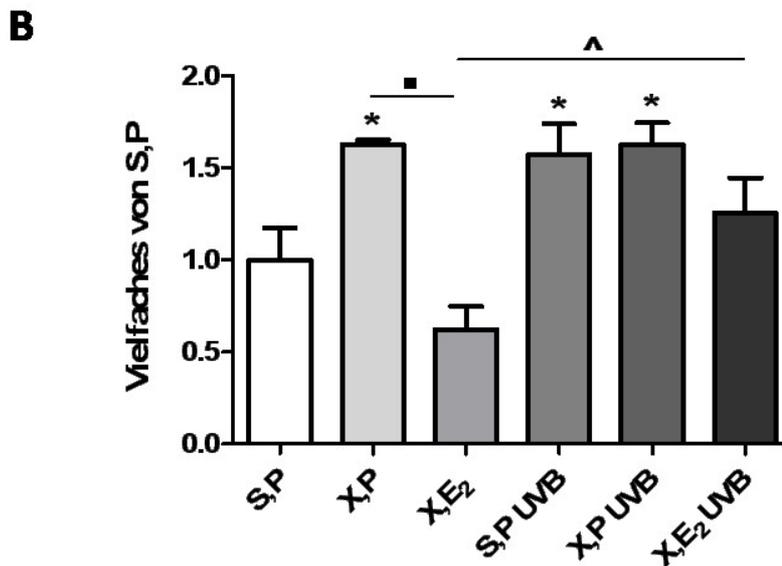


Abbildung 6: Kollagenfragmentgehalt der murinen Dermis nach in Abschnitt 2.2- 2.3 beschriebener Behandlung. Immunhistochemische Färbung der murinen Hautbiopsien. Dargestellt wird die quantitative Bildauswertung mittels ImageJ® als vielfaches der Kontrolle. S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet. X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen-Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet und UVB- Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen-Pellet und UVB Exposition. **(A)** Repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbung der Kollagenfragmente der murinen Dermis in 100 x Vergrößerung mit einer Schnittdicke von 14 µm **(B)**: Quantifizierung des Kollagenfragmentgehaltes wie in Abschnitt 2.7 beschrieben.; n= 5-12, Mittelwert ± SEM; *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB; ■, p < 0,05 gegenüber X,P; ^, p < 0,05 gegenüber X, E₂

3.3 Quantifizierung des Biglykangehaltes in der papillären Dermis

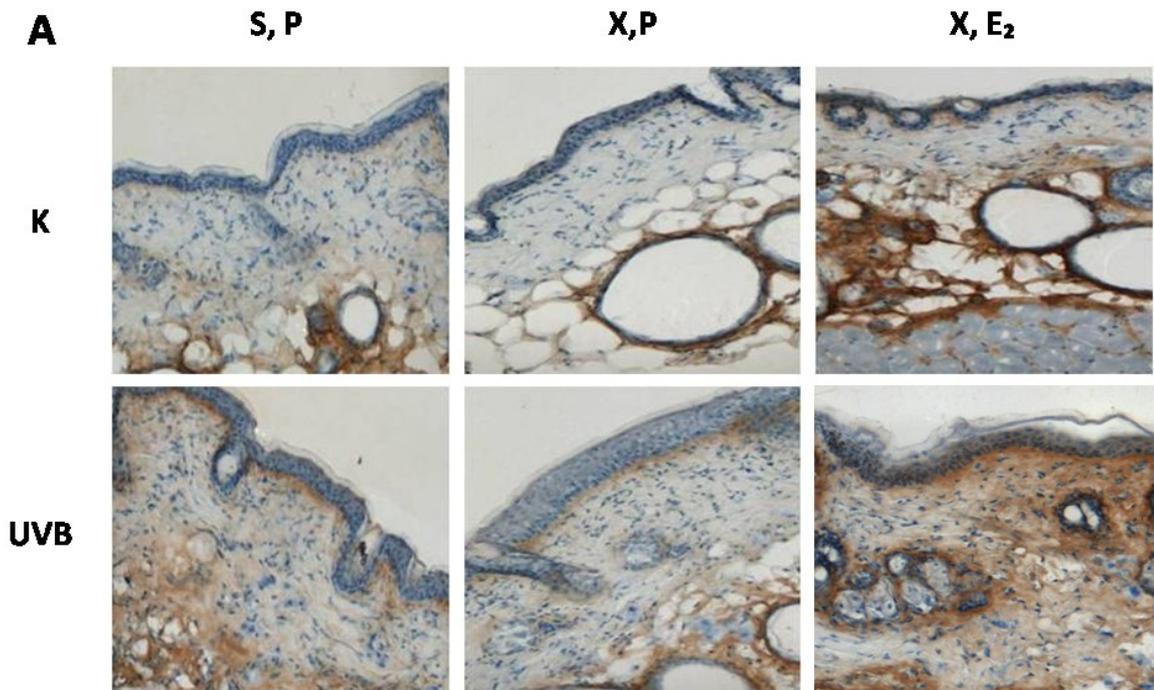
Zur Quantifizierung des Biglykangehaltes in der papillären Dermis wurden die histologischen Präparate immunhistochemisch mit dem primären AK: *LF 159* (zur Verfügung gestellt von: Larry Fisher; NIH-USA) und dem Sekundär-AK: *IgG Anti Rabbit HRP* konjugiert (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA) und wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, angefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit Hilfe von *ImageJ*[®] ausgewertet.

In den intrinsisch gealterten Gruppen hatten sowohl die Ovariectomie (*X,P*) als auch die E₂-Substitution keinen signifikanten Einfluss auf den BGN-Gehalt der Dermis. Interessanterweise gelang zudem kein quantitativer immunhistochemischer Nachweis von BGN in der Dermis ovariectomierter Tiere im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle.

Extrinsische Alterung durch UVB-Bestrahlung (*S,P-UVB Gruppe*) führte zu einer tendenziellen Erhöhung von BGN in der Dermis im Vergleich mit der unbestrahlten Kontrollgruppe (*S,P*).

In allen bestrahlten und ovariectomierten Tieren (*X,P-UVB*) konnten geringe Mengen BGN in der Dermis nachgewiesen werden. Diese Induktion war jedoch weder gegenüber den unbestrahlten Tieren (*X,P*) noch gegenüber den Kontrollgruppen (*S,P* und *S,P-UVB*) signifikant.

Die Substitution mit E₂ (*XE₂-UVB*) führte zu einer ausgeprägten Erhöhung des BGN-Gehalts in den extrinsisch gealterten Tieren gegenüber allen anderen Gruppen (vgl. Abb. 7).



Biglykangehalt

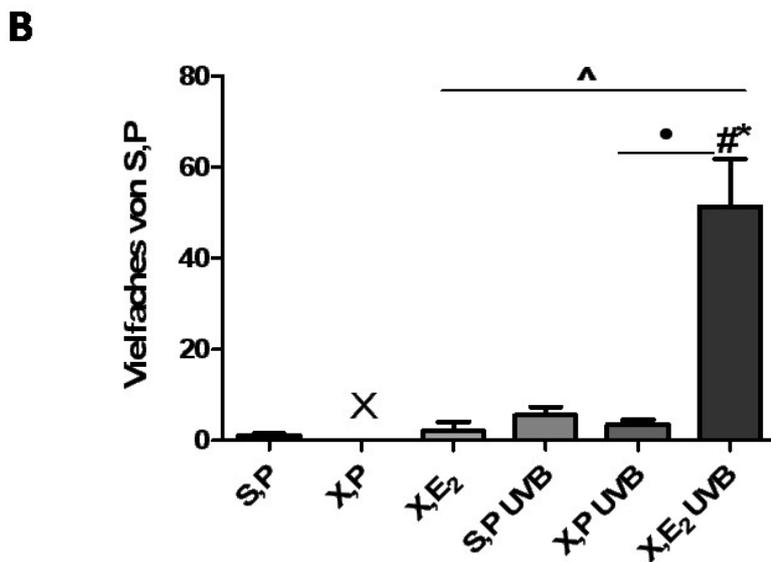


Abbildung 7: Biglykangehalt der murinen Dermis nach in Abschnitt 2.1 beschriebener Behandlung. Immunhistochemische Färbung der murinen Hautbiopsien. Dargestellt wird die quantitative Bildauswertung mittels ImageJ® als vielfaches der Kontrolle. S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet. X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen-Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen-Pellet und UVB Exposition. (A) Repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbung des Biglykangehalt der murinen Dermis in 100 x Vergrößerung mit einer Schnittdicke von 14 µm. (B): Quantitative Auswertung des Gesamtbiglykangehaltes. n= 3-5, Mittelwert ± SEM; *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB; ■, p < 0,05 gegenüber X,P; ● p < 0,05 gegenüber X, P UVB; ^, p < 0,05 gegenüber X, E₂

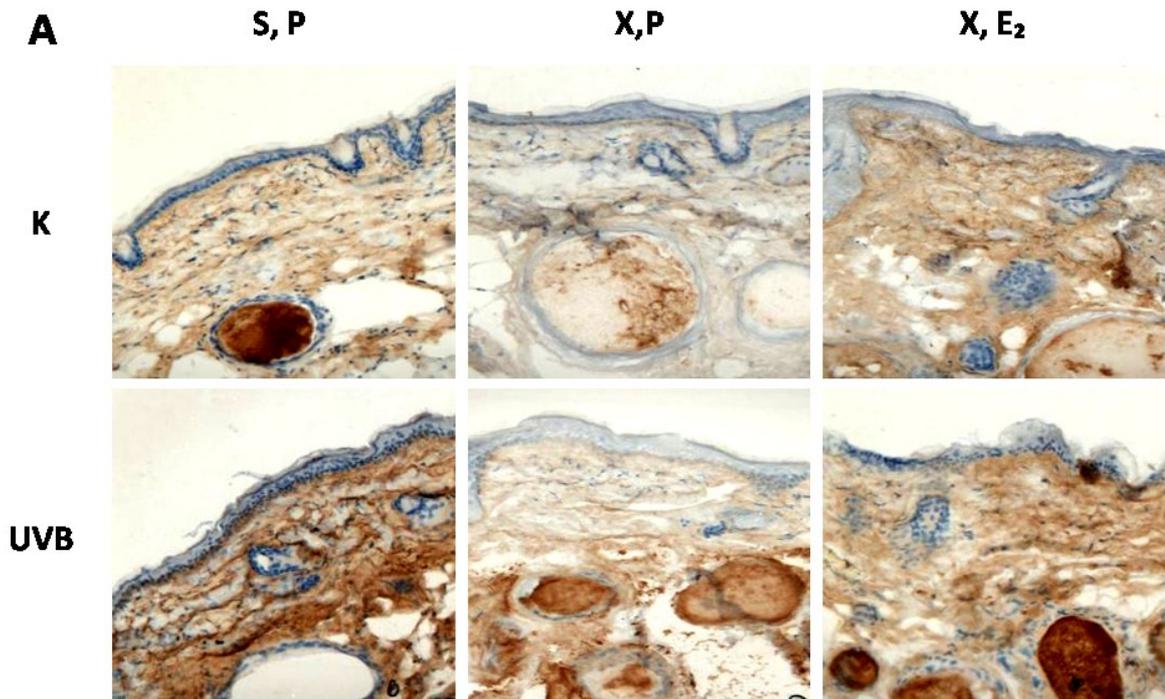
3.4 Quantifizierung des Lumikangehaltes in der papillären Dermis

Lumikan wurde immunhistochemisch mit dem primären AK: *goat anti Lumican* (zur Verfügung gestellt von Larry Fisher; NIH-USA) und dem sekundären AK: *donkey anti goat HRP* konjugiert (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz CA-USA) und wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, angefärbt. Ausgewertet wurden die quantitativen Daten mithilfe von *ImageJ*[®].

In den intrinsisch gealterten Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied des Lumikangehaltes zwischen den einzelnen Gruppen ausmachen. Die durchgeführte Ovariectomie führte lediglich zu einer nicht signifikanten, tendenziellen Reduktion des Lumikangehaltes gegenüber der Kontroll- und der E₂-Gruppe. Die E₂-Substitution steigerte das dermale Lumikanvorkommen nicht signifikant.

Die UVB-Bestrahlung, im Sinne der extrinsischen Hautalterung, führte zu einem signifikanten Anstieg des Lumikangehaltes in der papillären Dermis der bestrahlten Kontrollgruppe, *S,P-UVB* im Vergleich zur unbestrahlten Kontrollgruppe *S,P*. Dies setzte sich als Trend in den bestrahlten E₂- und ovariectomierten Gruppen im Vergleich mit den jeweils unbestrahlten Gruppen fort, ohne jedoch signifikante Ausmaße anzunehmen.

Die E₂-Depletion führte zu einem signifikanten Verlust von Lumikan in der papillären Dermis gegenüber der bestrahlten Kontrolle *S,P-UVB* und auch tendenziell gegenüber der bestrahlten *X,E₂-UVB* Gruppe. Die Östrogensubstitution konnte den dermalen Lumikangehalt nur gegenüber den intrinsischen Kontrolltieren erhöhen (*S,P*), allerdings nicht gegenüber den extrinsischen Kontrolltieren (*S,P-UVB*).



Lumikangehalt

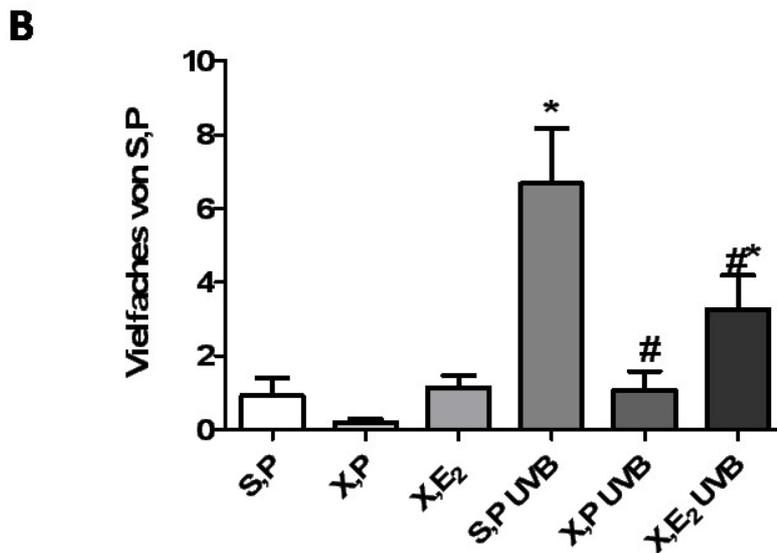


Abbildung 8: Gesamtlumikangehalt der murinen Dermis nach in Abschnitt 2.1 beschriebener Behandlung. Immunhistochemische Färbung der murinen Hautbiopsien, Dargestellt wird die quantitative Bildauswertung mittels ImageJ® als vielfaches der Kontrolle. S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet. X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen-Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen-Pellet und UVB Exposition. (A) Repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbung des Lumikangehalt der murinen Dermis in 100 x Vergrößerung mit einer Schnittdicke von 14 µm. (B): Quantitative Auswertung des Lumikangehaltes in der murinen Dermis. n= 5-12, Mittelwert ± SEM. *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB;

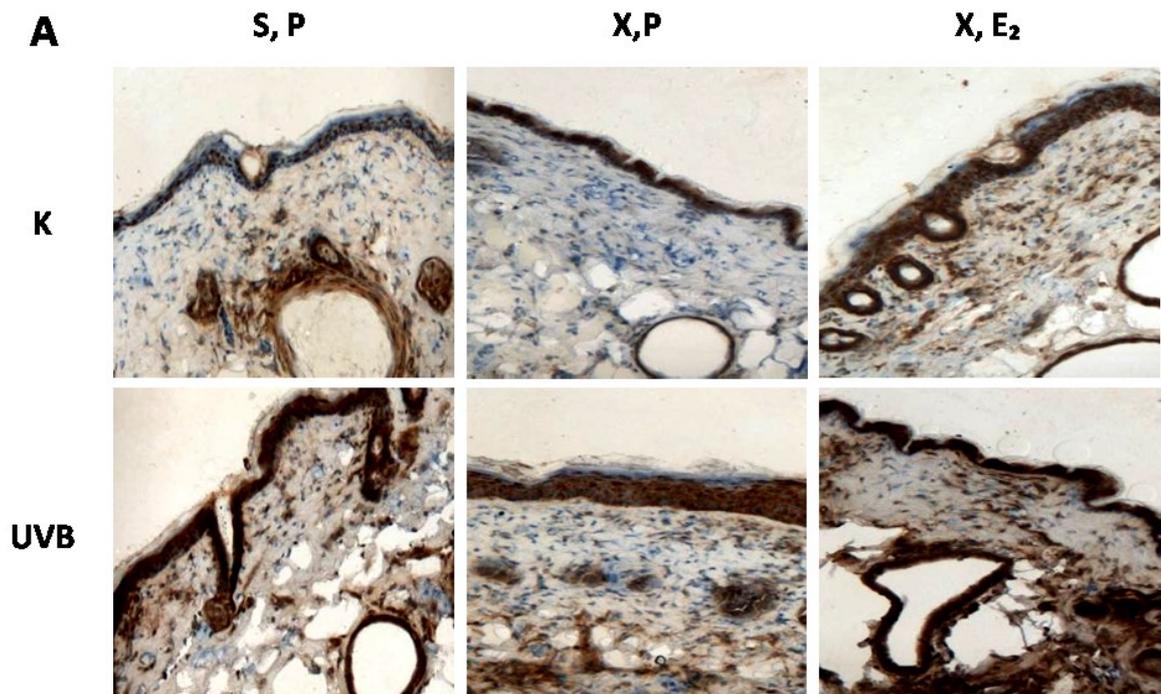
3.5 Quantifizierung des Versikangehaltes in der papillären Dermis

Um Veränderungen des Versikangehaltes in der papillären Dermis festzustellen wurde Versikan mit Hilfe des primären AK, *LF 99* (zur Verfügung gestellt von: Larry Fisher; NIH-USA) sowie dem sekundären AK IgG *Anti Rabbit HRP* (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA-USA), wie in Abschnitt 2.8 erklärt, angefärbt. Da Versikan hauptsächlich in der Epidermis angetroffen wird, wurde die Färbeintensität so eingestellt, dass sie zu einem erkennbaren Signal in der papillären Dermis führt. Dadurch konnte der dermale Versikangehalt mithilfe von *ImageJ*[®] ausgewertet werden.

In den intrinsisch gealterten Gruppen zeigte sich in der *X,E₂-Gruppe* ein signifikant erhöhter Versikangehalt der papillären Dermis gegenüber der Kontrollgruppe *S,P*, sowie der OVX Gruppe *X,P*. Die E₂-Depletion hatte demgegenüber keinen signifikanten Effekt (vgl. Abb. 9).

In den extrinsisch gealterten, d.h. UVB-bestrahlten Tieren der Kontrollgruppe *S,P-UVB* konnte ein signifikanter Anstieg des dermalen Versikangehaltes im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrollgruppe *S,P* detektiert werden. Ähnliches ließ sich in der OVX behandelten Gruppe *X,P-UVB* beobachten. Rein östrogenbedingte Einflüsse führten in den extrinsisch gealterten Tiergruppen zu keinen wesentlichen Veränderungen im dermalen Versikangehalt (*X,P-UVB* und *S,P-UVB* versus *X,E₂-UVB*), auch wenn die E₂-Substitution auch hier den Versikangehalt tendenziell erhöhen konnte.

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass sowohl die extrinsische Hautalterung durch UVB-Bestrahlung als auch die E₂-Substitution den Versikangehalt in den jeweiligen Gruppen erhöhen konnten.



Versikangehalt

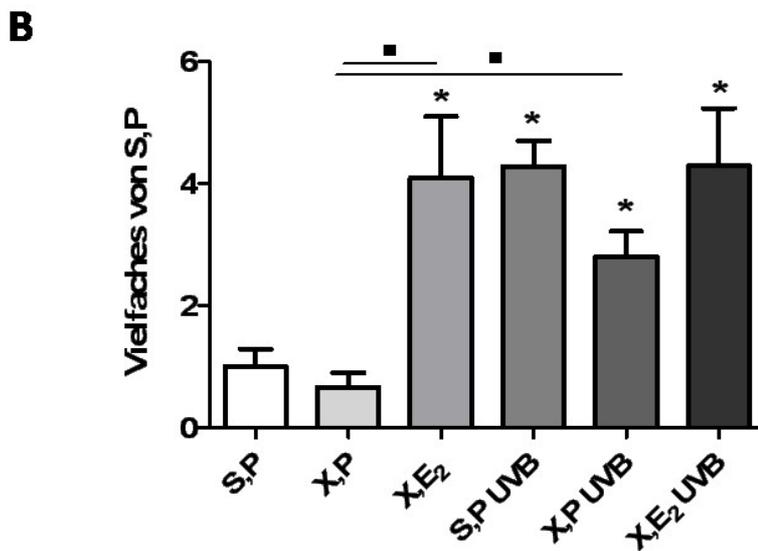


Abbildung 9: Versikangehalt in der murinen Dermis nach in Abschnitt 2.1-2-3 beschriebener Behandlung. Immunhistochemische Färbung der murinen Hautbiopsien, Dargestellt wird die quantitative Bildauswertung mittels ImageJ® als vielfaches der Kontrolle. S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet, X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen-Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen-Pellet und UVB-Exposition. **(A)** Repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbung des Versikangehalt der murinen Dermis in 100 x Vergrößerung mit einer Schnittdicke von 14 µm. **(B)** Quantifizierung des Versikangehaltes in der immunhistochemischen Färbung. n= 5-12, Mittelwert ± SEM, *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB; ■, p < 0,05 gegenüber X,P;

3.6 Quantifizierung der Proliferationsrate der papillären Dermis

Die Expression des Ki-67 Antigens ist assoziiert mit der Zellproliferation. Es ist in allen Phasen des Zellzyklus, außer der G₀-Phase, im Nukleus detektierbar und ist ein etablierter immunhistochemischer Proliferationsmarker. Da die EZM einen entscheidenden Einfluss auf die Anzahl der proliferierenden Zellen sowie die Proliferationsrate ausübt, wurden die Proben mit dem primären AK: *anti Ki-67* (Novus Biologicals; USA) und dem sekundären AK: *anti Rabbit-IgG*, HRP konjugiert (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, Kalifornien, USA), wie in Abschnitt 2.8 beschrieben, angefärbt und mithilfe von *ImageJ*[®] ausgewertet, um so die Anzahl der proliferierenden Zellen zu bestimmen.

In den intrinsisch gealterten Gruppen ließ sich nachweisen, dass eine E₂-Substitution zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl proliferierender Zellen sowohl gegenüber der Kontrollgruppe *S,P* als auch gegenüber der ovariectomierten Gruppe *X,P* führte. Die Ovariectomie führte nicht zu einer Reduktion der Anzahl proliferierender Zellen gegenüber der Kontrollgruppe *S,P*.

In den extrinsisch gealterten Gruppen ließ sich ein signifikanter Anstieg der proliferierenden Zellen in der bestrahlten Kontrollgruppe *S,P-UVB* gegenüber der unbestrahlten Gruppe *S,P* verzeichnen.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass, ähnlich den Ergebnissen der intrinsischen Hautalterung (s.o.), eine signifikant erhöhte Anzahl an proliferierenden Zellen in der bestrahlten *X,E₂-UVB* Gruppe gegenüber der bestrahlten Kontrollgruppe *S,P-UVB* Gruppe und auch gegenüber den bestrahlten, ovariectomierten Tieren (*X,P-UVB*) zur Darstellung kommt.

In den extrinsischen Gruppen zeigte sich somit wie im intrinsischen Prozess der Hautalterung eine Korrelation zwischen E₂-Gehalt und Anzahl der proliferierenden Zellen. Die bestrahlte, E₂-behandelte Gruppe *X,E₂-UVB* wies dementsprechend die höchste Anzahl an proliferierenden Zellen auf, während die Ovariectomie zwar die Anzahl proliferierender Zellen reduzierte, dies jedoch nicht signifikant (vgl. Abb. 10).

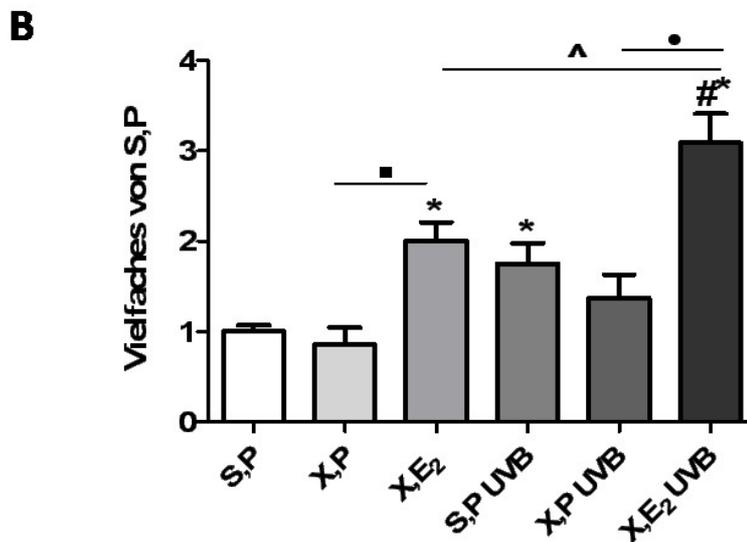
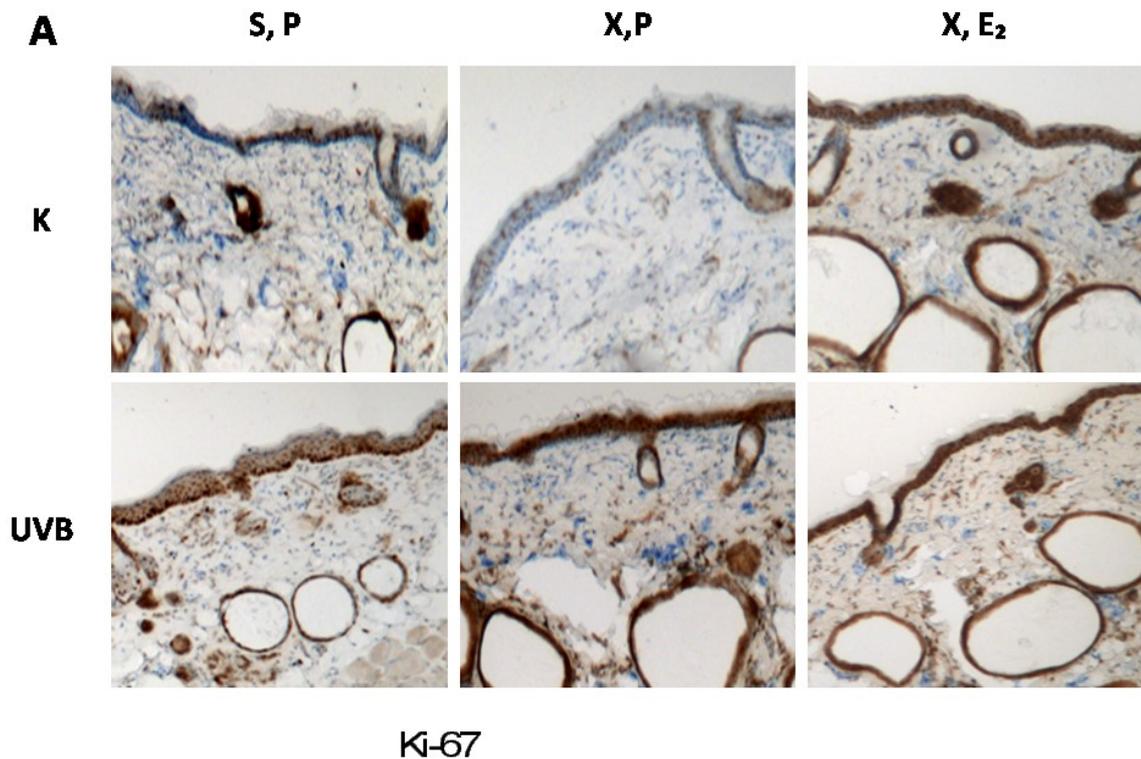


Abbildung 10: Anzahl der proliferierenden Zellen in der murinen Dermis nach 10-wöchiger Bestrahlungspause und E₂ Behandlung wie in Abschnitt 2.1-2.3 beschrieben. Immunhistochemische Färbung der murinen Hautbiopsien, Dargestellt wird die Anzahl der visuell gezählten positiv markierten Zellkerne pro Bildausschnitt als vielfaches der Kontrolle. S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet. X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen-Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen-Pellet und UVB Exposition. (A) Repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbung der Proliferationsrate der murinen Dermis in 100 x Vergrößerung mit einer Schnittdicke von 14 µm. (B): Statistische Auswertung der proliferierenden Zellen in der murinen Dermis.; n= 5-12, Mittelwert ± SEM; *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB; ■, p < 0,05 gegenüber X,P; ^, p < 0,05 gegenüber X, P UVB; •, p < 0,05 gegenüber X, E₂

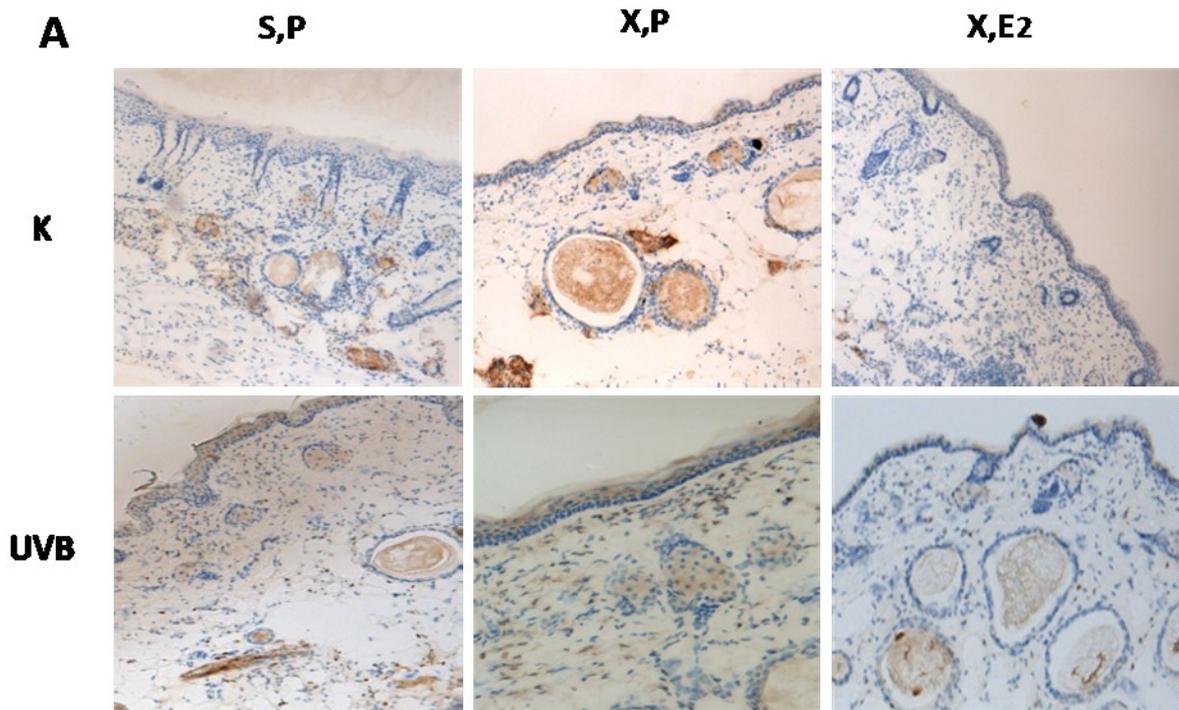
3.7 Quantifizierung der Makrophagenanzahl in der papillären Dermis

Da die EZM ebenfalls einen entscheidenden Einfluss auf dermale Entzündungsreaktionen ausübt, stellte sich die Frage, inwiefern UVB-Bestrahlung und Östrogenspiegel einen Einfluss auf in diesem Versuchsmodell möglicherweise stattfindende Entzündungsreaktionen haben könnten. Dazu wurden die histologischen Schnitte auf die Anzahl von detektierbaren Makrophagen mittels immunhistochemischer Färbung wie in Abschnitt 2.8 beschrieben untersucht und mit Hilfe von *ImageJ*[®] ausgewertet. Als primärer AK wurde MAC2 (Cederlane Laboratories; Burlington, Ontario-Canada) und als sekundärer AK *Anti rat IgG2a HRP* konjugiert (Novus Biologicals; USA) eingesetzt.

In den intrinsischen Gruppen ließ sich nachweisen, dass die OVX die Anzahl der detektierbaren Makrophagen im Vergleich sowohl zur Kontroll- (*S,P*) als auch zur E₂- behandelten Gruppe (*X,E₂*) signifikant ansteigen ließ. Passend dazu konnte die durchgeführte E₂-Substitution das Auftreten von dermalen Entzündungszellen gegenüber den ovariektomierten Tieren (*X,P*) signifikant und gegenüber den Kontrolltieren (*S,P*) tendenziell reduzieren.

In den extrinsischen Gruppen führte die UVB-Bestrahlung in allen bestrahlten Gruppen im Vergleich mit der jeweiligen unbestrahlten Gruppe zu einer signifikant erhöhten Anzahl der detektierbaren Makrophagen.

Die extrinsischen Gruppen wiesen im Hinblick auf einen möglichen E₂-Einfluss keinerlei signifikante Unterschiede auf (vgl. Abb. 11).



Makrophagen

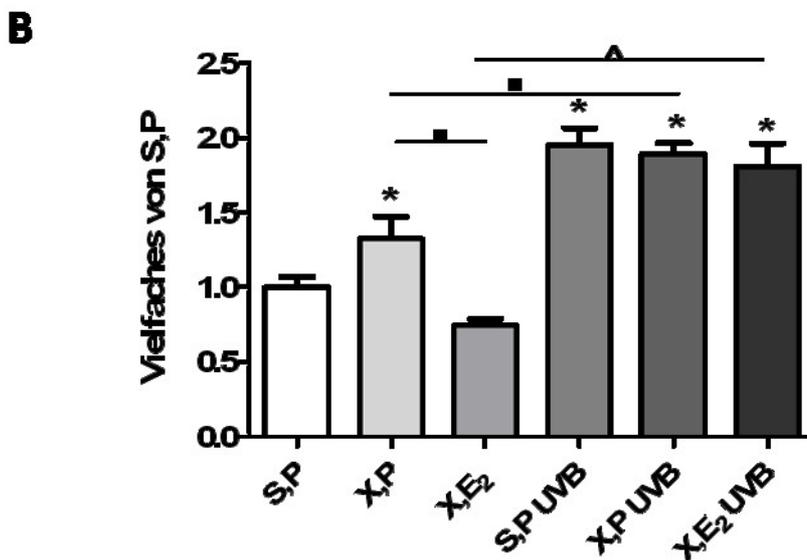


Abbildung 11: Detektion der Makrophagen in muriner Dermis nach 10-wöchiger Bestrahlungspause und E₂- Behandlung wie in Abschnitt 2.1-2.3 beschrieben. Immunhistochemische Färbung der murinen Hautbiopsien, Dargestellt wird die Anzahl der visuell gezählten Mac-2 positiv markierten pro Bildausschnitt als vielfaches der Kontrolle. S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet. X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen- Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen-Pellet und UVB Exposition. **(A)** Repräsentative, lichtmikroskopische Bilder der immunhistochemischen Färbung der Mac-2 positiven Zellen der murinen Dermis in 100 x Vergrößerung mit einer Schnittdicke von 14 µm. **(B)**: Statistische Auswertung der Mac-2 positiven Zellen in der murinen Dermis. n= 5- 12; Mittelwert ± SEM; *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB; ■, p < 0,05 gegenüber X,P; ^, p < 0,05 gegenüber X, E₂

3.8 Auswertung der an den Wasserhaushalt gebundenen Hautparameter

In der vorliegenden Arbeit wurde zusätzlich zur histologisch-strukturellen Quantifizierung überprüft, inwiefern sich funktionelle, d.h. qualitative Hautparameter während der intrinsischen und extrinsischen Hautalterung sowie unter Beeinflussung des Östrogenspiegels verändern. Dazu wurden zum einen der Hydratationsgrad sowie der trans-epidermale Wasserverlust mit Hilfe von Geräten der Reihe *DermaLab® Skin Analysis System* der Firma Cortex Technology (Hadsund, Dänemark) analysiert. Darüber hinaus wurden die Hautparameter Viskoelastizität und *Young's modulus* untersucht.

3.8.1 Hydratationsgrad und trans-epidermaler Wasserverlust

Der geringste Hydratationsgrad in den intrinsisch gealterten Gruppen ließ sich in der ovariektomierten Gruppe X,P finden. Dieser war sowohl gegenüber Kontrollen (S,P), als auch gegenüber den E_2 -substituierten Tieren (X,E_2) signifikant reduziert. Zwischen der Kontrollgruppe sowie der E_2 -behandelten Gruppe ließ sich jedoch nur ein tendenzieller Unterschied zugunsten einer E_2 -Behandlung ausmachen.

In den extrinsisch gealterten Gruppen führte die chronische UV-Bestrahlung zu einem signifikant geringeren Hydratationsgrad im Vergleich mit der jeweiligen intrinsisch gealterten Gruppe in den Kontroll- sowie der OVX-Gruppen (S,P versus $S,P-UVB$ und X,P versus $X,P-UVB$). Die E_2 -Substitution konnte diesem Effekt teilweise entgegenwirken. So kam es in der Gruppe X,E_2-UVB trotz UVB-Exposition nicht zu einer signifikanten Reduktion des Flüssigkeitsgehaltes der Haut im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollen S,P (vgl. Abb. 12).

Die Ergebnisse des transepidermalen Wasserverlustes fielen insgesamt uneinheitlich aus. Lediglich tendenziell lag der transepidermale Wasserverlust in der E_2 -behandelten Gruppe X,E_2 höher als in der Kontrollgruppe S,P und östrogensupprimierten Gruppe X,P . Somit hatte weder die Ovariektomie noch die E_2 -Substitution einen Einfluss auf den Wasserverlust (vgl. Abb. 12).

Die UVB-Bestrahlung führte in den extrinsischen Gruppen mit Ausnahme der ovariektomierten Gruppe $X,P-UVB$ gegenüber den intrinsischen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des transepidermalen Wasserverlustes. In der Tendenz erhöhte somit die UVB-Exposition den transepidermalen Flüssigkeitsverlust, während die Ovariektomie diesen Effekt begrenzen konnte (vgl. Abb.12).

3.8.2 Auswertung des *Young's modulus* und der Viskoelastizität

Unter intrinsischer Hautalterung ließ sich bei der Auswertung der Messdaten bezüglich des Young's modulus (Y_{mo}), welcher die Steifheit der Haut beschreibt, insgesamt kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (S,P ; X,P und X,E_2) ausmachen. Lediglich tendenziell wies die E_2 -behandelte Gruppe den geringsten Y_{mo} auf, während die Ovariectomie zu einer Steifigkeitszunahme führte (vgl. Abb. 12).

Unter via UVB-Bestrahlung induzierter extrinsischer Hautalterung zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Y_{mo} in der E_2 -behandelten Gruppe (X,E_2 -UVB) gegenüber Kontrollen (S,P -UVB) und ovariectomierten Tieren (X,P -UVB). Da jedoch auch die Ovariectomie den Y_{mo} gegenüber der extrinsischen Kontrollgruppe S,P -UVB in der Tendenz steigern konnte, war kein unidirektionaler Einfluss unterschiedlicher Östrogenspiegel in diesem Zusammenhang nachweisbar. Sowohl in den Kontrollgruppen, (S,P versus S,P -UVB) als auch in den ovariectomierten Gruppen (X,P versus X,P -UVB) ließ sich zwischen intrinsischer und extrinsischer Hautalterung kein Unterschied festmachen.

Im Bezug auf die Viskoelastizität kam es während der intrinsischen Hautalterung in der E_2 -behandelten Gruppe zu einem signifikanten Verlust dieser im Vergleich zur Kontroll- sowie der ovariectomierten Gruppe. Zudem reduzierte auch die Ovariectomie die Viskoelastizität gegenüber der Kontrollgruppe, ohne jedoch ein signifikantes Ausmaß zu erreichen (vgl. Abb. 12). Insgesamt waren die Ergebnisse bei unterschiedlichen Östrogenspiegeln somit – passend zum oben dargestellten Y_{mo} – uneinheitlich.

Zwischen intrinsisch gealterten Gruppen und extrinsisch gealterten Gruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied ausmachen, sodass die UVB-Exposition hier keinen relevanten Einfluss hatte (vgl. Abb. 12).

Im Hinblick auf einen potenziellen Östrogeneinfluss zeigte sich, dass in den intrinsischen und extrinsischen Gruppen die E_2 -behandelten Gruppen den geringsten Wert für die Viskoelastizität vorwiesen, welcher jedoch jeweils nur gegenüber der intrinsischen Kontrollgruppe S,P signifikant reduziert war.

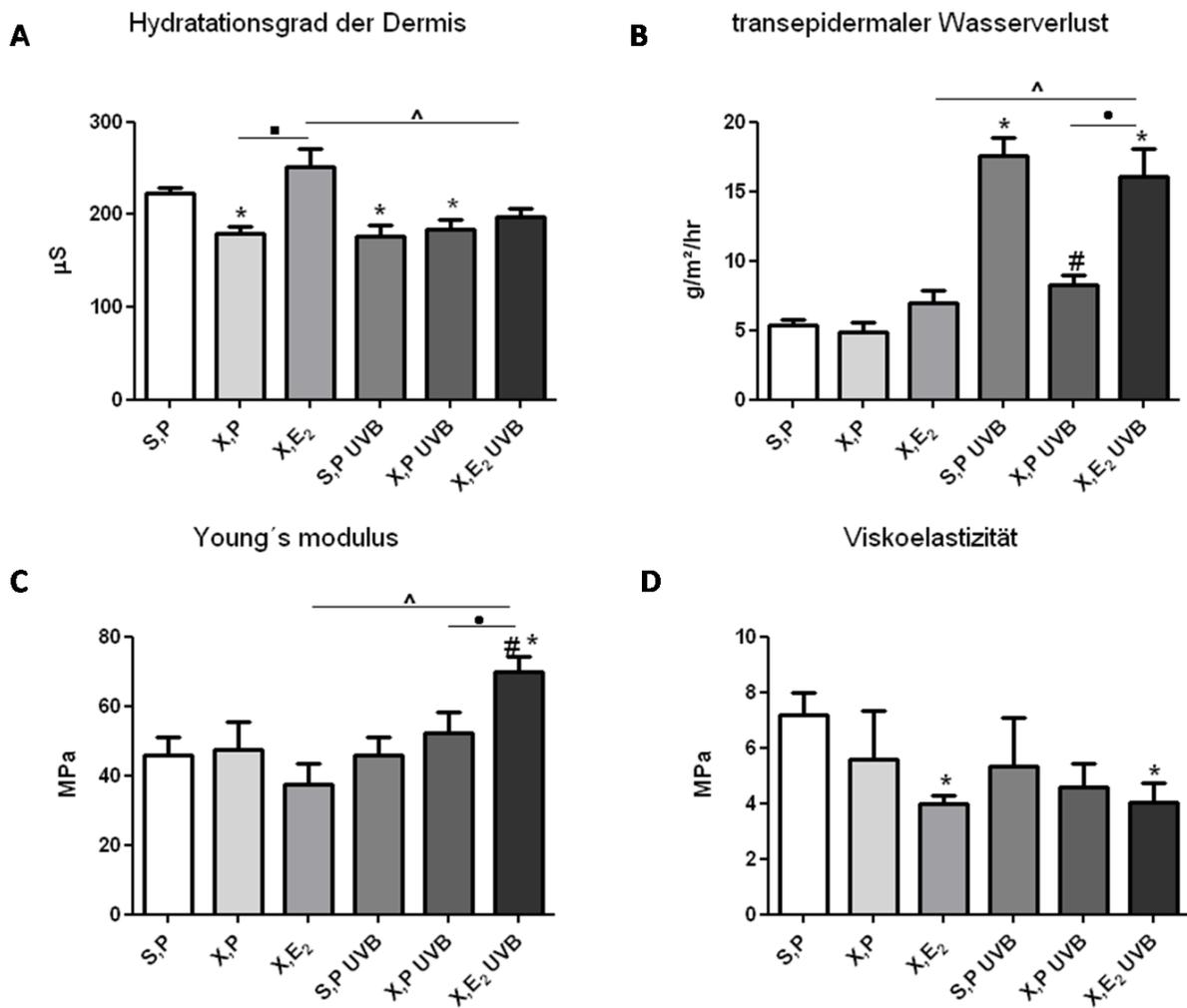


Abbildung 12: Erfassung der Hautparameter wie in Abschnitt 2.5 beschrieben. (A): Statistische Auswertung des Feuchtigkeitsgehalts der murinen Dermis. Erfassung der Leitfähigkeit in μS . S,P: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet, X,P: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet. X,E₂: Ovariectomierte Tier mit Östrogen- Pellet. S,P UVB: Kontrollgruppe (sham operiert) mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,P UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Placebo-Pellet und UVB-Exposition. X,E₂ UVB: Ovariectomierte Gruppe mit Östrogen-Pellet und UVB Exposition. **(B):** Statistische Auswertung des transepidermalen Wasserverlustes. **(C):** Statistische Auswertung der benötigten Kraft um die Kutis anzuheben (entsprechend Ymo), angegeben in Mpa. **(D):** Statistische Auswertung der Hautelastizität, angegeben in MPa. n= 5- 12; Mittelwert \pm SEM; *, p < 0,05 gegenüber S,P; #, p < 0,05 gegenüber S,P UVB; ■, p < 0,05 gegenüber X,P; ● p < 0,05 gegenüber X, P UVB; ▲, p < 0,05 gegenüber X, E₂

4. Diskussion

4.1 Veränderung des HA-Gehaltes

4.1.1 Veränderungen des HA-Gehaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

In der vorliegenden Arbeit führte eine 30-wöchige E₂-Depletion durch OVX in der intrinsisch gealterten Gruppe (*X,P*) zu einem tendenziell, jedoch nicht signifikant, verringerten HA-Gehalt in der papillären Dermis. Diese Reduktion des dermalen HA-Gehaltes könnte Folge umfassender *Remodellingvorgänge* der EZM zu sein, wozu auch der Abbau von HA gehört [65]. Ähnliche Effekte konnten bereits von anderen Autoren an Affen und haarlosen Mäusen beobachtet werden [85-87]. Interessanterweise konnte eine E₂-Substitution ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf den dermalen HA-Gehalt nehmen, sodass der HA-Gehalt in der Gruppe *X,E₂* sogar tendenziell vermindert nachweisbar war und nicht das Kontrollniveau (*S,P*) erreicht hat (vgl. 3.1).

Im Gegensatz hierzu konnte von anderen Autoren ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen E₂-Substitution und HA-Gehalt gezeigt werden. Lokal appliziertes Östrogen auf gealterte Haut von postmenopausalen Frauen führte zu einem Anstieg der GAG und somit zu einer erhöhten Hydratation und einer Verbesserung des Hautbildes [88] sowie zu einer vermehrten Produktion und einem verminderten Abbau von HA in menschlicher Haut [89, 90].

Es ist denkbar, dass die Erhöhung des HA-Gehaltes unter E₂-Substitution über einen Zusammenhang zwischen der Regulation von Östrogen und TGF- β zustande kommt. Östrogen ist in der Lage, die TGF- β ₁ Expression zu erhöhen. Möglicherweise kann Östrogen im Umkehrschluss über den erhöhten TGF- β ₁ Spiegel den HA-Gehalt erhöhen. Letztendlich sind sowohl der genaue Mechanismus einer E₂-induzierten HA-Akkumulation als auch die Verhinderung des durch OVX induzierten HA-Verlustes unklar.

Letztlich scheinen E₂-induzierte Alterationen des dermalen HA-Gehaltes zumindest im vorliegenden Modell der *skh-1* Mäuse und der untersuchten Zeiträume im Rahmen der intrinsischen Hautalterung nur eine untergeordnete Rolle im Vergleich mit der extrinsischen Hautalterung (vgl. 4.1.2) zu spielen. Es ist hierbei anzumerken, dass methodische Unterschiede zwischen der hier durchgeführten E₂-Substitution bzw. Depletion und den o.g. Arbeiten bestehen, welche hauptsächlich auf einem präexistenten Östrogenmangel humaner Probanden (Menopause) bzw. einer vorherigen UVB-Exposition beruhen.

4.1.2. Veränderungen des HA-Gehaltes in der papillären Dermis durch Langzeit UVB Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei Betrachtung der Versuchstiere ohne Eingriff in den Östrogenhaushalt ein signifikanter HA-Verlust in der bestrahlten Kontrollgruppe gegenüber der unbestrahlten Kontrollgruppe.

Somit konnte gezeigt werden, dass chronische UVB-Bestrahlung, trotz nachfolgender Bestrahlungspause, zu einer Reduktion des HA-Gehaltes in der papillären Dermis führte. In aktivisch geschädigter Haut ist ein verminderter HA-Gehalt mit wesentlichen funktionellen Einbußen beschrieben worden [11]. Interessanterweise scheint hierbei der Einfluss von UVB-Bestrahlung auf den HA-Gehalt von der Zeitdauer der UVB-Exposition abhängig zu sein. So konnte gezeigt werden, dass nach 10-wöchiger Bestrahlung der HA-Gehalt zunächst steigt [64], während andere Untersuchungen nachweisen konnten, dass bei einer längeren Bestrahlungsdauer ein Abfall des HA-Gehaltes zu erwarten ist [65, 91]. In vorhergehenden Arbeiten konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass UVB-Bestrahlung zum einen zu einer verminderten Expression der Hyaluronsynthasen 1-3 führt [65] und zum anderen durch induzierte ROS

hochmolekulare HA in niedermolekulare Fragmente [92, 93] spaltet. Zusammenfassend führt UV-Bestrahlung zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen verminderter Expression von Hyaluronsynthasen und vermehrter Expression von Hyaluronidasen zugunsten des HA-Abbaus [65]. Ob es sich in der vorliegenden Arbeit um eine absolute Verminderung des HA-Gehaltes handelt oder ob niedermolekulare HA-Spaltprodukte entstanden sind, ist zu diesem Zeitpunkt unklar und ist Bestandteil weiterführender Untersuchungen. Es ist jedoch denkbar, dass der oben erwähnte Zusammenhang zwischen TGF- β und HA eine Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass UVB-Bestrahlung sowohl zu einer Verringerung des TGF- β -Gehaltes und der Expression des TGF- β Rezeptors führt. TGF- β wiederum führt zu einer starken Induktion der HAS1 und 2 in dermalen Fibroblasten [65]. Somit besteht die Möglichkeit, dass aus der UVB-induzierten Verringerung der TGF- β Expression eine Reduktion des HA-Gehaltes resultiert.

In der Vergangenheit konnte zudem gezeigt werden, dass aktinisch gealterte Haut Grundzüge einer chronischen Hautinflammation aufweist [67, 71]. Zu überlegen gilt es daher, ob ein solcher Prozess zu Veränderungen im HA-Haushalt- bzw. - zu einem HA-Verlust- führen kann. Schon früh konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhtem HA-Gehalt durch lokale Applikation und verbesserter Wundheilung gezeigt werden [94, 95]. In den ersten Phasen der Wundheilung kommt es zu einer raschen Hochregulation von HA in adulter Haut. Nach drei Tagen erreicht die HA-Produktion einen Höhepunkt und fällt danach ab. Anschließend wird HA durch Kollagen ersetzt und es kommt zur Ausbildung von Narbengewebe [96]. In fetaler Haut hingegen findet man über einen längeren Zeitraum einen erhöhten HA-Gehalt. Ein Ersatz von HA durch Kollagen findet nicht statt und es entsteht kein Narbengewebe [96]. Es könnte sein, dass die UVB-Bestrahlung trotz nachfolgender Bestrahlungspause eine chronische Inflammation induziert und sich so u.a. eine Verminderung des HA-Gehaltes manifestiert. Unterstützt würde diese Hypothese durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen quantitativen Daten bezüglich des dermalen Gesamtkollagens.

In den extrinsisch gealterten Gruppen zeigte sich bei gleichzeitiger E₂-Substitution ein signifikant erhöhter HA-Gehalt bei vermindertem HA-Gehalt durch Ovariectomie (im Sinne einer E₂-Defizienz). Somit konnte der bestrahlungsinduzierte HA-Verlust mittels Hormonsubstitution überkompensiert werden. In der Vergangenheit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass in ovariectomierten Tieren eine gestörte Wundheilung mit einer chronischen Inflammation einhergeht. HA scheint als eines der Schlüssel-moleküle im Rahmen diverser Prozesse der Gewebereparation zu fungieren [83, 96]. Es wäre somit denkbar, dass die E₂-Substitution in der vorliegenden Arbeit eine Optimierung der Behebung UV-induzierter Schäden, durch eine konsekutive Erhöhung des HA-Gehaltes, ermöglicht.

4.2 Veränderungen des Kollagenhaushaltes

4.2.1 Veränderungen des Kollagenhaushaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Kollagensynthese induziert und die Aktivität von MMP verringert [89]. Aus diesem Grund wurde erwartet, dass in der vorliegenden Arbeit die E_2 -defizienten Gruppen die geringste Packungsdichte der Kollagenfibrillen, welche mit dem Kollagen Gesamtgehalt korreliert, aufwiesen. Die Ergebnisse des Gesamtkollagengehaltes im Zusammenhang mit einer E_2 -Substitution bzw. einer E_2 -Depletion stellten sich jedoch überraschenderweise uneinheitlich dar. So konnte letztlich innerhalb der intrinsischen Gruppen der höchste Kollagengehalt in einer E_2 -defizienten Gruppe (X,P) detektiert werden, während Kontrolltiere (S,P) und östrogensubstituierte Tiere (X,E_2) einen annähernd konstanten Kollagengehalt aufwiesen.

Dass Östrogen einen positiven Einfluss auf zahlreiche Funktionen der Haut hat und sich u.a. positiv auf die Hautdicke auswirkt, konnte bereits in diversen Untersuchungen nachgewiesen werden [88, 97-99]. Es existieren zudem zahlreiche Studien, welche die Auswirkungen eines Östrogenmangels sowie den Effekt von lokal applizierten östrogenhaltigen Cremes auf die Haut postmenopausaler Frauen untersuchen. Eine E_2 -Defizienz spiegelte sich demnach in einer dünnen Haut sowie einem verminderten Kollagengehalt wieder [100]. Eine eindeutige Erklärung der Diskrepanz zwischen den o.g. Untersuchungsergebnissen und den hier erhobenen Daten fehlt. Es sind jedoch verschiedene Hypothesen in diesem Zusammenhang zu prüfen.

So wäre es beispielsweise denkbar, dass aufgrund der langen Behandlungsdauer der Tiere ein bis dato unbekannter Kompensationsmechanismus gegriffen hat, welcher den Kollagengehalt trotz Hormondepletion erhöht hat. Wie oben erwähnt, wird in Wundgewebe von gealterter Haut Hyaluronsäure abgebaut und durch Kollagen ersetzt, so dass ein narbenartiges Gewebe entsteht. Passend dazu wies die Gruppe X,P ebenfalls den geringsten Hyaluronsäuregehalt aller intrinsischen Gruppen auf.

Weiterhin sind zudem rein technisch bedingt abweichende Werte in Betracht zu ziehen, da im Rahmen der o.g. Studien mit jeweils anderen Versuchszeiträumen, Modellen bzw. Probanden und Hormonkonzentrationen gearbeitet wurde.

Darüber hinaus könnte eine weitere Erklärung in der unterschiedlichen Syntheserate und vor Allem einer Verschiebung der Balance zwischen Synthese und Degradation von Kollagen in aktinisch vs. chronologisch gealterter Haut liegen [101]. Die Annahme eines modifizierten *kollagenen Turnovers* würde zudem erklären, wieso die Gruppe X,P den höchsten Kollagengehalt und gleichzeitig die größte Anzahl an Kollagenfragmenten aufweist.

Des Weiteren zeigte sich eine Erhöhung der Anzahl dermalen Kollagenfragmente in der ovariektomierten Alterungsgruppe sowohl gegenüber der Kontroll- als auch der E_2 -substituierten Gruppe. Bereits in der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Östrogen den Kollagenabbau durch eine verminderte Aktivität von MMP verhindert [89, 102]. Auch die Aktivität der TIMP wurde unter Östrogen erhöht. Durch E_2 -Substitution kam es dementsprechend zu einem reduzierten Kollagenabbau und in der Folge zu einer reduzierten Anzahl von Kollagenfragmenten, was mit wesentlichen funktionellen Konsequenzen einhergehen kann [97]. Weiterhin ist aus anderen Untersuchungen bekannt, dass Östrogen den Abbau von Kollagen verhindert und darüber hinaus parallel die Kollagenablagerung während der Wundheilung begünstigt [83, 103, 104].

Es wäre denkbar, dass Östrogen nicht nur einen direkten Einfluss auf den HA-Gehalt hat, sondern diesen auch u.a. durch Beeinflussung des Kollagengehaltes ausübt. Passend dazu wurde vor Kurzem beschrieben, dass Kollagenfragmente die HA-Synthese hemmen und dadurch den HA-Gehalt reduzieren [105].

Östrogen könnte somit den Status der intrinsisch gealterten Haut direkt durch Inhibition der Entstehung biochemisch aktiver Kollagenfragmente und indirekt über eine sekundär induzierte HA-Synthese positiv beeinflussen.

4.2.2. Veränderungen des Kollagenhaushaltes in der papillären Dermis durch Langzeit UVB Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

Die chronische UVB-Exposition führte auch nach einem bestrahlungsfreien Intervall zu einer signifikanten Reduktion des Kollagen-Gehaltes in der X,P vs X,P - UVB und in der X,E_2 vs X,E_2 - UVB Gruppe sowie zudem zu einem konsekutiven Anstieg der Kollagenfragmente in der papillären Dermis. In den Kontrollgruppen ließ sich kein signifikanter Unterschied ausmachen.

Schon früh konnte in gealterter Haut ein verminderter Kollagengehalt [24, 106] welcher zusätzlich verstärkt unter UV-Bestrahlung auftritt, gezeigt werden [24]. Die UV-Strahlung führte so nicht nur zu einem um 20 % verminderten Kollagengehalt in der Dermis sondern auch zu einer um 40 % verminderten Anzahl von Prokollagen Typ III [64]. Dies passt zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, welche ebenfalls eine Reduktion des Gesamtkollagen-Gehaltes reproduzieren konnte.

Die prinzipiellen molekularen Mechanismen, die zu einem verminderten Kollagengehalt führen, wurden in der Vergangenheit genau untersucht. Weniger detailliert wurden bisher die Veränderungen im Kollagenhaushalt durch chronische Bestrahlung erforscht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass UV-Strahlung zu einer erhöhten Aktivität von MMP 1, -3 und -9 führen kann. In der Folge kam es zu einer Degradation von dermalelem Kollagen und der Entstehung von Kollagenfragmenten [60, 61, 63]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die entstandenen Kollagenfragmente interferieren und in der Konsequenz die Kollagenneusynthese in den dermalen Fibroblasten hemmen [63, 106]. Wichtig für die physiologische Funktion von Fibroblasten ist die Interaktion mit dermalen Kollagenfibrillen zur Aufrechterhaltung der zellulären mechanischen Spannung [107]. Eine durch UV-induzierte Kollagendegradation reduziert die Intensität und Effektivität dieser Bindungen. In der Folge kam es zu einer erhöhten Induktion von MMP und zu einer verminderten Kollagen-Neusynthese [107]. Ähnlich wie bei HA entsteht eine Verschiebung des Gleichgewichtes hin zum Kollagenabbau. Bei Betrachtung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit scheint sich der Kollagenhaushalt insgesamt nur partiell von den extrinsischen Strahlenschäden zu erholen.

Zudem zeigte sich innerhalb der UVB-bestrahlten Gruppen ein signifikant geringerer Kollagengehalt in der ovariektomierten Gruppe (X,P -UVB) gegenüber der Kontrollgruppe (S,P -UVB), während keine signifikanten Veränderungen gegenüber der E_2 -substituierten Gruppe (X,E_2 -UVB) nachweisbar waren. Erwartungsgemäß konnte somit die durchgeführte E_2 -Substitution eine Kollagendegradation verhindern [83, 89]. Bezüglich der Entstehung von Kollagenfragmenten zeigte sich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen E_2 -Substitution und verminderter Fragmentbildung. Interessanterweise ließ sich in den E_2 -defizienten Tieren kein additiver Effekt bezüglich der Kollagenfragmentbildung durch UVB-Bestrahlung zeigen. Es ist denkbar, dass dieser sich durch die 10-wöchige Bestrahlungspause wieder dem Kontrollniveau der intrinsisch gealterten Gruppe angepasst hat.

Die Zusammenhänge zwischen dem Kollagenhaushalt und dem E_2 -Haushalt wurden oben bereits detailliert beschrieben und lassen sich in weiten Teilen auf den Bereich der aktinischen Hautalterung übertragen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auch im Rahmen der extrinsischen Hautalterung die Substitution mit E_2 einen positiven Einfluss auf den Kollagenhaushalt zu haben scheint.

4.3 Veränderungen im Proteoglykanhaushalt

4.3.1 Veränderungen des Biglykanhaushaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

Bgn ist u.a. an der Regulation der Anordnung und Ausgestaltung von Matrixbestandteilen wie Kollagen und der Kontrolle der Zellproliferationen beteiligt [29, 31, 32]. In der vorliegenden Arbeit konnte während der intrinsischen Hautalterung in den entsprechenden Gruppen (S,P und X,E_2) kein signifikanter quantitativer Unterschied in der Detektion von Bgn dokumentiert werden. Lediglich eine tendenzielle Erhöhung unter E_2 -Substitution konnte nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen anderer Autoren [108]. Es existieren bis dato zudem keine experimentellen Evidenzen hinsichtlich der physiologischen Funktion von Bgn im Rahmen der intrinsischen Hautalterung.

In der Literatur ist die Fragestellung, ob eine Behandlung mit Östrogen den dermalen Bgn-Gehalt erhöhen kann, wenig untersucht. Lediglich eine Studie konnte zeigen, dass die Verabreichung von Östrogen im Uterusgewebe von ovariektomierten Mäusen zu einem vorher nicht detektierbaren Nachweis von Bgn führt [109]. Der erhöhte Bgn-Gehalt durch E_2 -Substitution könnte zum einen über ein Zusammenwirken von Östrogen und verschiedenen Mediatoren wie z.B. TGF- β erklärt werden. TGF- β wird unter Östrogeneinfluss hochreguliert und vermehrt exprimiert. Zudem ließ sich in der Folge eine beschleunigte bzw. optimierte Wundheilung beobachten [110, 111]. Es ist somit denkbar, dass Östrogen über einen erhöhten Bgn-Gehalt einen positiven Einfluss auf die Wundheilung ausüben könnte. Zudem lässt die o.g. bekannte Beteiligung von Bgn an der Regulation von Matrixbestandteilen wie Kollagen, sowie der Zellproliferation [29, 31, 32] die Vermutung zu, dass Bgn während der intrinsischen Hautalterung hochreguliert werden könnte, um eine entsprechende Funktion in der Aufrechterhaltung der physiologischen Komposition der EZM zu übernehmen [29, 31, 32].

4.3.2. Veränderungen des Biglykanhaushaltes in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

Eine UV-induzierte Hochregulation von Bgn in der Haut wurde in der bisher veröffentlichten Literatur nicht detailliert betrachtet. Einzig eine Studie an Korneaepithel von Kaninchen hat die Bgn-Expression vor und nach UV-Bestrahlung evaluiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass der Bgn-Gehalt der Haut nach intensiver Bestrahlung oberhalb der Nachweisgrenze lag und erst nach mehreren expositionsfreien Wochen wieder abfiel [112]. Eine weitere Veröffentlichung konnte keine Veränderung des Bgn-Gehaltes in der papillären Dermis durch UVB-Bestrahlung zeigen [65].

In der vorliegenden Arbeit führte die chronische UV-Exposition auch nach einem bestrahlungsfreien Intervall nicht zu signifikanten Veränderungen hinsichtlich des dermalen BGN-Gehaltes (S,P vs S,P - UVB). Jedoch führte die durchgeführte E_2 -Substitution zu einem signifikanten Bgn-Anstieg in der E_2 -substituierten Gruppe (X,E_2 - UVB) gegenüber allen anderen Gruppen (S,P - UVB ; X,P - UVB ; S,P , X,P und X,E_2). Bgn ist bekanntermaßen in der Lage an Kollagen zu binden und dadurch die Bildung von Kollagenfibrillen zu beeinflussen [113, 114]. In der Vergangenheit konnte man im Umkehrschluss einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen Bgn-Gehalt und einer mangelhaften Kollagenfibrillenbildung nachweisen. *Bgn-Knockout-Mäuse* zeigten in der Folge eine vermehrte Osteoporoseeigung, spontane

Aortendissektionen sowie eine ausgedünnte Haut mit deutlichem Stabilitäts- und Widerstandsverlust [114-116].

Auch im Kontext der Hautalterung kann ein Zusammenhang zwischen einer Bgn-Deposition und den Prozessen der Gewebereparation vermutet werden. Ein Kennzeichen der Gewebereparation in der Regenerationsphase ist die Ablagerung von Kollagen. Bgn könnte in dieser Phase hochreguliert werden, um eine ordnungsgemäße Kollagenzusammenlagerung zu gewährleisten. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass Bgn-assoziiert an Kollagenfasern-während der Wundheilung von Myokardinfarkten in Mäusen hochreguliert wird [117].

Wie bereits oben erwähnt konnte ein Zusammenhang zwischen E_2 -Substitution und dem Biglykangehalt im Uterus gezeigt werden [109]. Es wäre hypothetisch denkbar, dass die E_2 - Substitution speziell im Zuge der extrinsischen Hautalterung zu einer kompensatorischen Biglykan-Hochregulation geführt hat. Dies könnte zu einer ordnungsgerechten bzw. optimierten Kollagenfibrillenzusammenlagerung beigetragen haben, was sich jedoch ohne Untersuchungen auf molekularer Ebene nicht nachweisen lässt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bgn über seine verschiedenen Interaktion mit EZM-Molekülen und Mediatoren eine wichtige Rolle in der Stabilisierung der EZM zu übernehmen scheint und interessanterweise vermutlich aus eben diesen Gründen im Rahmen der extrinsischen Hautalterung hochreguliert wird.

4.3.3 Veränderungen des Lumikanhaushaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

Lumikan ist in der Kornea, der Haut sowie dem Gewebe von Sehnen und Gelenken, wo es an der Fibroblastogenese und dem Kollagenfibrillenwachstum beteiligt ist, zu finden [45, 118]. Es spielt u.a. eine Rolle in der Zellmigration, der Zellproliferation, während der Embryogenese, in der Wundheilung sowie im Rahmen der physiologischen Immunantwort [44]. Während der intrinsischen Hautalterung konnte eine deutliche Reduktion des Lumikangehaltes in der Haut, einhergehend mit funktionellen Einbußen, gezeigt werden [108]. Es wird davon ausgegangen, dass eben dieser Lumikanverlust und der gleichzeitige Anstieg anderer PG (z.B. von Decorin) funktionelle Veränderungen v.a. im Kollagenhaushalt hervorruft, welche phänotypisch die charakteristischen Merkmale von gealterter Haut darstellen [28, 108].

Nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen fällt auf, dass ein absoluter Östrogenmangel in der intrinsischen Gruppe (X,P) mit dem niedrigsten Lum-Gehalt einhergeht. In früheren Studien konnte passend dazu bereits gezeigt werden, dass eine Ovariectomie von Mäusen zu einer verminderten Lum-Expression in der Haut führt [119].

Eine E_2 -Substitution, z.B. in Form einer dermalen E_2 -Applikation, kann klassische klinische Parameter der Hautalterung (u.a. Faltenbildung, Feuchtigkeitsgehalt) über einen erhöhten HA- und Kollagengehalt optimieren [120]. Es ist durchaus denkbar, dass Östrogen dies auch über eine quantitative Erhaltung diverser Proteoglykane wie z.B. Lumikan, die u.a. von essentieller Bedeutung für die Kollagenfibrillenbildung sind, gewährleistet, auch wenn die vorliegenden Daten dies lediglich tendenziell andeuten und nicht signifikant validieren können.

4.3.4. Veränderungen des Lumikangehaltes in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Lum-Gehaltes in der bestrahlten Kontrollgruppe ($S,P-UVB$) gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (S,P). Sowohl die ovariectomierten, als auch die E_2 -substituierten Gruppen wiesen diesen Trend auf. Somit ließ sich festhalten, dass auch

nach einer Rekonvaleszenzphase der Lumikangehalt durch chronische UVB-Bestrahlung in der papillären Dermis angestiegen ist.

Ein direkter Zusammenhang zwischen UVB-Bestrahlung und einem Lum-Anstieg in der Dermis wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Es scheint jedoch einen direkten Zusammenhang zwischen Lum-Gehalt und stattfindender Kollagenfibrillenbildung zu bestehen. So zeigen *Lum-Knockout-Mäuse* eine gestörte Kollagenfibrillenbildung, die sich in Form einer fragilen Haut und einer getrübbten Kornea widerspiegelt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass Lum eine wichtige Funktion in der Steuerung der dermalen Kollagenzusammenlagerung übernimmt [118]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Lum mit Kollagenfibrillen auch direkt interagieren kann, um diese vor einem UV-induzierten Abbau durch MMP zu schützen und um darüber hinaus die Kollagenzusammenlagerung während der Gewebereparation zu regulieren [96, 121]. Studien konnten dementsprechend zeigen, dass während der Wundheilung von kornealem Gewebe Lum hochreguliert wird. Interessanterweise zeigten Wunden von *Lum-Knockout-Mäusen* eine Tendenz zur signifikant langsameren Ausheilung [44, 122].

Es lässt sich also schlussfolgern, dass Lum möglicherweise extrinsisch hochreguliert wird, wenn es zu Veränderungen im Kollagenhaushalt kommt. Diese Veränderungen könnten einen physiologischen, altersbedingten Prozess darstellen, aber auch eine Langzeitfolge der durch UV-induzierten Hautalterung und damit einhergehender *Remodellingvorgänge* widerspiegeln.

4.3.5 Veränderungen des Versikanhaushaltes in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

Vcan scheint eine Rolle in der Regulation von Zell-Adhäsion, *Zell-Survival*, Proliferation sowie bei dem Zusammenbau der EZM zu spielen [40]. In der vorliegenden Arbeit ließ sich in den intrinsischen Hautalterungsgruppen ein deutlich erhöhter Vcan-Gehalt in der E₂-substituierten Gruppe nachweisen. Auch der Vcan-Gehalt der Kontrollgruppe zeigte sich tendenziell erhöht gegenüber der ovariektomierten Gruppe.

Östrogen scheint einen induzierenden Effekt auf Vcan auszuüben. Studien an verschiedenen Organsystemen bestätigen die Vermutung, dass Östrogen einen positiven Einfluss auf die Vcan-Expression hat. So führt ein als Östrogen-Agonist fungierendes Phytoestrogen zu einer erhöhten Expression von Vcan mRNA in humanen Osteoblasten. In ovariektomierten Tieren führt erst die Östrogengabe zu einer nachweisbaren Detektion von Vcan im Gewebe der Uteri dieser Tiere [123, 124]. In der Literatur gibt es bisher keine Erkenntnisse über die Auswirkung von Östrogen auf die Vcan-Expression der Haut. Dies lässt sich durch die vorliegenden Daten jedoch vermuten.

4.3.6. Veränderungen des Versikangehaltes in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

In der vorliegenden Arbeit ließ sich ein signifikanter Anstieg von Vcan in der papillären Dermis nach einem bestrahlungsfreien Intervall in der UVB-exponierten Kontrollgruppe (*S,P*) nachweisen.

In aktinisch gealterter Haut kommt es zu Matrixumbauvorgängen, der sog. *solaren Elastose* [125]. Genauer gemeint ist damit nicht nur ein Matrixabbau in Form eines Kollagenverlustes in der papillären Dermis, sondern auch einer reaktiven Neusynthese. In der Folge kommt es zu einer massiven Ablagerung von elastotischem Material, Fibrillin und Elastin [25]. Es konnte gezeigt werden, dass Vcan in

chronisch UV-exponierter Haut, im Bereich der solaren Elastose, akkumuliert [126]. Auch in der vorliegenden Arbeit kommt es unter chronischer UVB-Exposition zu einer Akkumulation von Vcan. Über eine Colokalisation von Elastin und Vcan kann an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden, da diesbezüglich keine Quantifizierung erfolgt ist. Darüber hinaus ist bekannt, dass ein hoher Vcan-Gehalt Zellen vor oxidativem Stress schützen kann [127]. Knott et.al. äußerten die Hypothese, dass die Ablagerung von elastotischem Material ein bisher ungeklärter Stimulus zur Hochregulation u.a. von Vcan sein kann [126]. Es wird vermutet, dass Vcan ein geeignetes Milieu für Reparatur- und Regenerationsprozesse für Fibroblasten schafft und diese die Produktion von weiteren EZM-Molekülen stimuliert. Des Weiteren ist bekannt, dass UV-induziertes freigesetztes MMP-12 in der Lage ist, die HA-Bindungsstelle des Versikan-Moleküls zu spalten und so zu einem Ausschluss von HA zu führen kann [128]. Insgesamt könnte dieser Prozess zum einen den Abfall des HA-Gehaltes und zum anderen den Anstieg des Vcan-Gehaltes erklären. Bereits Hasegawa et al. äußerten die Vermutung, dass der Abbau der Vcan-Bindungsstelle durch UV am HA-Molekül ein wichtiger Weg in der pathophysiologischen Entstehung der *solaren Elastose* ist [128].

Auch in den extrinsischen Gruppen zeigt sich ein positiver Zusammenhang zwischen dem Vcan- und dem E_2 -Gehalt, im Sinne einer deutlichen Vcan-Induktion durch Östrogene. Es fällt zudem passend dazu auf, dass den tendenziell geringsten Versikangehalt die ovariectomierte Gruppe aufweist. Anhand der oben dargestellten Aspekte einer Vcan-Induktion via UVB-Exposition ist jedoch davon auszugehen, dass im Unterschied hierzu die durch Östrogene erhöhte Anzahl an Vcan-Molekülen funktionell intakt sind und somit der EZM-Erhaltung dienen könnte

4.4 Veränderungen der Proliferationsrate

4.4.1 Veränderungen der Proliferationsrate in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

In der vorliegenden Arbeit ließ sich unter intrinsischen Bedingungen ein Anstieg der Proliferationsrate in der E_2 -behandelten Gruppe (X, E_2) gegenüber Kontrollen (S, P) und ovariectomierten Tieren (X, P) beobachten. Es ist bekannt, dass Östrogen an dermale Fibroblasten binden kann [129, 130]. Dort kann es dann nicht nur die mitotische Aktivität, sondern auch die Proliferation und die DNA-Synthese erhöhen [131].

Des Weiteren lässt sich die Erhöhung der Proliferationsrate möglicherweise auch über eine Erhöhung des HA-Gehaltes in dieser Gruppe (X, E_2) erklären, da HA bekannt dafür ist die Proliferationsrate von Fibroblasten zusätzlich zu stimulieren [105].

Wie bereits oben beschrieben führte die Östrogensubstitution zu einer Erhöhung des Gesamtproteoglykangehaltes. Dies spiegelt sich in der ebenfalls erhöhten Proliferationsrate in den betroffenen Gruppen wieder. Bei den proliferierenden Zellen handelt es sich außerdem gemäß der zellulären Distribution in der Dermis in erster Linie um Fibroblasten, welche im Rahmen ihrer Syntheseigenschaften den HA- und Proteoglykangehalt weiter erhöhen können. Zusammenfassend könnten E_2 induzierte Proliferationssteigerungen somit der bekannten intrinsischen Atrophie der Haut entgegenwirken [132].

4.4.2 Veränderungen der Proliferationsrate in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

In der vorliegenden Arbeit konnte nach einem bestrahlungsfreien Intervall ein signifikanter Anstieg der Ki-67 positiven Zellen in der bestrahlten Kontrollgruppe (*S,P-UVB*) gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (*S,P*) nachgewiesen werden. Dass eine UVB-Exposition zu einem Anstieg der Proliferationsrate führt, konnte bereits in der Vergangenheit in zahlreichen Studien der Haut gezeigt werden [133-135]. Zu Bedenken ist jedoch, dass es sich bei diesen Zellen hauptsächlich um Melanozyten, also um Zellen der Epidermis und nicht der Dermis, handelt und diese eventuell über unterschiedliche Regulationsmechanismen zur Proliferation angeregt werden.

Chronische UVB-Bestrahlung führt bekanntermaßen zu einem *Remodelling* der EZM. Zu vermuten ist, dass der stattfindende Gewebeumbau u.a. mit einer Zunahme aktiv proliferierender Zellen verbunden ist, welche in der Folge vermehrt die o.g. EZM-Komponenten, namentlich Proteoglykane (Bgn, Vcan und Lum) und Ha, synthetisieren und in der Folge dann in Prozesse wie z.B. die solare Elastose münden könnten. Diese Hypothese deckt sich mit den hier erhobenen Quantifizierungsergebnissen (vgl. 3.2 – 3.5). Auf der anderen Seite ist weiterhin denkbar, dass eine erhöhte Proliferationsrate nach einem bestrahlungsfreien Intervall bereits einer beginnenden Erholung der Struktur und Funktion der dermalen EZM entspricht. Dafür spricht, dass bereits gezeigt werden konnte, dass HA in der Lage ist, die Proliferation von Fibroblasten zu stimulieren [105] und interessanterweise in der vorliegenden Arbeit die höchste Anzahl der Ki-67 positiven Zellen in der Gruppe mit dem höchsten HA-Gehalt nachgewiesen werden konnte. Zudem wirkte auch die E₂-Substitution proliferationssteigernd im extrinsischen Verlauf, sodass bestrahlte und hormonbehandelte Tiere (*X,E₂-UVB*) die höchste dermale Proliferationsrate aufwiesen. Sollte sich die oben proklamierte Hypothese einer bereits eingetretenen Rekonvaleszenz als richtig erweisen, könnten Östrogene in diesem Zusammenhang eine Optimierung bzw. Beschleunigung des Erholungsprozesses bedeuten.

4.5 Veränderung der Makrophagendetektion

4.5.1 Veränderungen der Makrophagendetektion in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

Ein charakteristisches Kennzeichen eines Inflammationsgeschehens in der Haut, v.a. einer chronischen Inflammation wie z.B. bei Psoriasis, ist die Infiltration von Makrophagen [136]. In der vorliegenden Arbeit wies die E₂-substituierte intrinsische Gruppe (*X,E₂*) den niedrigsten Makrophagenanteil auf, während die durchgeführte Ovariectomie (*X,P*) die Rekrutierung von Entzündungszellen in die Dermis sowohl gegenüber Kontrollen (*S,P*), als auch gegenüber östrogenbehandelten Tieren (*X,E₂*) signifikant enthemmt hat. Dies macht einen direkten Zusammenhang zwischen E₂-Gehalt des Gewebes und der Anzahl der infiltrierenden Makrophagen mit bekannten funktionellen Konsequenzen wahrscheinlich [137]. Ob E₂ die Einwanderung von Makrophagen in die murine Dermis direkt stimuliert oder diesen Effekt über die Veränderung des sekretorischen Zytokinprofils der Fibroblasten auslöst, ist bislang nicht bekannt. Da die intrinsische Hautalterung im Gegensatz zur extrinsischen Hautalterung jedoch üblicherweise nicht mit einer erhöhten Akkumulation von Entzündungszellen in der Dermis assoziiert ist, scheinen erhöhte Östrogenspiegel in diesem Zusammenhang protektiv zu wirken.

4.5.2 Veränderungen der Detektion von Makrophagen in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

Anhand der vorliegenden Untersuchungsergebnisse musste auch nach einem bestrahlungsfreien Intervall von einem chronischen Inflammationsprozess ausgegangen werden, da eine erhöhte Ansammlung von MAC2-positiven Makrophagen in allen UVB-exponierten Gruppen (*S,P-UVB*; *X,P-UVB* und *X, E₂ UVB*) nachweisbar war.

In der Vergangenheit konnte diesbezüglich auf der einen Seite gezeigt werden, dass aktinisch gealterte Haut zahlreiche histologische Gemeinsamkeiten mit chronisch-entzündeter Haut aufweist. Man bezeichnet dieses Phänomen als einen chronischen niedrig-proinflammatorischen Status, der Inflammationsalterung oder „Inflammaging“ genannt wird. Dieser Zustand zeichnet sich u.a. durch eine erhöhte Anzahl von inflammatorischen Zellen wie Mastzellen, Makrophagen und T- Zellen aus [66][67, 71]. Dementsprechend zählen UV-Strahlen- vor allem UVB-Strahlen - zu den potentesten externen Stimuli, welche eine Immunreaktion hervorrufen. Sie verursachen neben einer beschleunigten (aktinischen) Hautalterung auch entzündlich bedingte Hauterkrankungen sowie eine charakteristische Form der Wundheilung [71] [67]. Neben der bekannten, beschriebenen EZM-Degradation fiel in diesem Zusammenhang auch ein erhöhtes Vorkommen von Makrophagen, Mastzellen und T- Zellen auf [67]. Vor allem Makrophagen spielen eine zentrale Rolle in allen Phasen der Wundheilung [138]. Es wurde auf der anderen Seite jedoch auch beschrieben, dass sie bereits früh eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Wundheilung übernehmen. Zusätzlich sind sie in der Lage verschiedene dermale Zelltypen im laufenden Wundheilungsprozess zu aktivieren und somit deren sekretorischen Phänotyp zu verändern [137]. Insgesamt kann daher der erhöhten Anzahl inflammatorischer Zellen nach einem bestrahlungsfreien Intervall also auch eine reparative Komponente zu Grunde liegen.

Auf Seiten der potentiell negativen und mit einem erhöhten Vorkommen von Entzündungszellen vergesellschafteten Aspekte gilt es jedoch, weitere, im Folgenden angeführte, Zusammenhänge zu betrachten. So führt UVB-Strahlung zu einer Hochregulation von intrazellulären Adhäsionsmolekülen (engl.: *Intercellular adhesion molecules, ICAM*) in humanen Keratinozyten sowie in Endothelzellen von dermalen Mikrogefäßen [139, 140]. ICAM regulieren u.a. den Einstrom proinflammatorischer Zellen in die Dermis [141]. Die UV-induzierte Infiltration dieser Makrophagen sowie neutrophiler Granulozyten stellt weiterhin einen bedeutenden Schritt in der Entwicklung von inflammatorischen Hauterkrankungen dar [66, 142].

Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen Entstehung und Abbau von ROS [143]. ROS werden während einer inflammatorischen Reaktion produziert und spielen hierbei eine wichtige Rolle [144]. UVB-Strahlung verschiebt das physiologisch herrschende Gleichgewicht hin zugunsten ihrer Entstehung [145, 146]. ROS agieren in der Folge u. a. als zweiter Botenstoff innerhalb der intrazellulären Signaltransduktion. Dadurch sind sie in der Lage, die Expression zellulärer Gene wie der Matrixmetalloproteasen zu steuern und weiterer proteolytischer Enzyme zu induzieren. So kommt es zur Degradation von EZM-Bestandteilen, wie Kollagenen und HA, welche schließlich in einer dysfunktionellen und strukturell alterierten EZM-Matrix mündet [147-150]. In der vorliegenden Studie konnte dementsprechend eine Reduktion des HA-Gehaltes in den extrinsischen-Gruppen ohne Östrogensubstitution (*S,P-UVB* und *XE₂-UVB*) festgestellt werden. Es könnte sich hierbei zudem aber auch um einen Umbau der hochmolekularen Form in die niedermolekulare Form handeln. Niedermolekulare HA-Fragmente entstehen u.a. durch ROS und enzymatische Degradation, sind potente Immunmodulatoren und beeinflussen die Zytokinproduktion [14, 151-153]. So konnte in der Vergangenheit bereits gezeigt werden, dass HA-Fragmente in Makrophagen eine Steigerung der Zytokinproduktion induzieren, v.a. die

der Nitritoxid-Synthase, sodass der proinflammatorische Transkriptionsfaktor NF κ B verstärkt exprimiert wird [154-156]. Dies lässt in der Zusammenschau die Vermutung zu, dass die UVB-Exposition über die Induktion von ICAM und ROS zunächst zu einer frühen Aktivierung und dermalen Infiltration durch Makrophagen führt, ehe dann über den Abbau von Kollagen und HA sowie durch entstandene HA-Fragmente die definitive EZM-Schädigung manifest bzw. fortlaufend verstärkt und unterhalten wird [67].

Möglicherweise ist somit das eingehaltene bestrahlungsfreie Intervall von 10 Wochen im Versuchsmodell der *skh1*-Mäuse zeitlich nicht ausreichend, um entzündungsbedingte Vorgänge vollständig zu verhindern bzw. zu kompensieren und umzukehren.

Die Östrogensubstitution führte demgegenüber auch unter extrinsischen Bedingungen zu einem in der Tendenz, aber nicht signifikant, reduzierten Vorkommen von dermalen Entzündungszellen (XE_2 -UVB), während die Ovariectomie die Akkumulation von Makrophagen enthemmte (X,P -UVB). In der Vergangenheit konnte analog hierzu gezeigt werden, dass synthetische ER β -Agonisten einer UV-induzierten Matrixdegradation entgegenwirken, die Rekrutierung von Entzündungszellen hemmen und die Wundheilung optimieren kann [157]. Im Umkehrschluss ist bekannt, dass ovariectomierte Mäuse eine schlechtere Wundheilung zeigen. Diese ist nicht nur verlangsamt, d.h. quantitativ supprimiert, sondern auch als qualitativ minderwertiger im Vergleich zur Wundregeneration bei E_2 -substituierten Mäusen anzusehen. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass Wunden von fetaler Haut nicht nur narbenfrei ausheilen, sondern auch eine signifikant geringere Anzahl an Makrophagen vorweisen [83, 111]. Insgesamt muss jedoch auch bezüglich des beschriebenen protektiven E_2 -Effektes konstatiert werden, dass die Rekonvaleszenzphase von 10 Wochen vermutlich nicht ausreichend ist um proinflammatorische Effekte der UVB-Exposition effektiv zu verhindern. Verlängerte Zeitintervalle, höhere Östrogendosen oder eine anderweitige Applikationsform sind hier zu diskutieren und erfordern weiterer Untersuchungen.

4.6 Veränderungen der Hautparameter

4.6.1 Veränderungen des Hydratationsgrades in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

Die Fähigkeit der Haut, Wasser zu binden, hängt zum einen von der Beschaffenheit der Lipidschicht der Epidermis und zum anderen vom Anteil der GAG – v.a. HA - in der Dermis ab, welche wiederum durch Östrogene vermehrt synthetisiert werden [158, 159].

Ein deutlicher Östrogeneffekt auf den Hydratationsgrad der Haut zeigte sich dementsprechend auch in den intrinsischen Gruppen, wobei die E_2 -defiziente Gruppe (X,P) den signifikant geringsten Hydratationsgrad aufwies. Zwischen Östrogengehalt und transepidermale Wasserverlust konnte demgegenüber kein klarer Zusammenhang ermittelt werden. Erwartet hätte man hier einen erhöhten TEWL unter E_2 -Defizienz. Diese heterogenen Ergebnisse lassen mehrere Erklärungsansätze zu. So ist Östrogen nachweislich in der Lage, den HA- und Kollagengehalt in intrinsisch gealterter Haut zu steigern und in der Folge den Hydratationsgrad positiv zu beeinflussen [88, 120]. Möglicherweise ist der Effekt einer E_2 -Defizienz demgegenüber jedoch nicht als gleichwertig reziprok anzusehen, sodass ein Östrogenmangel nicht zur relevanten Enthemmung des Wasserverlustes führt. Zudem äußerten Tsukahara et. al. nach Betrachtung des TEWL bei ovariectomierten, aromatasedefizienten und UVB-exponierten Mäusen die Vermutung, dass extragonadale Östrogene bei Ausfall der primären ovariellen Hormonproduktion protektive Aufgaben übernehmen können. Auch dies würde den konstanten TEWL trotz Ovariectomie erklären [160].

4.6.2 Veränderungen des Hydratationsgrades in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass die UVB-Exposition im Mausmodell zu einem verminderten Hydratationsgrad der Haut [161] sowie zu einem erhöhten TEWL führt [162]. Hiermit assoziiert waren Effekte wie eine dysfunktionale EZM-Komposition und den typischen klinischen Manifestationen der extrinsischen Hautalterung. Bekanntermaßen ist HA u.a. in der Lage, große Mengen Wasser zu binden und dadurch die Beschaffenheit der Haut positiv zu verändern [11]. Passend dazu weisen in der vorliegenden Arbeit die Gruppen mit niedrigem HA- und Kollagengehalt auch einen niedrigen Hydratationsgrad sowie einen erhöhten TEWL auf.

Unter Östrogeneinfluss kam es nicht zu einer UVB-assoziierten Hydratationsreduktion im Vergleich zur intrinsischen Kontrollgruppe (X, E_2 -UVB vs. S, P). E_2 schien somit auch im extrinsischen Verlauf der Hautalterung die Hauthydratation zu erhöhen. Im direkten Vergleich mit den anderen bestrahlten Gruppen (S, P -UVB und X, P -UVB) war E_2 jedoch nicht in der Lage, den Flüssigkeitsgehalt der Haut signifikant zu erhöhen, sodass hier ein Überwiegen des UVB-Einflusses unterstellt werden muss. Dazu passend konnten Gendimenico et. al. vor einiger Zeit nachweisen, dass bestimmte östrogenvermittelte Effekte—wie eine Zunahme der Hautdicke und damit assoziierter vermehrter Flüssigkeitsspeicherung, erst bei hochdosierter E_2 -Substitution zu erwarten sind [120]. Zudem ließ sich dieser Effekt interessanterweise nur im extrinsischen Verlauf als Antwort auf eine UVB-Exposition validieren, während im intrinsischen Verlauf eine Hochdosisgabe von 17beta-Östrogen Hautdicke und Hydratation nicht erhöhen konnte. Letztlich könnten somit auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Hydratationsquantitäten im extrinsischen Verlauf dosisabhängig kein signifikantes Ausmaß annehmen.

Unter extrinsischen Bedingungen konnte kein einheitlicher Zusammenhang zwischen E_2 -Defizienz und E_2 -Substitution, sowie dem TEWL festgestellt werden. Unstimmig erscheint zunächst insbesondere der niedrige TEWL in der E_2 -defizienten Gruppe (X, P -UVB). Bedenkt man jedoch, dass genau diese Gruppe sowohl einen sehr geringen HA- als auch einen sehr niedrigen Kollagengehalt aufwies, lässt sich vermuten, dass der Gesamtwassergehalt als Spätfolge einer chronischen UVB-Bestrahlung nachhaltig bereits so reduziert wurde, dass nach einer Rekonvaleszenzphase kaum noch Wasser über die Epidermis verloren geht und sich somit ein verringerter TEWL messen lässt. Passend dazu wurde bereits von anderen Autoren die Tatsache beschrieben, dass aktinisch gealterte Haut zwar einen initial erhöhten Flüssigkeitsverlust im Anschluss an eine UVB-Exposition aufweist, im weiteren Verlauf jedoch zunehmend geringere Mengen H_2O gespeichert werden können, sodass kein erhöhter TEWL mehr validierbar war [163, 164]. Dementsprechend ist von einer massiv gestörten EZM-Komposition und Funktionalität auszugehen, welcher auch durch eine E_2 -Substitution nur unzureichend begegnet werden kann.

4.6.3 Veränderungen der Elastizität in der papillären Dermis während der intrinsischen Hautalterung

Der Hautparameter *Young's modulus* beschreibt die Kraft, welche aufgewendet werden muss, um die Haut 1,5 mm anzuheben. Er entspricht somit der Steifigkeit der Haut. Die Viskoelastizität beschreibt demgegenüber die Elastizität bzw. Dehnbarkeit der Haut. In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Elastizität zwischen einer E_2 -Substitution (X, E_2) gegenüber einer E_2 -Defizienz (X, P) der intrinsischen Hautalterungsgruppen gezeigt werden. Es zeigte sich jedoch überraschenderweise ein Elastizitätsverlust in der E_2 -substituierten Gruppe (X, E_2) gegenüber den Kontrolltieren (S, P). Die Auswertung der Hautsteifigkeit erbrachte keine Unterschiede im intrinsischen Verlauf. Aufgrund diverser Untersuchungen anderer Autoren war primär von einer Elastizitätszunahme unter E_2 -Substitution im Mausmodell auszugehen [81, 82]. Da jedoch zudem eine tendenziell erhöhte Elastizität

innerhalb der Kontrollgruppe (S,P) gegenüber den ovariektomierten Tieren (X,P) nachweisen lies, konnte insgesamt kein einheitlicher Effekt einer Östrogensubstitution bzw. eines Östrogensmangels validiert werden. Es sei jedoch an dieser Stelle erwähnt, dass bereits andere Autoren einen spontanen, intrinsischen Elastizitätsverlust im Mausmodell nach operativer Ovariektomie mit der Folge einer beschleunigten Hautalterung beschrieben haben [81]. Zusammenfassend sind somit im Wesentlichen zwei Interpretationen der hier erhobenen Daten denkbar. Zum einen könnte die zeitliche Dauer bzw. die Dosis einer Östrogensubstitution von Bedeutung sein, sodass nach 10-wöchiger Rekonvaleszenzphase noch keine relevante Elastizitätszunahme feststellbar war. Zum anderen muss in diesem Zusammenhang jedoch auch eine Messungenauigkeit bzw. Messabweichung in Betracht gezogen werden, da es sich bei der hier verwendeten Messmethodik um eine für die menschliche Hautanalyse ausgelegte Methode handelt, welche jedoch regelhaft auch am Mausmodell zur Analyse angewendet wird [165, 166].

4.6.4 Veränderungen der Elastizität in der papillären Dermis durch Langzeit-UVB-Exposition nach einer Rekonvaleszenzphase

Tendenziell ist die Haut durch chronische UVB-Bestrahlung steifer und weniger elastisch geworden, was den Ergebnissen diverser Untersuchungen anderer Autoren entspricht [48, 160]. Somit konnte der beschleunigende Effekt einer UVB-Exposition im Zuge der extrinsischen Hautalterung auch nach einer Rekonvaleszenzphase demonstriert werden. Der einzige signifikante Unterschied war jedoch der Anstieg der Steifheit der Haut in der E_2 -substituierten Gruppe (X,E_2 -UVB) im Vergleich mit den ovariektomierten Tieren (X,P -UVB) und den Kontrolltieren (S,P -UVB).

Darüber hinaus kam es unter E_2 -Substitution und UVB-Bestrahlung (X,E_2 -UVB) zu einem signifikanten Elastizitätsverlust der Haut im Vergleich zu dem der intrinsischen Kontrollgruppe (S,P), während die Ovariektomie hier keinen Einfluss zu haben schien (X,P -UVB). Es ist entsprechend der Literatur hierbei anzunehmen, dass aktinische Hautschäden die Elastizität der oberen Hautschichten derart effektiv reduzieren, dass dieser Effekt weder durch eine 10-wöchige Rekonvaleszenzphase, noch durch eine Östrogensubstitution im Rahmen der hier etablierten Versuchsbedingungen zu kompensieren bzw. umzukehren ist [120, 160]. Nichtsdestotrotz müssen auch hier eine mögliche Messungenauigkeit bzw. abweichende Ergebnisse aufgrund anderer Östrogendosen bzw. methodisch abweichender UVB-Expositionsprotokolle und Rekonvaleszenzphasen diskutiert werden [81, 160].

4.7 Überblick über die Veränderungen in der Komposition der EZM durch chronische Bestrahlung auch nach einer Rekonvaleszenzphase

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob bekannte, durch chronische UVB-Bestrahlung hervorgerufene Veränderungen der EZM, wie u.a. die Degradation von Kollagen, die Akkumulation von elastotischem Material und einen Einstrom von Makrophagen etc. auch nach einem 10-wöchigen bestrahlungsfreien Intervall detektierbar sind. Es konnte gezeigt werden, dass tiefgreifende *Remodelingvorgänge* auch nach einer UVB-freien Erholungsphase zu einer stark veränderten Matrix im Vergleich zur intrinsisch gealterten Kontrolle führen und dementsprechend nicht von einer vollständigen Restitutio *ad integrum* auszugehen war. Untermuert wird diese Feststellung nicht zuletzt durch die heterogenen Ergebnisse der Hautparameteranalyse.

Zusammengefasst zeigte sich zum einen ein Verlust von HA und zum anderen ein Anstieg der Kollagenfragmente und der Proteoglykane in der papillären Dermis der extrinsisch gealterten Gruppen gegenüber den intrinsisch gealterten Gruppen. Darüber hinausgehend konnte auch nach dem bestrahlungsfreien Intervall in den extrinsischen Gruppen eine erhöhte Anzahl von Makrophagen und proliferierenden Zellen im Sinne einer chronischen Inflammation nachgewiesen werden. Die Integrität der Dermis war somit als quantitativ-strukturell, als auch als qualitativ-funktionell gestört anzusehen.

Weiterhin konnte dargestellt werden, dass Östrogene vermutlich einen positiven Einfluss auf die Komposition der EZM haben und die durch chronische Bestrahlung ausgelösten, negativen Veränderungen in einem gewissen Maße kompensieren können. Auch wenn die Analyse der Hautparameter dies nur eingeschränkt wiedergeben kann, ist anhand der vorliegenden Literatur und der dokumentierten Beeinflussung der EZM-Komposition bei unterschiedlichen Östrogenspiegeln generell von einem strukturell-funktionellen Benefit auszugehen [88, 167, 168]. Das Ausbleiben signifikanter Effekte bei der Auswertung einzelner Hautparameter bzw. der Quantifizierung einzelner EZM-Komponenten könnte nicht zuletzt auf unterschiedliche methodische Vorgehensweisen (Versuchszeiträume und Rekonvaleszenzphasen, Intensität einer UVB-Exposition, Östrogendosen etc.) anderer Autoren zurückzuführen sein und erfordert weitere Untersuchungen [120].

4.8 Ausblick und Schlussfolgerung

Es handelt sich bei der vorliegenden Arbeit um eine rein deskriptive Studie, welche in der Folge durch nachweisbare, kausale Zusammenhänge weiter gestützt werden sollte. Die Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass durch die chronische Bestrahlung eine Form von chronischer Inflammation in Gang gesetzt wurde. Weiterführend sollte zur Untersuchung der kausalen Prozesse an diesem Punkt angeknüpft werden (z.B. Interaktion von HA und Versikan).

Teilziel dieser vorgelegten Arbeit war es, zu zeigen, in welcher Weise sich Östrogen auf die Komposition der EZM auswirkt. Durch die Entwicklung von selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren, welche in der klinischen Medizin bereits angewendet werden, könnte es gelingen, die positiven Effekte von Östrogensubstitution auf die Haut ohne das Risiko schwerwiegenden Organkomplikation zu gewährleisten. Sollte dies gelingen, würden sich Untersuchungen mit topischem Östrogen oder ggf. die Applikation von selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulatoren und deren Auswirkung auf die Komposition der EZM von UV-bestrahlten Tieren anbieten. Weiterhin könnte man zu einem späteren Zeitpunkt überprüfen, ob eine Östrogensupplementation in Sonnenschutzlotionen möglich ist. Wenn dies der Fall wäre, sollte man überprüfen, ob diese sich positiv auf die sonneninduzierten Veränderungen (extrinsische Hautalterung und Ausbildung von Präkanzerosen und malignen Melanomen) auswirken kann.

Es sollte in weiteren Studien zudem untersucht werden, inwiefern HA, Biglykan und Versikan sowie der Einfluss von Östrogen in die Regulation der epidermalen Hautbarriere involviert sind.

5.Literaturverzeichnis

1. Lüllmann- Rauch, R., in *Histologie* 2003, Thieme: Kiel.
2. Moll, I., *Duale Reihe Dermatologie*. 2010.
3. Horn, F.M., I; Schneider, N; Grillhösl, C; Berghold, S; Lindenmeier, G; , *Biochemie des Menschen*. 2005.
4. Bissell, M.J., H.G. Hall, and G. Parry, *How does the extracellular matrix direct gene expression?* J Theor Biol, 1982. **99**(1): p. 31-68.
5. Gospodarowicz, D., G. Greenburg, and C.R. Birdwell, *Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth*. Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 2): p. 4155-71.
6. Yamada, K.M., *Cell surface interactions with extracellular materials*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 761-99.
7. Rassow, H., Netzker,Deutzmann, in *Biochemie*. 2006, Thieme. p. 396-408
8. Kapoor, P. and S. Sachdeva, *Topical hyaluronic Acid in the management of oral ulcers*. Indian J Dermatol. **56**(3): p. 300-2.
9. 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.
10. Tammi, R. and M. Tammi, *Correlations between hyaluronan and epidermal proliferation as studied by [3H]glucosamine and [3H]thymidine incorporations and staining of hyaluronan on mitotic keratinocytes*. Exp Cell Res, 1991. **195**(2): p. 524-7.
11. Manuskiatti, W. and H.I. Maibach, *Hyaluronic acid and skin: wound healing and aging*. Int J Dermatol, 1996. **35**(8): p. 539-44.
12. Toole, B.P., *Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(7): p. 528-39.
13. Schulz, T., U. Schumacher, and P. Prehm, *Hyaluronan export by the ABC transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP*. J Biol Chem, 2007. **282**(29): p. 20999-1004.
14. Stern, R., *Complicated hyaluronan patterns in skin: enlightenment by UVB?* J Invest Dermatol, 2007. **127**(3): p. 512-3.
15. Stern, R. and H.I. Maibach, *Hyaluronan in skin: aspects of aging and its pharmacologic modulation*. Clin Dermatol, 2008. **26**(2): p. 106-22.
16. Stern, R., A.A. Asari, and K.N. Sugahara, *Hyaluronan fragments: an information-rich system*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(8): p. 699-715.
17. 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.
18. Toole, B.P., *Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins*. Curr Opin Cell Biol, 1990. **2**(5): p. 839-44.
19. Weigel, P.H., V.C. Hascall, and M. Tammi, *Hyaluronan synthases*. J Biol Chem, 1997. **272**(22): p. 13997-4000.

20. Gordon, M.K. and R.A. Hahn, *Collagens*. Cell Tissue Res. **339**(1): p. 247-57.
21. Löffler, P., *Biochemie und Pathobiochemie*. 1997. p. 734-744.
22. Amano, S., et al., *Protective effect of matrix metalloproteinase inhibitors against epidermal basement membrane damage: skin equivalents partially mimic photoageing process*. Br J Dermatol, 2005. **153 Suppl 2**: p. 37-46.
23. Reynolds, J.J., *Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation*. Oral Dis, 1996. **2**(1): p. 70-6.
24. Fisher, G.J., et al., *Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 2001. **117**(2): p. 219-26.
25. Bernstein, E.F. and J. Uitto, *The effect of photodamage on dermal extracellular matrix*. Clin Dermatol, 1996. **14**(2): p. 143-51.
26. Uitto, J., *Molecular pathology of collagen in cutaneous diseases*. Adv Dermatol, 1991. **6**: p. 265-86; discussion 287.
27. Oikarinen, A., *The aging of skin: chronoaging versus photoaging*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 1990. **7**(1): p. 3-4.
28. Maquart F. X.; Brezillon S.; Wegrowski, Y., *Proteoglycans in Skin Aging*, in *Textbook of Aging Skin*, F.M.A.M.K.W.M. H.I., Editor. 2010, Springer- Verlag Berlin Heidelberg 2010

29. Iozzo, R.V., *Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 609-52.
30. Ungefroren, H. and N.B. Krull, *Transcriptional regulation of the human biglycan gene*. J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15787-95.
31. Iozzo, R.V., *The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins*. J Biol Chem, 1999. **274**(27): p. 18843-6.
32. Schonherr, E., et al., *Interaction of biglycan with type I collagen*. J Biol Chem, 1995. **270**(6): p. 2776-83.
33. Kahari, V.M., et al., *Differential regulation of decorin and biglycan gene expression by dexamethasone and retinoic acid in cultured human skin fibroblasts*. J Invest Dermatol, 1995. **104**(4): p. 503-8.
34. Kolb, M., et al., *Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(6): p. L1327-34.
35. Kahari, V.M., *Activation of dermal connective tissue in scleroderma*. Ann Med, 1993. **25**(6): p. 511-8.
36. 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.
37. Gu, X., et al., *Up-regulated biglycan expression correlates with the malignancy in human colorectal cancers*. Clin Exp Med. **12**(3): p. 195-9.
38. Zimmermann, D.R. and E. Ruoslahti, *Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican*. EMBO J, 1989. **8**(10): p. 2975-81.

39. Iozzo, R.V. and A.D. Murdoch, *Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function*. FASEB J, 1996. **10**(5): p. 598-614.
40. Wight, T.N., *Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 617-23.
41. Zhao, X. and P. Russell, *Versican splice variants in human trabecular meshwork and ciliary muscle*. Mol Vis, 2005. **11**: p. 603-8.
42. Zimmermann, D.R., et al., *Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis*. J Cell Biol, 1994. **124**(5): p. 817-25.
43. Nikitovic, D., et al., *Lumican, a small leucine-rich proteoglycan*. IUBMB Life, 2008. **60**(12): p. 818-23.
44. Kao, W.W., et al., *Focus on molecules: lumican*. Exp Eye Res, 2006. **82**(1): p. 3-4.
45. Ezura, Y., et al., *Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons*. J Cell Biol, 2000. **151**(4): p. 779-88.
46. Chakravarti, S., et al., *Corneal opacity in lumican-null mice: defects in collagen fibril structure and packing in the posterior stroma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(11): p. 3365-73.
47. Parkin, D.M. and C.S. Muir, *Cancer Incidence in Five Continents. Comparability and quality of data*. IARC Sci Publ, 1992(120): p. 45-173.
48. Gilchrest, B.A., *A review of skin ageing and its medical therapy*. Br J Dermatol, 1996. **135**(6): p. 867-75.
49. Punnonen, R., P. Vaajalahti, and K. Teisala, *Local oestriol treatment improves the structure of elastic fibers in the skin of postmenopausal women*. Ann Chir Gynaecol Suppl, 1987. **202**: p. 39-41.
50. Uitto, J. and E.F. Bernstein, *Molecular mechanisms of cutaneous aging: connective tissue alterations in the dermis*. J Invest Dermatol Symp Proc, 1998. **3**(1): p. 41-4.
51. Boni, R. and G. Burg, *[Aging skin: physiological bases, preventive measures and therapeutic modalities]*. Schweiz Med Wochenschr, 2000. **130**(36): p. 1272-8.
52. Biesalski, H.K., et al., *Hohenheimer Consensus Talk. Oxidative and premature skin ageing*. Exp Dermatol, 2003. **12 Suppl 3**: p. 3-15.
53. Rittie, L. and G.J. Fisher, *UV-light-induced signal cascades and skin aging*. Ageing Res Rev, 2002. **1**(4): p. 705-20.
54. Uitto, J., *Understanding premature skin aging*. N Engl J Med, 1997. **337**(20): p. 1463-5.
55. Krutman, J.E., C.A., *Photoimmunology*. 1995: Blackwell science Ltd., Oxford.
56. Masaki, H., T. Atsumi, and H. Sakurai, *Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **206**(2): p. 474-9.
57. Brenneisen, P., et al., *Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts*. J Biol Chem, 1998. **273**(9): p. 5279-87.

58. Cooper, K.D., et al., *UV exposure reduces immunization rates and promotes tolerance to epicutaneous antigens in humans: relationship to dose, CD1a-DR+ epidermal macrophage induction, and Langerhans cell depletion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8497-501.
59. Gilchrest, B.A.K., J., *Photoaging*. 2006: Springer, Heidelberg- New York.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Schwartz, E., *Connective tissue alterations in the skin of ultraviolet irradiated hairless mice*. J Invest Dermatol, 1988. **91**(2): p. 158-61.
65. 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.
66. Katiyar, S.K., et al., *Polyphenolic antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin*. Photochem Photobiol, 1999. **69**(2): p. 148-53.
67. 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.
68. Franceschi, C., et al., *Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans*. Mech Ageing Dev, 2007. **128**(1): p. 92-105.
69. Gosain, A. and L.A. DiPietro, *Aging and wound healing*. World J Surg, 2004. **28**(3): p. 321-6.
70. Auböck, J., *Biologie der Wundheilung*, in *Manual der Wundheilung*, J.A. Thomas Wild, Editor. 2007, Springer: Wien, New York. p. 1-11.
71. Yarosh, D.B., *DNA Damage and Repair in Skin Aging* in *Textbook of Aging Skin*, F.M.A.M.K.W.M. H.I., Editor. 2010, Springer: Heidelberg.
72. Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., *Biochemie*. 2003: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
73. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. Cell, 1995. **83**(6): p. 835-9.
74. Kalaitzidis, D. and T.D. Gilmore, *Transcription factor cross-talk: the estrogen receptor and NF-kappaB*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(2): p. 46-52.

75. Couse, J.F. and K.S. Korach, *Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?* Endocr Rev, 1999. **20**(3): p. 358-417.
76. Gustafsson, J.A., *Estrogen receptor beta--a new dimension in estrogen mechanism of action.* J Endocrinol, 1999. **163**(3): p. 379-83.
77. Gruber, C.J., et al., *Production and actions of estrogens.* N Engl J Med, 2002. **346**(5): p. 340-52.
78. Mendelsohn, M.E. and R.H. Karas, *Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences.* Science, 2005. **308**(5728): p. 1583-7.
79. Albright and F. , *POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS -ITS CLINICAL FEATURES* J Am Med Assoc., 1941: p. 116(22):2465-2474. .
80. BrinCAT, M.P., *Hormone replacement therapy and the skin.* Maturitas, 2000. **35**(2): p. 107-17.
81. 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.
82. Maibach, Z.T.H., *Biological Effects of Estrogen on Skin*, in *Textbook of Aging Skin*, M.A.F.K.W.M.H.I. Maibach, Editor. 2010.
83. Ashcroft, G.S., M.A. Horan, and M.W. Ferguson, *Aging is associated with reduced deposition of specific extracellular matrix components, an upregulation of angiogenesis, and an altered inflammatory response in a murine incisional wound healing model.* J Invest Dermatol, 1997. **108**(4): p. 430-7.
84. 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.
85. 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.
86. Bentley, J.P., et al., *Increased hyaluronate and collagen biosynthesis and fibroblast estrogen receptors in macaque sex skin.* J Invest Dermatol, 1986. **87**(5): p. 668-73.
87. 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.
88. 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.
89. Kanda, N. and S. Watanabe, *Regulatory roles of sex hormones in cutaneous biology and immunology.* J Dermatol Sci, 2005. **38**(1): p. 1-7.
90. 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.
91. 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.

92. Halliday, G.M., *Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis*. *Mutat Res*, 2005. **571**(1-2): p. 107-20.
93. Stern, R., et al., *The many ways to cleave hyaluronan*. *Biotechnol Adv*, 2007. **25**(6): p. 537-57.
94. Passarini, B., et al., *[Effect of hyaluronic acid on the reparative process of non-healing ulcers. Comparative study]*. *G Ital Dermatol Venereol*, 1982. **117**(3): p. XXVII-XXX.
95. Hellstrom, S. and C. Laurent, *Hyaluronan and healing of tympanic membrane perforations. An experimental study*. *Acta Otolaryngol Suppl*, 1987. **442**: p. 54-61.
96. Longaker, M.T., et al., *Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid*. *Ann Surg*, 1991. **213**(4): p. 292-6.
97. Brincat, M.P., Y.M. Baron, and R. Galea, *Estrogens and the skin*. *Climacteric*, 2005. **8**(2): p. 110-23.
98. Callens, A., et al., *Does hormonal skin aging exist? A study of the influence of different hormone therapy regimens on the skin of postmenopausal women using non-invasive measurement techniques*. *Dermatology*, 1996. **193**(4): p. 289-94.
99. Maheux, R., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effect of conjugated estrogens on skin thickness*. *Am J Obstet Gynecol*, 1994. **170**(2): p. 642-9.
100. Brincat, M., et al., *A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal woman*. *Obstet Gynecol*, 1987. **70**(6): p. 840-5.
101. Chung, J.H., et al., *Modulation of skin collagen metabolism in aged and photoaged human skin in vivo*. *J Invest Dermatol*, 2001. **117**(5): p. 1218-24.
102. Pirila, E., et al., *Wound healing in ovariectomized rats: effects of chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen on matrix metalloproteinases -8, -13 and type I collagen expression*. *Curr Med Chem*, 2001. **8**(3): p. 281-94.
103. Ashcroft, G.S., et al., *Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(9): p. 1309-18.
104. Kovacs, E.J., T.P. Plackett, and P.L. Witte, *Estrogen replacement, aging, and cell-mediated immunity after injury*. *J Leukoc Biol*, 2004. **76**(1): p. 36-41.
105. Rock, K., et al., *Collagen fragments inhibit hyaluronan synthesis in skin fibroblasts in response to ultraviolet B (UVB): new insights into mechanisms of matrix remodeling*. *J Biol Chem*. **286**(20): p. 18268-76.
106. 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.
107. Fisher, G.J., et al., *Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin*. *Am J Pathol*, 2009. **174**(1): p. 101-14.
108. Vuillermoz, B., et al., *Influence of aging on glycosaminoglycans and small leucine-rich proteoglycans production by skin fibroblasts*. *Mol Cell Biochem*, 2005. **277**(1-2): p. 63-72.

109. Helvering, L.M., et al., *Differential effects of estrogen and raloxifene on messenger RNA and matrix metalloproteinase 2 activity in the rat uterus*. Biol Reprod, 2005. **72**(4): p. 830-41.
110. Robinson, J.A., et al., *Osteoclasts and transforming growth factor-beta: estrogen-mediated isoform-specific regulation of production*. Endocrinology, 1996. **137**(2): p. 615-21.
111. 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.
112. Podskochy, A., et al., *Biglycan gene expression in UVR-exposed rabbit corneas*. Acta Ophthalmol Scand, 2004. **82**(2): p. 200-4.
113. Wiberg, C., et al., *Biglycan and decorin bind close to the n-terminal region of the collagen VI triple helix*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18947-52.
114. 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.
115. Heegaard, A.M., et al., *Biglycan deficiency causes spontaneous aortic dissection and rupture in mice*. Circulation, 2007. **115**(21): p. 2731-8.
116. 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.
117. Westermann, D., et al., *Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction*. Circulation, 2008. **117**(10): p. 1269-76.
118. 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.
119. 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.
120. 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.
121. 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.
122. Saika, S., et al., *Role of lumican in the corneal epithelium during wound healing*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2607-12.
123. Rickard, D.J., et al., *Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta*. J Cell Biochem, 2003. **89**(3): p. 633-46.
124. Salgado, R.M., et al., *Hormone-regulated expression and distribution of versican in mouse uterine tissues*. Reprod Biol Endocrinol, 2009. **7**: p. 60.
125. Bernstein, E.F., et al., *Ultraviolet radiation activates the human elastin promoter in transgenic mice: a novel in vivo and in vitro model of cutaneous photoaging*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(2): p. 269-73.
126. Knott, A., et al., *Deregulation of versican and elastin binding protein in solar elastosis*. Biogerontology, 2009. **10**(2): p. 181-90.

127. Wu, Y., et al., *Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis*. Matrix Biol, 2005. **24**(1): p. 3-13.
128. 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.
129. Bidmon, H.J., et al., *Estradiol distribution and penetration in rat skin after topical application, studied by high resolution autoradiography*. Histochemistry, 1990. **95**(1): p. 43-54.
130. Stumpf, W.E., M. Sar, and S.G. Joshi, *Estrogen target cells in the skin*. Experientia, 1974. **30**(2): p. 196-8.
131. Punnonen, R., *Effect of castration and peroral estrogen therapy on the skin*. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl, 1972. **21**: p. 3-44.
132. Uitto, J., *Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-related alterations in collagen and elastin*. Dermatol Clin, 1986. **4**(3): p. 433-46.
133. van Schanke, A., et al., *Single UVB overexposure stimulates melanocyte proliferation in murine skin, in contrast to fractionated or UVA-1 exposure*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(1): p. 241-7.
134. Tronnier, M., et al., *One single erythemagenic UV irradiation is more effective in increasing the proliferative activity of melanocytes in melanocytic naevi compared with fractionally applied high doses*. Br J Dermatol, 1997. **137**(4): p. 534-9.
135. Rudolph, P., et al., *Enhanced expression of Ki-67, topoisomerase IIalpha, PCNA, p53 and p21WAF1/Cip1 reflecting proliferation and repair activity in UV-irradiated melanocytic nevi*. Hum Pathol, 1998. **29**(12): p. 1480-7.
136. McCormick, T.S., S.R. Stevens, and K. Kang, *Macrophages and cutaneous inflammation*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(1): p. 25-6.
137. Rodero, M.P. and K. Khosrotehrani, *Skin wound healing modulation by macrophages*. Int J Clin Exp Pathol. **3**(7): p. 643-53.
138. Mahdavian Delavary, B., et al., *Macrophages in skin injury and repair*. Immunobiology. **216**(7): p. 753-62.
139. Norris, D.A., et al., *Ultraviolet radiation can either suppress or induce expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the surface of cultured human keratinocytes*. J Invest Dermatol, 1990. **95**(2): p. 132-8.
140. Krutmann, J. and M. Grewe, *Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation-induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(1 Suppl): p. 67S-70S.
141. Cornelius, L.A., et al., *Selective upregulation of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) by ultraviolet B in human dermal microvascular endothelial cells*. J Invest Dermatol, 1994. **103**(1): p. 23-8.
142. Di Nuzzo, S., et al., *Exposure to UVB induces accumulation of LFA-1+ T cells and enhanced expression of the chemokine psoriasin in normal human skin*. Photochem Photobiol, 2000. **72**(3): p. 374-82.
143. Gutteridge, J.M. and J. Mitchell, *Redox imbalance in the critically ill*. Br Med Bull, 1999. **55**(1): p. 49-75.

144. Gloire, G., S. Legrand-Poels, and J. Piette, *NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later*. *Biochem Pharmacol*, 2006. **72**(11): p. 1493-505.
145. Beak, S.M., Y.S. Lee, and J.A. Kim, *NADPH oxidase and cyclooxygenase mediate the ultraviolet B-induced generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor-kappaB in HaCaT human keratinocytes*. *Biochimie*, 2004. **86**(7): p. 425-9.
146. Hanson, K.M. and R.M. Clegg, *Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin*. *Photochem Photobiol*, 2002. **76**(1): p. 57-63.
147. Liu, R.M., *Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis*. *Antioxid Redox Signal*, 2008. **10**(2): p. 303-19.
148. Saari, H., et al., *Differential effects of reactive oxygen species on native synovial fluid and purified human umbilical cord hyaluronate*. *Inflammation*, 1993. **17**(4): p. 403-15.
149. Schulze-Osthoff, K., et al., *Oxidative stress and signal transduction*. *Int J Vitam Nutr Res*, 1997. **67**(5): p. 336-42.
150. Brenneisen, P., H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, *Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events*. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. **973**: p. 31-43.
151. Termeer, C., et al., *Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4*. *J Exp Med*, 2002. **195**(1): p. 99-111.
152. Laurent, T.C., et al., *Hyaluronan in inflammatory joint disease*. *Acta Orthop Scand Suppl*, 1995. **266**: p. 116-20.
153. Saari, H., *Oxygen derived free radicals and synovial fluid hyaluronate*. *Ann Rheum Dis*, 1991. **50**(6): p. 389-92.
154. McKee, C.M., et al., *Hyaluronan fragments induce nitric-oxide synthase in murine macrophages through a nuclear factor kappaB-dependent mechanism*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(12): p. 8013-8.
155. Horton, M.R., et al., *Hyaluronan fragments synergize with interferon-gamma to induce the C-X-C chemokines mig and interferon-inducible protein-10 in mouse macrophages*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(52): p. 35088-94.
156. Horton, M.R., et al., *Regulation of hyaluronan-induced chemokine gene expression by IL-10 and IFN-gamma in mouse macrophages*. *J Immunol*, 1998. **160**(6): p. 3023-30.
157. Chang, K.C., et al., *Estrogen receptor beta is a novel therapeutic target for photoaging*. *Mol Pharmacol*. **77**(5): p. 744-50.
158. Madison, K.C., *Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis*. *J Invest Dermatol*, 2003. **121**(2): p. 231-41.
159. Holbrook, K.A. and G.F. Odland, *The fine structure of developing human epidermis: light, scanning, and transmission electron microscopy of the periderm*. *J Invest Dermatol*, 1975. **65**(1): p. 16-38.
160. Tsukahara, K., et al., *The characteristics of aromatase deficient hairless mice indicate important roles of extragonadal estrogen in the skin*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008. **108**(1-2): p. 82-90.

161. 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.
162. Bronaugh, R.L. and R.F. Stewart, *Methods for in vitro percutaneous absorption studies V: Permeation through damaged skin*. *J Pharm Sci*, 1985. **74**(10): p. 1062-6.
163. Miyauchi, H., T. Horio, and Y. Asada, *The effect of ultraviolet radiation on the water-reservoir functions of the stratum corneum*. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 1992. **9**(5): p. 193-7.
164. 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.
165. Sivaprasad, U., et al., *IL-13Ralpha2 has a protective role in a mouse model of cutaneous inflammation*. *J Immunol*. **185**(11): p. 6802-8.
166. Kugelberg, E., et al., *Establishment of a superficial skin infection model in mice by using Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(8): p. 3435-41.
167. Sator, P.G., et al., *The influence of hormone replacement therapy on skin ageing: a pilot study*. *Maturitas*, 2001. **39**(1): p. 43-55.
168. Phillips, T.J., Z. Demircay, and M. Sahu, *Hormonal effects on skin aging*. *Clin Geriatr Med*, 2001. **17**(4): p. 661-72, vi.

6. Anhänge

6.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J.W. Fischer für die freundliche Überlassung des interessanten Forschungsthemas sowie die immerwährende motivierende Betreuung und die Möglichkeit, neue Erfahrungen gesammelt haben zu dürfen.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie des Universitätsklinikums Essen für die stets freundliche und fachliche Unterstützung im Labor. Besonders danken möchte ich an dieser Stelle:

Meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Katharina Röck für die kontinuierliche Unterstützung und fachliche Beratung.

Herrn Dr. rer. nat. Till Freudenberger, Dr. rer. nat. Sören Twarock und Frau Dr. rer. nat. Ariane Melchior Becker danke ich besonders für die fachliche, kompetente Mithilfe und Unterstützung im Labor sowie die vielen freundschaftlichen Gespräche und den angenehmen menschlichen Umgang.

Annika Zimmermann für all die Hilfe und fachliche Unterstützung im Labor, aber auch die erheitern- den, lustigen Gespräche mit deren Hilfe die Zeit im Labor wie im Flug vorbeiging.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meiner lieben Mama, Papa, Oma Dela und Opa Paul sowie Onkel Tüdi bedanken, dass sie mir dieses Studium ermöglichten und mich immer unterstützt haben. Meinem Bruder Ferdi danke ich für die Erinnerung daran, dass man auch „mal chillen“ muss. Meiner großen Schwestern Steffi und Jonas danke ich für all die aufmunternden Worte im Bezug auf die Doktorarbeit und das Leben allgemein. Steffi, du bist die beste große Schwester die man sich nur wünschen kann.

Abschließend gilt mein herzlicher Dank meinem Freund Michael, der mich in all den Jahren stets ohne Murren ertragen und bedingungslos unterstützt sowie dem Gefühl, immer auf dich zählen zu können.

6.2 Eidesstaatliche 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.

Köln, den 06.03.2017

Nikola Fuchs, geb. 03.05.1987 in Geldern