

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

**Modulation der Seneszenzinduktion
humaner Fibroblasten durch blaues Licht
der Wellenlänge 453 nm**

Dissertation

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

vorgelegt von
Max Prost
2019

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

gez.:

Dekanin/Dekan: Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Referentin/Referent: Prof. Dr. C. V. Suschek

Korreferentin/Korreferent: Priv.-Doz. Dr. C. Mahotka

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Einleitung: Blaues Licht der Wellenlänge 453 nm besitzt ein hohes Therapiepotenzial in der Dermatologie. Trotz seines geringen Energiegehaltes ist eine Therapie mit blauem Licht nicht gänzlich unproblematisch, da seine Anwendung mit Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) einhergeht. Es ist allgemein anerkannt, dass ROS und oxidativer Stress wesentliche Faktoren der zellulären Seneszenz darstellen. Diese ist charakterisiert durch eine beschränkte Teilungsfähigkeit von Zellen mit anschließendem Zellzyklusarrest. Ein wichtiger Marker seneszenten Zellen ist die Akkumulation der β -Galaktosidase (β -Gal) im Zytoplasma. Ziel dieser Arbeit war es zu evaluieren, ob blaues Licht die Seneszenz humaner Hautfibroblasten (FB) beeinflusst.

Material/Methoden: Es wurden FB-Kulturen mit unterschiedlichen Dosen blauen Lichts und als positive Kontrolle mit UVA-Strahlen bestrahlt. Der Grad der β -Gal-Akkumulation wurde mittels einer β -Gal-spezifischen Färbung bestimmt. Weiterhin wurde der ROS-Gehalt fluorometrisch charakterisiert, die Proteinexpression redoxaktiver Enzyme wurde mittels der Western-Blot Technik quantifiziert und die mRNA-Expression dieser redoxaktiven Enzyme mittels rt-PCR bestimmt. In einer abschließenden Versuchsreihe wurde zudem der Einfluss einer langfristigen regelmäßigen Bestrahlung mit blauem Licht auf die kumulative Populationsverdopplungszeit von Fibroblasten untersucht.

Ergebnisse: Die Exposition der Zellen mit blauem Licht mit Dosen bis zu 80 J/cm^2 führte zu einer signifikanten Erhöhung der ROS-Generierung. Paradoxe Weise war jedoch auch eine signifikant niedrigere Anzahl β -Gal-positiver Zellen zu beobachten verglichen mit den nicht-bestrahlten Kontrollkulturen. Im Gegensatz dazu führte eine Exposition der Zellen mit UVA-Strahlen zu einem starken und signifikanten Anstieg der Zahl β -Gal-positiver Zellen. Bei der Untersuchung der mRNA-Expression der redoxaktiven Enzyme konnten keine signifikanten Veränderungen gezeigt werden. In Bezug auf die Proteinexpression dieser Enzyme war lediglich bei Betrachtung der Katalase eine signifikante Verringerung der Expression in bestrahlten Zellen festzustellen. Weiterhin war zu beobachten, dass sich eine langfristige Bestrahlung mit blauem Licht negativ auf die kumulative Populationsverdopplung auswirkt.

Diskussion: Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz einer Erhöhung des oxidativen Stresses und Erniedrigung des antioxidativen Potenzials der bestrahlten Zellen blaues Licht in den hier verwendeten therapeutisch-relevanten Dosen paradoxe Weise zu einer geringeren Expression des Seneszenz-Parameters *β -Galaktosidase* in den bestrahlten Zellen führte. Aufgrund der nicht signifikanten Ergebnisse der Untersuchung der Proteinexpression der untersuchten redoxaktiven Enzyme sowie der Expression der zugehörigen mRNA ließ sich dieses Paradoxon noch nicht endgültig klären, und es bedarf noch zukünftiger Versuche zur endgültigen Beantwortung der Frage

III

nach dem Einfluss von blauem Licht auf die Modulation von Seneszenzinduktion in humanen Fibroblasten. Ebenso muss die Frage aufgeworfen werden, ob *β -Galaktosidase* in Bezug auf diese Fragestellung einen geeigneten Parameter zur Seneszenzbeurteilung darstellt.

Abstract

Introduction: Blue light with the wavelength 453 nm has a high therapeutic potential in dermatology. Despite the short energy content, therapy with blue light is not completely unproblematic, since its application is accompanied by the formation of reactive oxygen species (ROS). It is generally accepted that ROS and oxidative stress are important factors of cellular senescence. Senescence is characterized by a limited ability of cells to divide with subsequent cell cycle arrest. An important marker is the accumulation of β -galactosidase (β -gal) in the cytoplasm of senescent cells. The aim of this study was to evaluate whether blue light influences the senescence of human dermal fibroblasts (FB).

Material/Methods: For this purpose, FB cultures were irradiated with different doses of blue light and as a positive control with UVA light. The degree of β -gal accumulation was determined by a β -gal-specific staining. Furthermore, the ROS content was characterized fluorometrically, the protein expression of redox-active enzymes (catalase, superoxide dismutase 1 and 2) was quantified by western blot technique and the mRNA expression of these redox-active enzymes was determined by rt-PCR. In a final series of experiments the influence of long-term blue light irradiation on the cumulative population doubling time of fibroblasts was investigated.

Results: It could be shown that exposure of cells to blue light with doses up to 80 J / cm² leads to a significant increase of ROS generation. Paradoxically, however, there was observed a significantly lower number of β -gal positive cells compared to the non-irradiated control cultures. In contrast, exposure of the cells to UVA radiation resulted in a strong and significant increase in the number of β -gal positive cells. In the study of the mRNA expression of the various redox-active enzymes, it was not possible to show any significant changes. In terms of protein expression of these redox-active enzymes, there was only found a significant reduction of catalase expression in irradiated cells. The superoxide dismutases showed no significant changes. Furthermore, long-term irradiation with blue light has a negative effect on the cumulative population doubling.

Discussion: In summary, despite an increase in oxidative stress and lowering of the antioxidant potential of the irradiated cells, blue light in the therapeutically relevant doses used here paradoxically resulted in a lower expression of the senescence parameter β -galactosidase in irradiated cells. Due to the insignificant results of the investigation of the protein expression of the investigated redox - active enzymes, as well as the expression of the corresponding mRNA, this paradox could not be finally clarified and further experiments are needed to explain the influence of blue light on the Modulation of Senescence Induction in Human Fibroblasts. Furthermore you have to talk about the question if β -galactosidase is the right parameter to analyze senescence in this study.

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|---------------|--|--------------------|--|
| °C | Grad Celsius | l | Liter |
| A | Ampere | LED | light-emitting diode |
| Abb | Abbildung | LLLT | low-level light therapy |
| ALA | Delta-Amino-Lävulinsäure | M | Mol |
| AP-1 | activator Protein 1 | m | Meter |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat | MAP-Kinasen | mitogen-activated protein- Kinase |
| BSA | Bovine serum albumin | mg | Milligramm |
| cDNA | komplementäre DNA | min | Minute |
| cm | Zentimeter | mJ | Millijoul |
| CT | cycle threshold | ml | Milliliter |
| d-NTP | Desoxyribonukleosid- triphosphate | mM | Millimol |
| DDR | DNA-damage-response | mm | Millimeter |
| DHR | Dihydrorhodamin 123 | MMP | Matrix-Metalloprotease |
| DMF | Dimethylformamid | mtDNA | mitochondriale Desoxyribonukleinsäure |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | mW | Milliwatt |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | NADH | Nicotinamadenin-dinukleotid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure | NADPH | Nicotinamadenin- dinukleotidphosphat |
| DNP-Ho | 2,4-Dinitrophenylhydrazon | NF-κB | nuclear factor 'kappa-light- chain-enhancer' of activated B- cells |
| DNP-Hi | 2,4-Dinitrophenylhydrazin | ng | Nanogramm |
| DPBS | Dublecco's Phosphate- Buffered-Saline | nm | Nanometer |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | NOX | NADPH-Oxidase |
| ERK | extracellular-signal-regulated Kinasen | NTC | non-template control |
| Etc | et cetera | PBS | Phosphate Buffered Saline |
| FCS | fetal calf serum | PBS-T | Tris Buffer Saline with Tween |
| g | Gramm | PCR | polymerase-chain-reaction |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase | PDT | Photodynamische Therapie |
| HE | Hämatoxylin-Eosin | PpIX | Protoporphyrin IX |
| HRP | Meerrettichperoxidase | PUVA | psoralen plus ultraviolet A |
| IPL | Intense pulsed light-Therapy | qRT-PCR | Real-time- quantitative- PCR |
| J | Joul | RB | Retinoblastom |
| JNK | c-Jun-N-terminale- Kinasen | | |
| kDa | Kilodalton | | |

| | | | |
|--------------|--|--------------|--|
| RIPA | Radioimmunoprecipitation assay buffer | TSP 1 | Angiogeneseinhibitor Thrombospondin 1 |
| RNA | Ribonukleinsäure | U | Units |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies | UV | Ultraviolett |
| rpm | rounds per minute | V | Volt |
| SASP | senescence-associated secretory phenotype | VEGF | vascular endothelial growth factors |
| SDS | Natriumdodecylsulfat | W | Watt |
| Sek | Sekunden | µg | Mikrogramm |
| SOD | Superoxid-Dismutase | µl | Mikroliter |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin | µm | Mikrometer |
| TGF-β | transforming growth factor β | µM | Mikromol |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)- aminomethan | | |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|--|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Haut | 1 |
| 1.1.1 | Epidermis..... | 2 |
| 1.1.2 | Dermis..... | 3 |
| 1.1.3 | Subcutis..... | 3 |
| 1.2 | Fibroblasten | 4 |
| 1.3 | Hautalterung | 4 |
| 1.3.1 | Intrinsische Hautalterung..... | 5 |
| 1.3.2 | Extrinsische Hautalterung..... | 6 |
| 1.4 | Zellalterung | 7 |
| 1.4.1 | Zelluläre Seneszenz..... | 7 |
| 1.4.2 | <i>Premature cellular Senescence</i> | 8 |
| 1.4.3 | Charakteristika seneszenter Zellen..... | 8 |
| 1.5 | Reaktive Sauerstoffspezies | 10 |
| 1.5.1 | Definition..... | 10 |
| 1.5.2 | Entstehung von <i>ROS</i> | 11 |
| 1.5.2.1 | <i>Endogene ROS</i> -Entstehung..... | 11 |
| 1.5.2.2 | <i>Exogene Faktoren der endogenen ROS</i> -Produktion..... | 12 |
| 1.5.3 | Wirkung im Körper..... | 13 |
| 1.5.4 | Abwehrmechanismen des Körpers..... | 14 |
| 1.6 | Licht | 16 |
| 1.6.1 | Definition und Spektren..... | 16 |
| 1.6.2 | UV-Licht..... | 17 |
| 1.6.3 | Blaues Licht..... | 19 |
| 1.6.4 | Lichttherapie..... | 21 |
| 1.7 | Ziele der Arbeit | 23 |
| 2 | Material und Methoden | 24 |
| 2.1 | Materialien | 24 |
| 2.1.1 | Geräte..... | 24 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterial..... | 25 |
| 2.1.3 | Chemikalien..... | 26 |
| 2.1.4 | Molekularbiologische Materialien und Kit Systeme..... | 28 |
| 2.1.5 | Medien, Lösungen und Puffer..... | 29 |
| 2.1.6 | Antikörper..... | 30 |
| 2.2 | Spender | 30 |
| 2.3 | Zellkultur | 30 |
| 2.3.1 | Isolation von Fibroblasten aus der Vorhaut..... | 30 |
| 2.3.2 | Subkultivierung der Zellen..... | 31 |
| 2.3.3 | Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer..... | 32 |
| 2.3.4 | Kryokonservierung der Zellen..... | 32 |
| 2.3.5 | Wiederaufnahme von kryokonservierten Zellen in Zellkultur..... | 33 |
| 2.3.6 | Bestrahlung von Zellen..... | 33 |
| 2.4 | Bestimmung der Seneszenzinduktion unter Bestrahlung mittels β-Galaktosidase | |
| Messung | | 35 |
| 2.5 | Bestimmung der <i>Catalase</i>, <i>Superoxiddismutase-1</i> und <i>Superoxiddismutase-2</i> | |
| Expression unter Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsdosen und -dauer mittels <i>Western</i> | | |
| Blot-Analyse | | 37 |
| 2.5.1 | Ernten von Fibroblasten..... | 37 |
| 2.5.2 | Proteinkonzentrationsbestimmung..... | 38 |
| 2.5.3 | Prinzip der <i>Western Blot</i> -Analyse..... | 39 |
| 2.5.4 | Gießen der Gele..... | 39 |
| 2.5.5 | Vorbereitung der Proben..... | 40 |
| 2.5.6 | <i>SDS-Polyacrylamid</i> -Gelelektrophorese..... | 40 |
| 2.5.7 | Blotting..... | 41 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.5.8 | <i>Ponceau-S-Färbung</i> | 42 |
| 2.5.9 | Immundetektion der <i>Katalase</i> , <i>SOD1</i> und <i>SOD2</i> Proteine sowie von <i>GAPDH</i> | 42 |
| 2.6 | Bestimmung der Menge an oxidierten Proteinen unter Einfluss von Bestrahlung mittels <i>Dot-Blot</i>-Analyse | 43 |
| 2.7 | Analyse der Entstehung von <i>ROS</i> durch Bestrahlung mit blauem Licht | 45 |
| 2.7.1 | Prinzip des <i>CellTiter-Blue</i> [®] -Assays..... | 45 |
| 2.7.2 | Messung von <i>ROS</i> mittels <i>Dihydrorhodamin 123 (DHR)</i> | 45 |
| 2.8 | <i>Real-time- quantitative- PCR (qRT-PCR)</i> | 46 |
| 2.8.1 | <i>Ribonukleinsäure (RNA)</i> Isolierung..... | 46 |
| 2.8.1.1 | <i>RNA</i> -Isolierung mittels <i>RNeasy Mini Kit</i> von <i>Quiagen</i> | 46 |
| 2.8.1.2 | Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der <i>Total-RNA</i> | 47 |
| 2.8.2 | <i>Reverse-Transkription</i> der <i>Total-RNA</i> in <i>cDNA</i> | 47 |
| 2.8.3 | <i>Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)</i> | 48 |
| 2.9 | Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplung unter Einfluss von Bestrahlung | 49 |
| 3 | Ergebnisse | 50 |
| 3.1 | Bestimmung der Seneszenzinduktion unter Bestrahlung mittels <i>β-Galaktosidase Assay</i> 50 | |
| 3.2 | Bestimmung der <i>Catalase</i> , <i>Superoxiddismutase-1</i> und <i>Superoxiddismutase-2</i> Expression unter Einfluss unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und -dauer mittels <i>Western Blot</i> -Analyse | 54 |
| 3.3 | Bestimmung der Genexpression für <i>Catalase</i> , <i>Superoxiddismutase-1</i> und <i>Superoxiddismutase-2</i> Expression unter Einfluss unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und - dauer mittels <i>Real-Time PCR</i> | 58 |
| 3.4 | Bestimmung der Menge an oxidierten Proteinen unter Einfluss von Bestrahlung mittels <i>Dot-Blot</i> -Analyse | 60 |
| 3.5 | Analyse der Entstehung von <i>ROS</i> in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht 62 | |
| 3.6 | Analyse der kumulativen Populationsverdopplungszeiten in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht | 63 |
| 4 | Diskussion | 64 |
| 5 | Abbildungsverzeichnis | 74 |
| 6 | Tabellenverzeichnis | 75 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 76 |

1 Einleitung

1.1 Haut

Die Haut (*Cutis*) ist das größte Organ des Menschen. Sie hat eine Fläche von 1,5 – 2 m² und eine Dicke von 1 – 4 mm, wobei diese von der Körperregion und dem Alter des Menschen abhängt. Histologisch gliedert sich die Haut in Oberhaut (*Epidermis*) und Lederhaut (*Dermis*). Die unter der Dermis liegende Subcutis trägt als dritte Schicht zur Bildung der Hautdecke (*Integumentum commune*) bei (Siehe Abb. 1). Als Hautanhangsgebilde bezeichnet man Haare, Nägel und Drüsen. Haare sind allerdings nicht überall auf der Haut zu finden. An *Palmar-* und *Plantarflächen* befindet sich die dicke Leistenhaut, welche keine Haare besitzt. Die dünnere behaarte Haut bezeichnet man als Felderhaut, dieser Hauttyp macht den Großteil der menschlichen Haut aus. Die Drüsen der Haut lassen sich weiter klassifizieren in *ekkrine* Schweißdrüsen, *apokrine* Duftdrüsen und *holokrine* Talgdrüsen. [1-3]

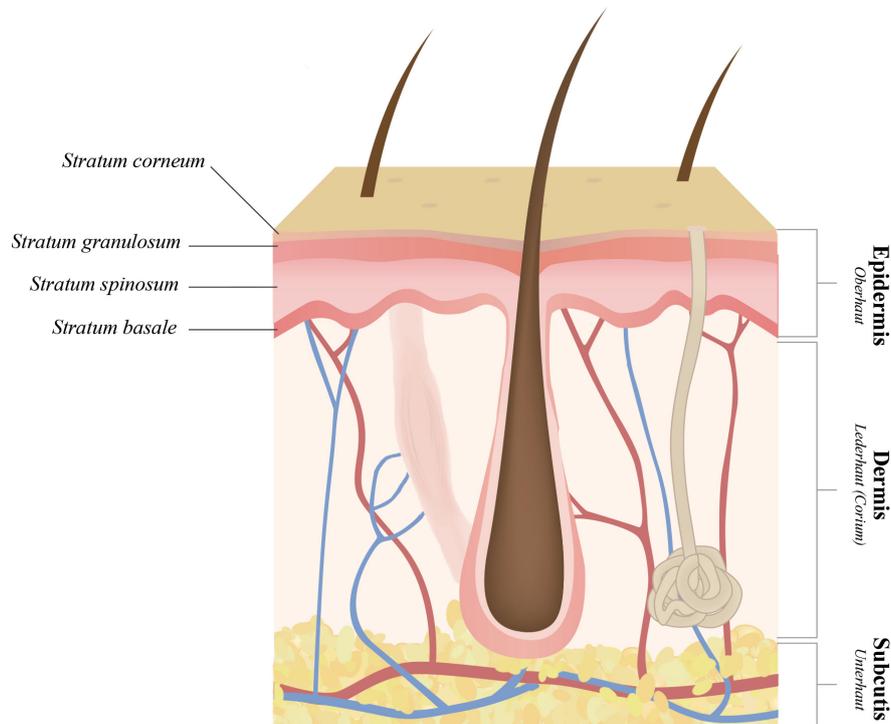


Abb. 1. Schema Hautschichten

Schematische Darstellung der verschiedenen Schichten der menschlichen Haut. Modifiziert nach <https://katawan.de/koerper/haut/hautschichten/>

Die Haut ist ein multifunktionelles Organ. Zum einen dient sie als Schutz vor biologischen Einflüssen, wie zum Beispiel Krankheitserregern, sowie chemischen und physikalischen Einflüssen der Umwelt auf den Körper. Als wichtigsten physikalischen Einfluss ist hier Strahlung zu nennen. Die Haut hat zentrale Aufgaben in der Regulation des Wasser- und Temperaturhaushaltes des Menschen, dient der Sinneswahrnehmung und auch dem Senden von Signalen an die Umwelt, zum Beispiel über Duftdrüsen.

Letztendlich hat sie auch *endokrine* Aufgaben, wie unter anderem die Vitamin-D- Bildung unter Einfluss von UVB-Licht.[1]

1.1.1 Epidermis

Die oberste Sicht der Haut bildet die *Epidermis*, sie steht in direktem Kontakt zur Umwelt. Histologisch besteht diese Schicht aus einem mehrschichtig verhornten Plattenepithel, welches wiederum zum größten Teil aus Keratinozyten gebildet wird [1]. Weitere in der *Epidermis* vorkommende Zelltypen sind Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen [2]. Die Melanozyten befinden sich vorwiegend im Stratum basale (siehe unten), sie besitzen lange Zellausläufer, die sich zwischen die Keratinozyten in den höheren Schichten erstrecken und über welche sie mit bis zu 30 Keratinozyten in Kontakt treten können. Eine der wichtigsten Aufgaben dieser Zellen ist die Produktion des Pigments Melanin, welches sie über die oben genannten dendritischen Fortsätze in die Keratinozyten übertragen, wo es dann zum Schutz der *Desoxyribonukleinsäure (DNA)* vor lichtinduzierten Schäden dient [4]. Die Dicke dieser Sicht variiert zwischen 0,4 – 0,6 mm in der Leistenhaut und 75 – 150 µm in der Felderhaut [1]. Die Abschuppung von Hornzellen (*Desquamation*) in den obersten Hautschichten, sowie die ständige Neubildung von Zellen in der Basalschicht und ihre Wanderung in apikale Schichten sorgen für einen grob 4-wöchigen Lebenszyklus von Keratinozyten in der Haut [2].

Die *Epidermis* wird in 5 Schichten untergliedert. Am weitesten in der Tiefe liegt das *Stratum basale*, die Keratinozyten in dieser Schicht haben eine kubische Form und bilden basale Fortsätze zur Verankerung des Epithels in der darunterliegenden Basallamina aus. In dieser Schicht befinden sich auch die ständig teilungsfähigen Stammzellen, von denen die Erneuerung des Epithels ausgeht [3]. Zusammen mit der folgenden Schicht, dem *Stratum spinosum*, wird das *Stratum basale* als das sogenannte *Stratum germinativum* zusammengefasst, da von beiden Schichten zusammen die Zellteilung und Erneuerung der *Epidermis* ausgeht [1]. Das *Stratum spinosum* ist gekennzeichnet durch mehrlagige Keratinozyten, die viele stachelförmige Fortsätze bilden, welche mit den gleichen Fortsätzen von anderen Zellen über *Desmosomen* in Verbindung stehen und somit vor Abschilferung schützen [3]. Weiter superficial liegt die Körnerschicht (*Stratum granulosum*), in welcher die Zellen abgeflacht sind und 1-3 Lagen bilden. Die Zellen enthalten charakteristische *Keratohyalingranula*, welches ein Vorläufer des Proteins *Filaggrin* ist. Des Weiteren werden von den Zellen Lamellenkörper gebildet, welche Proteine und Lipide enthalten. Diese werden in den Interzellularraum abgegeben und bilden dort einen elementaren Teil der wasserabweisenden Barriere der Epidermis im *Stratum corneum*, wodurch auf der anderen Seite auch Wasserverlust und Austrocknung des Körpers verhindert werden [1]. Die nächste Schicht, das *Stratum lucidum* ist lediglich in der unbehaarten Leistenhaut vorhanden, sie stellt hier eine Übergangsschicht zwischen dem *Stratum granulosum* mit den noch lebenden Zellen und der superfiziellsten Schicht, dem *Stratum corneum*, aus toten verhornten Zellen dar. Im *Stratum lucidum* gehen die Zellen mit ihren Organellen in einer besonderen Art der Apoptose relativ rasch zugrunde [4]. Die äußerste Schicht ist das bereits erwähnte *Stratum corneum*, welches aus mehreren Schichten toter

verhornter Zellen besteht und die äußerste Barriere des Körpers gegen die Umwelt bildet. Die Zellen in dieser Schicht zeichnen sich dadurch aus, dass sie ihre Zellorganellen und Wasser verlieren und fast nur aus Keratin bestehen. Das Keratin bildet zusammen mit dem bereits erwähnten *Filaggrin* Komplexe, welche eine wichtige Rolle für die Stabilität der Zellmembranen in dieser Schicht spielen [1].

1.1.2 Dermis

Als Lederhaut (*Dermis*) wird das spezielle Bindegewebe der Haut bezeichnet [1]. Es liegt unterhalb der *Epidermis*, bildet mit dieser zusammen die *Cutis* und stellt die Verbindung zur *Subcutis* dar [3]. Die Hauptfunktionen dieser Schicht sind es, der Haut Elastizität und Festigkeit zu verleihen, Wasser zu speichern und vor Verletzungen zu schützen. Rund 15 - 20 % des Körpergewichtes werden durch die *Dermis* repräsentiert [1]. In der *Dermis* sind mit Fibroblasten, Mastzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und Lymphozyten eine Vielzahl an Zellen beheimatet [2]. Sie ist äußerst reich an Bindegewebe, besonders an Kollagenfasern. Das Hauptprotein der Kollagenfasern, das Kollagen, wird durch die Fibroblasten produziert [4]. Histologisch lässt sich die *Dermis* in 2 Schichten aufteilen, dem direkt unter der *Epidermis* liegenden *Stratum papillare* und dem weiter tiefer liegenden *Stratum reticulare* [3]. Ersteres ist gekennzeichnet durch die Ausbildung von Bindegewebspapillen, welche mit der *Epidermis* verzahnt sind. Ebenfalls sind in dieser Schicht zahlreiche Blutkapillaren enthalten, die der Ernährung der *Epidermis* dienen. [1]. Im *Stratum reticulare* dominiert dichtes ungeordnetes Bindegewebe, welches reich ist an Kollagen Typ I und elastischen Fasern. Es verleiht der *Dermis* ihre Festigkeit. Zellen finden sich in dieser Schicht nur recht vereinzelt [4]. Die Blutgefäße, die die Haut versorgen und eine wichtige Rolle in der Thermoregulation des Körpers einnehmen entspringen aus Arterien, welche in der Muskulatur verlaufen und die *Subkutis* bis in die *Dermis* durchwandern. In der *Dermis* teilen sie sich in zwei Gefäßplexus auf, den unter den Papillen liegenden *Plexus superficialis* und dem an der Grenze zur *Dermis* liegenden *Plexus profundus* [2].

1.1.3 Subcutis

Die *Subcutis*, oder auch Unterhaut (*Tela subcutanea*), besteht zum größten Teil aus Fettgewebe, welchem durch Bindegewebssepten (*Retinacula cutis*) Struktur gegeben wird [4]. Sie reicht bis zur oberflächlichen Körperfazie, in welcher sie durch die Bindegewebssepten verankert ist [3]. Das Fettgewebe lässt eine Dreischichtung erkennen, aus der obersten Schicht ragen papillenförmige Ausläufer in die *Dermis* [1]. Die Hauptfunktion des Fettgewebes der *Subkutis* ist die Isolierung des Körpers, zum einen die Wärmeisolierung, zum anderen die Druckisolierung. Anhand dieser Funktion werden auch 2 Typen von Fett unterschieden. Auf der einen Seite gibt es Baufett, welches man zum Beispiel an der Fußsohle findet und welches der Druckisolierung dient. Auf der anderen Seite gibt es Depotfett, welches am gesamten Körper zu finden ist. Es dient neben der Wärmeisolation auch der Energie- und Wasserspeicherung, sowie dem Schutz von tiefer liegenden Strukturen [4]. Die Bindegewebssepten dienen neben ihrer Stützfunktion auch als Leitgewebe für Blutgefäße, Nerven und

Lymphbahnen auf ihrem Weg aus der Tiefe hinauf in die *Dermis*. Letzten Endes finden sich in der *Subcutis* auch *Vater-Paccini-Lamellenkörper* als Teil der Sinnesorgane der Haut sowie die Haarfollikel [1].

1.2 Fibroblasten

Fibroblasten zählen neben Adipozyten zu den ortsständigen Zellen des Bindegewebes und stellen die dort am häufigsten vertretene Zellgruppe dar [3]. Sie kommen sowohl im faserreichen als auch im faserarmen Bindegewebe vor und üben als Hauptfunktion die Synthese aller Komponenten der Fasern und der Grundsubstanz des Bindegewebes aus. Die zwei Hauptfasertypen sind kollagene und elastische Fasern. Kollagene Fasern verleihen Geweben eine hohe mechanische Widerstandskraft, wie sie zum Beispiel in Sehnen notwendig ist. Allerdings weist dieser Fasertyp eine geringe Dehnbarkeit auf. Elastische Fasern hingegen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, um mehr als das Doppelte ihrer Ausgangslänge gedehnt werden zu können. Normalerweise werden durch das Suffix „-blast“ Stammzellen gekennzeichnet, bei Fibroblasten steht es hingegen für syntheseaktive Zellen. Vermindert sich ihre Syntheseleistung, so bezeichnet man sie als Fibrozyten. Der Übergang zwischen beiden Stufen ist fließend und reversibel. Fibroblasten sind teilungsfähig und zeigen eine erhöhte Mitoserate bei Bindegewebswachstum und im Rahmen der Wundheilung [5].

Morphologisch zeigen sich Fibroblasten meist als spindelförmige Zellen mit langen verzweigten Fortsätzen, welche zu einer funktionellen Verbindung untereinander beitragen. Ihre genaue Gestalt variiert häufig und hängt zum Großteil von ihren speziellen organspezifischen Aufgaben ab. Im straffen Bindegewebe zum Beispiel, wie es in der *Dermis* vorkommt, sind sie sehr stark abgeflacht, bilden allerdings sehr lange Fortsätze. Typisch für Fibroblasten ist ein länglicher, abgeflachter und heterochromatischer Zellkern. Hinzu kommt in aktiven Zellen eine Vielzahl an Zellorganellen, wie zum Beispiel raues Endoplasmatisches Retikulum in den Zellen, die viel Kollagen, Elastin oder andere Bestandteile des Extrazellularraums produzieren. In eher inaktiven Zellen hingegen findet man nur relativ wenige Zellorganellen. Ein hoch differenziertes Zytoskelett ist ebenfalls sehr charakteristisch für Fibroblasten, es ermöglicht ihnen zum Beispiel auch eine Fortbewegung mit einer Geschwindigkeit von 1µm/min. Des Weiteren ist das Zytoskelett Grundlage für eine Verbindung zu Komponenten der Extrazellulärmatrix, deren Ausrichtung durch Fibroblasten beeinflusst werden kann [1].

1.3 Hautalterung

Hautalterung ist ein äußerst komplexer Prozess, der auf Veränderungen in allen Schichten der Haut basiert, wobei die größten Veränderungen in der *Dermis* zu erkennen sind [6]. Die Alterung der Haut kommt durch zwei voneinander unabhängiger Prozesse zustande, zum einen durch die intrinsische Hautalterung, zum anderen durch die extrinsische, durch Umwelteinflüsse bedingte Hautalterung. Im besonderen ist UV-Licht als Umwelteinfluss zu nennen, weshalb die extrinsische Hautalterung auch als *photoaging* bezeichnet wird [7]. Die Veränderungen, die im Rahmen der intrinsischen Hautalterung

auftreten, sind am gesamten Körper zu beobachten, wohingegen die Effekte der extrinsischen Hautalterung beinahe ausschließlich in sonnenexponierten Arealen auftreten [6]. Die Hautalterungsprozesse in den sonnenexponierten Arealen sind als Kombinationsprozess aus intrinsischer und extrinsischer Hautalterung zu sehen. So wird im Gesicht zum Beispiel der extrinsischen Hautalterung ein Anteil von 80 % an der Gesamalterung der Haut zugeschrieben [7].

1.3.1 Intrinsische Hautalterung

Die genauen Ursachen für die Prozesse im Rahmen der intrinsischen Hautalterung sind bis heute nicht abschließend geklärt [8]. Es gibt eine Vielzahl von Theorien, die angebracht werden, um die Vorgänge zu erklären. Zum einen wird als mögliche Ursache für die intrinsische Hautalterung das Phänomen der zellulären *Seneszenz* gesehen, welches beschreibt, dass Zellen nach einer gewissen Anzahl von Teilungen ihr Proliferationspotential verlieren [9]. Ein weiterer Ansatz zur Erklärung des intrinsischen Hautalterungsprozesses bezieht sich auf die *Telomere* [10]. *Telomere* sind Nukleotidkappen an den Enden von Chromosomen, die nicht Träger von Erbinformation sind, sondern dem Schutz der kodierenden Bereiche der Chromosomen dienen. *Telomere* werden im Rahmen der Replikation nicht vollständig repliziert, wodurch bei jeder Zellteilung ein Stück von ihnen verloren geht. Dieser Verlust kann durch das Vorhandensein von *Telomerasen* ausgeglichen werden, welche den nicht replizierten Teil der *Telomere* ersetzen. Allerdings sind diese *Telomerasen* nicht in allen Zellen des menschlichen Körpers vorhanden [11]. Sie fehlen zum Beispiel auch in den Stammzellen der Haut, was dazu führt, dass es hier nach einer Vielzahl von Zellteilungen zu *DNA*-Schäden an den Chromosomenenden kommt. Aufgrund dieser Schäden wird über *p53* ein Zellzyklusarrest induziert [12]. Neben diesen genetischen Veränderungen im Zellkern scheinen auch genetische Veränderungen außerhalb des Zellkerns ein Baustein zur Erklärung von intrinsischer Hautalterung zu sein, hier steht im Mittelpunkt die *mitochondriale Desoxyribonukleinsäure (mtDNA)* [13]. Die Synthese der *mtDNA* findet im Mitochondrium in der Nähe der inneren Membran statt. In diesen Bereichen ist die *mtDNA* vielen reaktiven Sauerstoffspezies ausgesetzt. Die Tatsache, dass für *mtDNA* keine Reparaturmechanismen vorliegen, ist Grundlage dafür, dass es über die Dauer von Jahren, unter anderem durch die reaktive Sauerstoffspezies (*ROS*) zu zunehmenden Schäden der *mtDNA* kommt. Diese Schädigung trägt letztendlich auch zur Alterung der Zellen bei [14]. Nachgewiesen werden kann diese Vermutung in Fibroblasten. In Zellen von älteren Menschen kann man signifikant mehr Mutationen in der *mtDNA* nachweisen als in Zellen von jungen Menschen [15]. Bisher konnten keine konkreten Gene als Ursprung des Alterns festgestellt werden, jedoch konnte in vielen verschiedenen Studien festgestellt werden, dass es im Rahmen von Alterungsprozessen zu Veränderungen in der Regulation einer Vielzahl von Genen kommt [8]. Auch die bereits oben erwähnten *ROS* scheinen eine elementare Rolle in die Thematik der intrinsischen Hautalterung zu spielen, auch sind sie für viele Effekte verantwortlich, die im Rahmen der extrinsischen Hautalterung beobachtet werden [16]. *Endogene* Quelle für *ROS* sind Enzyme (z.B. *Xanthin Oxidase* oder *NO-Synthase*), Zellen (*Neutrophile Granulozyten*) und pathologische Prozesse

wie Ischämien, entzündliche Hauterkrankungen und Inflammation im Rahmen von Krebsgeschehen. Umweltverschmutzung, Pestizide sowie besonders UV-Strahlung sind als die bedeutendsten Quellen für exogene ROS-Entstehung anzusehen. ROS sind bei Akkumulation in den Zellen als Ursache einer Vielzahl von zellulären Schäden anzusehen. Dazu zählen z. B. die Oxidation und somit Mutation von DNA, die Oxidation von Proteinen und der daraus resultierende Funktionsverlust dieser. Zellen besitzen aufgrund dieser Menge an negativen Einflüssen, die durch ROS in den Zellen zu tragen kommen, viele verschiedene Schutzmechanismen [17]. Da ROS einen zentralen Punkt dieser Arbeit darstellen, wird auf die genauen Wirkungen von ROS und die zellulären Schutzmaßnahmen in Kapitel 1.5 noch detaillierter eingegangen.

Haut, in der es durch die oben beschriebenen Prozesse zur intrinsischen Hautalterung gekommen ist, präsentiert sich charakteristischer Weise durch einen Struktur- und Funktionsverlust. Es kommt zu einem durch Atrophie bedingtem Dünnerwerden der *Epidermis* von 10 – 50 % zwischen dem 30ten und 80ten Lebensjahr [18]. Dieser Prozess geht vorwiegend vom *Stratum spinosum* aus [19]. Im *Stratum germinativum* erkennt man eine Zunahme der *Heterogenität* der Basalzellen und eine allgemeine Volumenzunahme dieser Zellen. Funktionell mündet dies in einer Abnahme der Mitosekapazität, sowie in einer Zunahme der Zellzyklusdauer. Daraus resultiert eine Zunahme der Zeit, die es braucht die Haut zu erneuern, da die Zeit, die eine Zelle von basal nach apikal benötigt, um bis zu 50 % zunimmt [20-23]. Im *Stratum corneum* erkennt man eine Mengenabnahme der in 1.1.1 beschriebenen Lipid-haltigen Lamellenkörper, die wichtig für die Wasserbarriere der Haut sind [19]. In durch intrinsische Prozesse gealterter Haut kommt es zu einer Verringerung der Melanozytenzahl um 8-20% pro Lebensdekade ab dem 30 Lebensjahr [24]. Auch nimmt die *Heterogenität* in Morphologie und Funktionalität der Melanozyten zu, was zu einer gehäuften Entstehung von *Lentigines* sowie zu amelanotischen Arealen führt [25]. Ähnlich wie in der *Epidermis* kommt es auch in der *Dermis* zu einer Abnahme der Dicke. In dieser Hautschicht basiert dies vor allem auf einer allgemeinen Atrophie der extrazellulären Matrix, sowie auf einer Verringerung der Zellzahl, besonders der Fibroblasten. Zur Abnahme der extrazellulären Matrix kommt es zum einen durch eine Abnahme der Produktion, zum anderen auch durch einen vermehrten Abbau. Auch die Blutgefäße in der *Dermis* gealterter Haut zeigen sich deutlich dünner als in junger Haut [26].

Durch all die oben beschriebenen Prozesse erscheint die durch intrinsische Abläufe gealterte Haut bedeutend vulnerabler und anfälliger für Schäden als junge Haut. So dauert auch die Heilung von Wunden bei alter Haut um bis zu 50 % länger. Im Allgemeinen wirkt die Haut dünner, faltiger, trockener sowie unelastischer und blasser als junge Haut [27, 28].

1.3.2 Extrinsische Hautalterung

Extrinsische Hautalterung führt an exponierten Hautarealen zusätzlich zu der intrinsischen Hautalterung zu vermehrten Alterungszeichen der Haut. Da Haupteinflussfaktor der extrinsischen Hautalterung UV-Strahlung ist, wird sie wie oben bereits erwähnt auch als *photoaging* bezeichnet [29]. Weitere

Einflussfaktoren im Rahmen der extrinsischen Hautalterung sind die Exposition zu Tabakrauch und Umweltpartikeln sowie Infrarotstrahlung, Ozon und Fehlernährung [30]. Das Erscheinungsbild der extrinsisch gealterten Haut ist mannigfaltig. Sie ist rauer und faltiger. Im Allgemeinen wirkt sie blasser, kann allerdings *Teleangiectasien*, irreguläre Pigmentierung und eine Variation an benignen, prämaligen oder malignen Neoplasien aufweisen. Anders als durch die Veränderungen bei der intrinsischen Hautalterung, erkennt man beim *photoaging* keinen generellen Verlust an Extrazellulärmatrix, sondern eher eine selektive Vermehrung einiger Bestandteile der Extrazellulärmatrix. Zum Beispiel kann es zur Vermehrung von *Elastin* kommen, was ausschlaggebend ist für das oft beschriebene lederartige Erscheinungsbild von häufig sonnenexponierter Haut. Diese ungewöhnliche Vermehrung an *Elastin* wird zum einen einer direkten Schädigung der Fibroblasten durch UV-Strahlung zugeschrieben, welche zu einer abnormalen Elastinproduktion führt sowie einem durch inflammatorische Mediatoren bedingten geringeren enzymatischen Abbau der extrazellulären Matrix. Begleitet wird die Elastinvermehrung von einer Degeneration des umgebenden Kollagengewebes [7, 31-33]. Die Effekte, die das UV-Licht auf die Haut ausübt basieren darauf, dass UVB-Strahlen in der *Epidermis* absorbiert werden und dort über die Erzeugung von *Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren* DNA-Schäden induziert und dass UVA-Strahlen von zellulären *Chromophoren* absorbiert werden, wodurch *ROS* entstehen [30, 34]. Einfluss von UV-Strahlung auf die Anzahl von Mutationen in der *mtDNA* [35], auf die Stabilität von *Telomeren* [36], auf Enzyme, welche extrazelluläre Matrix abbauen [37], auf die Sekretion von *Zytokinen* durch Keratinozyten [38], die Durchblutung der Haut [39] und auf die Oxidation von Proteinen [40] konnten ebenfalls bereits dargestellt werden. In Kapitel 1.6.2 werden die Mechanismen, die hinter den hier beschriebenen Einflüssen des UV Lichtes stehen, noch näher beleuchtet.

Wie oben bereits erwähnt, wirkt auch Tabakrauch auf die Haut, indem auch dieser die Matrix abbauenden Enzyme zu induzieren scheint [41]. So sind bei Rauchern, die kumulativ über 35 Jahre jeden Tag eine Schachtel Zigaretten geraucht haben („35 pack years“), signifikant tiefere Falten nachzuweisen als bei Nichtrauchern [42]. Über die gleichen Enzyme hat auch Licht im Infrarotspektrum Einfluss auf die Zellalterung und den Abbau der extrazellulären Matrix [43]. Des Weiteren kommt es abhängig von Infrarotstrahlung auch zur Produktion von *ROS* an den Mitochondrien und zu einer Verringerung der Produktion von *Prokollagen* durch die Fibroblasten [44].

1.4 Zellalterung

1.4.1 Zelluläre Seneszenz

Bereits 1961 konnte gezeigt werden, dass Zellen in Zellkultur nicht die Fähigkeit besitzen sich unendlich oft zu teilen [45]. Basierend auf dieser Erkenntnis entstand das Konzept der sogenannten *cellular senescence* oder auch *replicative senescence*. Auf dieses Konzept möchte ich im Folgenden detaillierter eingegangen. Heute weiß man, dass die von Hayflick 1961 beobachtete beschränkte Teilungsfähigkeit von Fibroblasten auf einer Verkürzung von *Telomeren* beruht [12]. Die Bedeutung von *Telomeren* im

Zusammenhang mit Alterungsprozessen wurde bereits in Kapitel 1.3.1 erläutert. Der Mechanismus der hinter der von *Telomeren* abhängigen Seneszenzinduktion steht, ist der, dass eine sogenannte *DNA-damage -response (DDR)* getriggert wird, sobald die *Telomere* so kurz sind, dass Schäden in zu beschützenden *DNA*-Abschnitten entstehen können. Die im Rahmen dieser *DDR* von Proteinen erzeugten Signale werden von *Kinasen* verstärkt und führen dann zu einer Aktivierung von einigen Zellzyklusproteinen, wie zum Beispiel *p53* [46]. Dies führt letztendlich zu einem Arrest des Zellzyklus, in welchem die Zelle dann die Chance hat, die *DNA*- Schäden zu reparieren oder, falls dies nicht möglich ist, in Apoptose zu gehen [47]. Neben *p53* als einem zentralen Vermittler der *replicative senescence* kann auch dem *Retinoblastom (RB) Tumor Suppressor* und den zugehörigen Signalpatnern wie *p16^{INK4A}* eine wichtige Rolle in diesem Zyklus bescheinigt werden [48]. Man weiß mittlerweile allerdings auch, dass es weitere altersabhängige Einflüsse gibt, die unabhängig von den *Telomeren* die *Seneszenz* über ähnliche Kaskaden induzieren können, zum einen sind dort die telomerunabhängigen *DNA*-Schäden zu erwähnen, zum anderen allerdings auch die Tatsache, dass in alternden Zellen allgemein eine Hochregulation von Proteinen wie *p16^{INK4A}* festgestellt werden konnte [49].

1.4.2 *Premature cellular Senescence*

Neben der altersabhängigen *Seneszenz* kann auch ein anderer Seneszenztyp beobachtet werden, die sogenannte *premature cellulare senescence*. Diese ist gekennzeichnet dadurch, dass sie früher auftritt als die altersabhängige Form [50]. Die Ursachen die diese Art von *Seneszenz* induzieren sind vielfältig, eine interessante erforschte Ursache ist die *stress induced senescence*. Hierunter versteht man die Seneszenzform, die *in vitro*, bedingt durch inadäquate Zellkulturbedingungen beobachtet werden kann. Wenn Zellen in Kultur genommen werden, müssen sie sich an veränderte Versorgung mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren, andersartiger Sauerstoffversorgung sowie dem Fehlen von umgebenden Zellen und fehlender extrazellulärer Matrix anpassen. Bereits einer dieser Faktoren oder die Kombination mehrerer kann Auslöser einer stressinduzierten *Seneszenz* sein. Diese Form ist absolut unabhängig von der Länge der *Telomere* [51].

1.4.3 *Charakteristika seneszenten Zellen*

Unabhängig von den vielen Möglichkeiten zur Seneszenzinduktion weisen Zellen, welche sich in *Seneszenz* befinden einige Charakteristika auf, anhand derer sie sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* identifizieren lassen. Ein Faktum, das alle Zellen die sich in *Seneszenz* befinden aufweisen und welches auch unabdingbar ist für *seneszente* Zellen, ist, dass sie sich alle in einem langfristigen Zellzyklusarrest befinden. Diesen Zellzyklusarrest findet man allerdings nicht nur bei *seneszenten* Zellen, sondern auch bei Zellen, welche man als entdifferenziert bezeichnet. Diese beiden Typen von Zellen unterschieden sich allerdings darin, dass der Zellzyklusarrest bei den entdifferenzierten Zellen auf einem Fehlen von physiologischen Signalen zur weiteren Teilung etc. basiert, wohingegen der Zellzyklusarrest bei den sich in *Seneszenz* befindenden Zellen auf einer Einbeziehung von Tumorsuppressor-Signalwegen basiert

[50]. Der Zellzyklusarrest von Zellen in *Seneszenz* scheint nicht immer irreversibel zu sein, eine Reversibilität ist unter gewissen Umständen gegeben. Diese Umstände können zum Beispiel durch eine Inaktivierung des *p53* Signalwegs [52] oder über Einfluss gewisser *Interleukine* dargestellt werden [53]. Dieses Wiedereintreten von *seneszenten* Zellen in den Zellzyklus sollte auch im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren als mögliche Ursache betrachtet werden [50].

Auch wenn man die Morphologie der Zellen betrachtet, weisen Zellen, welche sich in *Seneszenz* befinden einige Charakteristika auf. Allerdings variieren diese abhängig von der Ursache, die die Zellen zur *Seneszenz* veranlasst haben. So sind zum Beispiel Zellen, welche sich in *stress induced senescence* befinden [54], als auch Zellen in welchen aufgrund von *DNA*-Schäden die *Seneszenz* induziert wurde [55] dadurch auffällig, dass sie besonders flach und groß erscheinen und eine Vielzahl an *Nukleolen* aufweisen. Zellen, die über andere Wege *seneszent* geworden sind, können auf der anderen Seite allerdings auch eher etwas refraktär erscheinen [50].

Wie oben bereits erwähnt, kommt es im Rahmen der *Seneszenz*induktion zur Aktivierung von Kaskaden von Tumorsuppressor-Systemen. Einzelne Komponenten dieser Kaskaden können somit auch als typisch für *senescente* Zellen betrachtet werden und als Biomarker zur *Seneszenz*bestimmung eingesetzt werden. So wird beispielsweise häufig die Akkumulation von *p53* und von *p16^{INK4A}* als Marker herangezogen [56].

Einer der am häufigsten genutzten Marker für *Seneszenz* ist die *Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase*. Auch in dieser Arbeit wurde die *Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase* als Marker verwendet. Die Menge dieses Enzyms nimmt in *seneszenten* Zellen zu. Auch in nicht *seneszenten* Zellen kommt die *β -Galaktosidase* vor, in diesen Zellen befindet sie sich in den *Lysosomen* und hat ein pH-Optimum von 4. Die Aktivität der *Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase* lässt sich allerdings auch bei einem pH von 6 nachweisen. Der Anstieg der Menge des Enzyms basiert vermutlich auf einer starken Vergrößerung der *Lysosomen* in den *seneszenten* Zellen. Bisher konnte die genaue Rolle der *Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase* im Rahmen von *Seneszenz*-Prozessen allerdings noch nicht nachgewiesen werden [57-59].

Zellen, welche in *Seneszenz* gehen, weisen ebenfalls auch eine Veränderung ihrer Sekretionsmuster auf, es werden sehr viele Stoffe sezerniert, wie zum Beispiel auch *Zytokine* und *Chemokine* [60]. Diese Veränderungen werden als *senescence-associated secretory phenotype (SASP)* bezeichnet [61]. Elementare Ursache für diesen besonderen Phänotyp sind Schäden der *DNA*. Da es aber auch wie oben bereits erwähnt *Seneszenztypen* gibt, welche unabhängig von *DNA*-Schäden sind, sind *SASP* nicht als *per se* vorhanden zu interpretieren [62]. Die *SASP* werden mit einer Vielzahl von zellulären Effekten in Zusammenhang gebracht, ihnen wird ein *pro-onkogener* Einfluss über die Förderung von Proliferation, Invasion und Migration von prämaligen Zellen zugeschrieben [63]. *SASPs* sind darüber hinaus auch wichtig für die Aufrechterhaltung des *seneszenztypischen* Zellzyklusarrests [53]. Letztendlich scheint paradoxerweise unter gewissen Bedingungen auch eine Möglichkeit der Limitierung des Wachstums von frühmaligen Zellen durch *SASP* zu bestehen [64].

Ein positiver Zusammenhang zwischen *Seneszenz* und *Autophagie* ist ebenfalls erkennbar. In *seneszenten* Zellen kommt es zu einer Hochregulation von *Autophagie-assoziierten* Genen und somit auch zu einer Hochregulation der *Autophagie* selbst. Inhibition von *Autophagie* führt zu einer Verzögerung der *Seneszenzinduktion* und zu einem geringer ausgeprägten *SASP*. [65]

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es eine Vielzahl an Charakteristika gibt, welche seneszente Zellen aufweisen und welche somit als Seneszenzmarker in der Forschung genutzt werden können. Die Ausprägung dieser Charakteristika ist allerdings abhängig von den Faktoren, die zum Seneszenzstatus der jeweiligen Zelle geführt haben. Somit kann auch ein alleiniges Charakteristikum nicht unbedingt als indiskutables Kennzeichen für Seneszenz genutzt werden können, wobei ihre Kombination durchaus sicher ist.

1.5 Reaktive Sauerstoffspezies

1.5.1 Definition

Unter *ROS* versteht man Sauerstoffverbindungen, welche im Körper zu Schäden führen können und hier besonders im Rahmen von oxidativen Stress eine wichtige Rolle spielen. Sie werden mit einer Vielzahl verschiedenster Krankheiten sowie dem Altern als wichtigem Einflussfaktor in Zusammenhang gebracht. Unter *ROS* sind Radikale, stabile molekulare Oxidantien sowie angeregte Sauerstoffmoleküle zusammengefasst. In Tabelle 1 sind die verschiedenen *ROS* aufgelistet [66]. Sie können sowohl *endogen* im Rahmen normaler Zellstoffwechselprozesse im Körper gebildet werden, als auch angeregt durch *exogene* Reize entstehen. Wie genau *ROS* entstehen, welche Wirkungen sie im Körper haben und was der Körper dem entgegenzusetzen hat, werde ich nun im Folgenden näher erläutern.

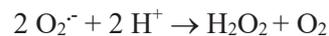
| Chemische Formel | Bezeichnung | Anmerkung |
|------------------|----------------------|------------------------------|
| O_2^- | Hyperoxid-Anion | Freies Radikal |
| $HO\cdot$ | Hydroxyl-Radikal | Freies Radikal |
| $HOO\cdot$ | Hydroperoxyl-Radikal | Freies Radikal |
| $ROO\cdot$ | Peroxyradikal | Freies Radikal |
| $RO\cdot$ | Alkoxyradikal | Freies Radikal |
| H_2O_2 | Wasserstoffperoxid | Stabiles molekulares Oxidanz |
| $ROOH$ | Hydroperoxid | Stabiles molekulares Oxidanz |
| O_3 | Ozon | Stabiles molekulares Oxidanz |
| OCl^- | Hypochlorit-Anion | Stabiles molekulares Oxidanz |
| 1O_2 | Singulett Sauerstoff | Angeregtes Sauerstoffmolekül |

Tabelle 1. Auflistung der *ROS*

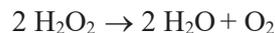
1.5.2 Entstehung von ROS

1.5.2.1 Endogene ROS-Entstehung

Im Körper können ROS auf vielfältige Weise entstehen, meist als Nebenprodukt in biologischen Reaktionen in Mitochondrien, Peroxisomen, Cytochrom P-450 oder anderen zellulären Bestandteilen [67]. Von großer Bedeutung sind die Mitochondrien [68]. Die Erzeugung von ROS geschieht in einer Reaktionskaskade, an deren Anfang die Bildung von Superoxidradikalen steht. Superoxidradikale werden immer dann gebildet, wenn ein Sauerstoffmolekül ein einzelnes Elektron aufnimmt [69]. In den Mitochondrien geschieht dieser Vorgang im Rahmen der Atmungskette vermutlich lokalisiert am Komplex III, wo von Ubisemichinon direkt auf ein Sauerstoffmolekül das benötigte Elektron übertragen wird [70]. Superoxidradikale sind äußerst reaktionsfreudig und können daher Zellen schon vehement schädigen [69]. In weiteren Reaktionsschritten werden aus den Superoxidradikalen auch Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale gebildet. Die Bildung von Wasserstoffperoxid aus Superoxidradikalen wird durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert [68]. Nach folgender Reaktionsgleichung reagieren 2 Superoxidradikale mit 2 Wasserstoff-Ionen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff [69]:



Es gibt mehrere Isoenzyme der SOD, zum einen die mitochondriale Form, welche Mangan enthält und auch als SOD 2 bezeichnet wird, zum anderen die zytosolische Form, welche Kupfer und Zink enthält und auch als SOD 1 bezeichnet wird [71]. Das in der Reaktion entstandene Wasserstoffperoxid ist ein aggressives Oxidationsmittel. Es wird nach folgender Reaktionsgleichung durch das Enzym Katalase in Wasser und molekularem Sauerstoff gespalten wird [69]:

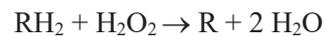


Der Abbau des Wasserstoffperoxids erfolgt nicht alleine über die Katalase, sondern wird zu einem kleinen Teil auch von der Glutathion-Peroxidase übernommen. Dieses Enzym muss anschließend mit Hilfe von Glutathion, einem Tripeptid aus γ -Glu-Cys-Gly (GSH) regeneriert werden, welches in einem weiteren Schritt selber über NADH/NADPH regeneriert wird, so dass die für diesen Abbauweg nötigen Elektronen letztendlich von NADH stammen [69].

Ist der Abbau des Wasserstoffperoxides nicht effizient genug, um zeitnah das entstandene Wasserstoffperoxid zu eliminieren, so verteilt sich dieses schnell in der Zelle und den Kompartimenten. Trifft es dabei auf zweiwertige Eisenionen (Fe^{2+} -Ionen), können im Rahmen der sogenannten Fenton-Reaktion nach folgender Reaktionsgleichung Hydroxylradikale entstehen. Auch durch Hydroxylradikale kann eine schädigende Wirkung auf Zellen ausgehen [72]:



Wie oben bereits erwähnt, werden *ROS* im Körper nicht nur in Mitochondrien, sondern auch in anderen Zellorganellen gebildet. *Peroxisomen* sind reich an Wasserstoffperoxid. In diesen Zellorganellen gibt es viele *Oxidasen*, welche Wasserstoffperoxid in großen Mengen produzieren. Die *Oxidasen* sind in den *Peroxisomen* unter anderem am Abbau von Fettsäuren im Rahmen der β -*Oxidation* beteiligt. Die in diesem Vorgang anfallenden Elektronen können nicht wie in den Mitochondrien in die Atmungskette eingespeist werden, sondern werden direkt auf molekularen Sauerstoff übertragen. Wegen der hohen Produktionsrate an Wasserstoffperoxid in *Peroxisomen* ist auch die Menge an *Katalase* in diesem Kompartiment sehr stark erhöht, um das entstehende Wasserstoffperoxid umzuwandeln. Die *Katalase* kann bis zu 40% des Gesamtproteins der *Peroxisomen* ausmachen. Neben der *Katalase* dienen in den *Peroxisomen* auch die *Peroxidasen* dem Abbau von Wasserstoffperoxid. In *Peroxidasen* wird Wasserstoffperoxid zur Oxidation verschiedenster organischer Verbindungen genutzt. Ein Beispiel dafür ist der Abbau von Ethanol. Die von *Peroxisomen* katalysierte Reaktion ist in der folgenden Gleichung zu sehen [69, 73]:



Im *phagozytierenden* System um *neutrophile* Granulozyten und Makrophagen werden *ROS* gezielt gebildet. *ROS* haben hier den Zweck, *phagozytierte* pathogene Mikroorganismen abzutöten. Die zentralen Enzyme in der Produktion der *ROS* in den *phagozytierenden* Zellen sind die *NADPH-Oxidasen* (*NOX*). *NOX* sind lokalisiert in der Plasmamembran und der Phagosomenmembran. Durch *NOX* wird die Übertragung der Elektronen von *NADPH* auf extrazellulären Sauerstoff katalysiert. Bei dieser Reaktion werden zuerst *Superoxidradikale* gebildet, welche durch *Disproportionierung* zu H_2O_2 werden, welches dann die aufgenommenen Keime abtötet. Das in diesen Zellen produzierte H_2O_2 ist membrangängig und kann so auch in andere körpereigene Zellen gelangen, wo es ebenfalls schädliche Wirkung haben kann, wenn keine ausreichenden Schutzmechanismen vorliegen. [69, 74]

1.5.2.2 Exogene Faktoren der endogenen ROS-Produktion

Neben den oben genannten Ursachen für die *endogene* Entstehung für *ROS* gibt es auch einige *exogene* Faktoren, welche Einfluss auf die Entstehung von *ROS* im Körper nehmen können. Diese *exogenen* Einflussfaktoren sind meist chemische, biologische oder physikalische Reize, welche die Zellen in Stress versetzen. Es kommt zu einer Produktion von *ROS*, welche das normale Niveau übersteigt und so zu einer Disbalance zwischen *ROS*-Produktion und *ROS*-Abbau führt. Das Überangebot an *ROS* mündet letztendlich in oxidativen Stress [75]. So sind zum Beispiel UV-Strahlung wie auch sichtbares Licht dafür bekannt, als *exogener* Faktor die Bildung von *ROS* induzieren zu können [76, 77]. Eine wichtige Rolle bei dieser Induktion spielen *endogene* Pigmente wie *Porphyrin*, *Billirubin* oder *Melanin*

[77]. Diese Pigmente dienen als *Photosensibilisatoren*, welche die UV-Strahlung sowie das sichtbare Licht absorbieren und dadurch in einen angeregten Zustand übergehen [78]. Angeregte *Photosensibilisatoren* können in verschiedenen Reaktionen ein Elektron auf Sauerstoff übertragen, wodurch es zur Bildung verschiedener *ROS* kommen kann [75]. Bei der lichtinduzierten *ROS*-Bildung entstehen meist O_2^- , $HO\cdot$ und *Singulett-Sauerstoff* [79]. Auch chemische Substanzen können zu einer *exogen* getriggerten Produktion von *ROS* führen, welche unabhängig von Zellkomponenten ist. Hierzu zu nennen ist das *Xanthin / Xanthin-Oxidase System*, in welchem O_2^- produziert wird [80], die oben bereits erwähnte *Fenton-Reaktion*, in der *Hydroxylradikale* und Übergangsmetallionen entstehen [72], sowie *exogene Photosensibilisatoren* wie *Rose Bengal* oder *Benzoporphyrin-Derivate*, welche *Singulett-Sauerstoff* produzieren können [81].

1.5.3 Wirkung im Körper

Die dauerhafte *exogene* und *endogene* Entstehung von *ROS* führt zu kontinuierlichen und akkumulierten oxidativen Schäden an zellulären Komponenten [82] und beeinflusst viele zelluläre Funktionen [83]. Die drei anfälligsten Strukturen für oxidativen Schaden durch *ROS* sind Proteine, Lipide und *DNA* [84]. Die Schäden, die durch die verschiedenen hochreaktiven *ROS*-Typen verursacht werden, findet man meistens an den Orten, wo sie produziert werden. So führen beispielhaft *Hydroxylradikale*, welche in Mitochondrien produziert werden, zu Schäden in diesen Kompartimenten. Der Grund dafür ist ihre große Reaktionsfreudigkeit, die dazu führt, dass sie direkt mit Substraten in der Umgebung ihrer Entstehung reagieren und sich nicht erst in der Zelle verteilen. Auf der anderen Seite gibt es allerdings auch Typen von *ROS*, welche nicht so extrem reaktionsfreudig sind, so zum Beispiel Wasserstoffperoxid. Dieses kann sich daher sehr gut in den Zellen verteilen und verursacht so in verschiedensten zellulären Komponenten Schäden [85].

Das Ausmaß an Schäden, welche durch oxidativen Stress an zellulären Membranen ausgelöst wird ist abhängig davon, wie groß der Anteil an ungesättigten Fettsäuren in diesen ist. Die Schädigung von Lipiden wird als *Lipid-Peroxidation* bezeichnet. Bei der *Lipid-Peroxidation* wird von einem *ROS* ein Elektron auf eine mehrfach ungesättigte Fettsäure übertragen, welche dieses im Bereich der Doppelbindung einbaut. Es entsteht ein äußerst instabiles Reaktionsprodukt und es kommt zu einer Fragmentierung der Fettsäure. Die Fettsäure fungiert nun ihrerseits selber als Radikal und es kommt zu einer Kettenreaktion mit weiteren mehrfach ungesättigten Fettsäuren in der Membran. Letzten Endes kann dies in erheblichen Funktionsstörungen der Membran münden. Einfach ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren können zwar auch durch eine Reaktion mit *ROS* umgebaut werden, allerdings können von ihnen nicht solche Kettenreaktionen ausgehen. Die Kettenreaktionen finden dann ein Ende, wenn entweder zwei Radikale miteinander reagieren oder ein Radikal mit einem Antioxidans [84, 86].

Proteine können direkten sowie indirekten Schaden durch die Interaktion mit *ROS* nehmen. Resultate dieser Schäden können *Peroxidation*, Veränderung von Aminosäurenresten, Änderungen in der Tertiärstruktur des Proteins sowie *Denaturierung* oder Fragmentierung des Proteins sein. Diese

strukturellen Veränderungen in Proteinen führen zu einer Veränderung ihrer enzymatischen Aktivität. Meist ist eine Abnahme der Enzymaktivität erkennbar. Diese Änderung resultiert dann schließlich in Veränderungen des gesamten zellulären Stoffwechsels. Das Produkt der Oxidationsprozesse von Proteinen sind meist *Aldehyde*, *Keto-Komponenten* oder *Carbonyl-Gruppen* [84, 87-90].

Auch die *DNA* kann auf vielfältige Weise durch *ROS* beschädigt werden. Typische Schäden durch *ROS* an der *DNA* sind Modifikationen von Basen, das Erzeugen von Einzel- sowie Doppelstrangbrüchen, der Verlust von *Purinen*, die Schädigung des *DNA*-Zuckers *Ribose*, das Einfügen von *Crosslinks* sowie auch die Schädigung von *DNA*-Reparatursystemen. Der *ROS* Typ, welcher am schädlichsten für die *DNA* ist, ist das *Hydroxylradikal*. Typische Schäden durch diese *Hydroxylradikale* sind die *Hydroxylierung* von *Guanin* oder *Adenin* Basen [91-93].

Basierend auf all diesen Wirkungen, die *ROS* auf zellulärer Ebene haben, wird ihnen eine Assoziation zu einer Vielzahl von Erkrankungen nachgesagt. Bereits 1956 wurden die ersten Vermutungen zu den Einflüssen von *ROS* auf Alterungsprozesse sowie auf die Entstehung von Krebs geäußert [16]. Heute gibt es Vermutungen für die Einflüsse von *ROS*, zusätzlich zu Alterung und Krebsentstehung, auf Nierenversagen, Diabetes, Herzerkrankungen und Ischämie, Chronische Bronchitis, Atherosklerose, Arthritis, Multiples Organversagen sowie Neurologische Erkrankungen wie Schlaganfall, Parkinson und Alzheimer. Oft sind diese Zusammenhänge allerdings noch nur Vermutungen und es ist noch nicht eindeutig gesichert, ob die *ROS* teilweise Folge, Ursache oder gegebenenfalls beides der Erkrankung sind [94].

1.5.4 Abwehrmechanismen des Körpers

Um die in Kapitel 1.5.3 geschilderten Einflüsse von *ROS* auf den Körper zu verhindern beziehungsweise so gering wie möglich zu halten, stehen den Zellen eine Vielzahl von Abwehrmechanismen zur Verfügung. Die Abwehr von *ROS* durch den Körper findet auf mehreren Ebenen statt, zum einem gibt es Mechanismen, die der Prävention dienen und so schon bereits die Entstehung von *ROS* verhindern sollen. Weitere Mechanismen dienen der physikalischen Verteidigung, sodass, falls die *ROS*-Entstehung nicht verhindert werden kann, die Zielstrukturen gegen die Effekte geschützt sind. Hinzu kommen antioxidative Systeme, deren Funktion es ist, entstandene *ROS* unschädlich zu machen. Auf der dritten Ebene der Abwehr findet man Reparatursysteme, mittels welcher die Schäden durch *ROS* an zellulären Komponenten möglichst ohne Folgen beseitigt werden sollen [85].

Die Entstehung von *ROS* wird im Körper zum Beispiel so verhindert, dass Prozesse, bei denen indirekt *ROS* anfallen, anders reguliert werden oder die *ROS* direkt über Metalle *chelatiert* werden [85, 95].

Ein Beispiel für die Reparatursysteme sind die *DNA*-Reparatursysteme, welche in der Lage sind oxidierte *DNA-Addukte* zu erkennen, sie zu entfernen und sie durch unbeschädigte Basen zu ersetzen [96]. Eine andere Möglichkeit der Reparatur von Schäden durch *ROS* sind Moleküle, die *Hydrogen-Moleküle* an Moleküle abgeben können, welche in der Reaktion mit *ROS* *Hydrogen-Moleküle* verloren haben. Ein Beispiel dafür sind *Ascorbat* oder *Tocopherol*, welche *Hydrogen-Moleküle* an Fettsäuren

abgeben, die wie oben bereits beschrieben im Rahmen der *Lipid-Peroxidation* zu Radikalen geworden sind. *Tocopherol* dient auch der physikalischen Verteidigung indem es Membranen stabilisiert, wenn es in diese eingebaut wird und durch Interferenz verhindert, dass die *ROS* an den Lipiden angreifen können. [85]

Der wichtigste Abwehrmechanismus allerdings wird durch die Antioxidantien dargestellt, da über dieses System direkt pro-Oxidantien beseitigt werden können und der maximale biologische Schutz gewährleistet werden kann. Das System setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Zum einen gibt es antioxidative Enzyme und zum anderen die als niedermolekulare Antioxidantien bezeichneten Radikalfänger [85]. Die Gruppe der Enzyme umfasst Proteine, welche in der Lage sind direkt *ROS* abzubauen und unschädlich zu machen. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind *Superoxiddismutasen* [97], *Peroxidasen* [98] und *Katalase* [99], deren Funktion und Reaktionen wurden bereits in Kapitel 1.5.2.1 erläutert [84]. Sie arbeiten in einer Reaktionskette und bauen so Schritt für Schritt die *ROS* über weniger reaktive Zwischenprodukte zu Wasser und Sauerstoff ab. Es gibt weitere Enzyme, welche selber nicht direkt *ROS* abbauen, allerdings die antioxidativ tätigen Enzyme unterstützen. Ein Beispiel dafür sind die *Glukose-6-Phosphat Dehydrogenasen*, welche *NAPDH* reduzieren, welches wiederum elementar für die Regeneration des *Glutathions* aus der Reaktion der *Peroxidasen* oder auch für andere die Regeneration anderer Antioxidantien ist [98]. Manche der unterstützenden Enzyme können auch der Bereitstellung von Antioxidantien dienen, das bedeutendste Beispiel dafür ist die *Xanthin-Dehydrogenase* aus dem *Purinbasen* Abbau. In der von der *Xanthin-Dehydrogenase* katalysierten Reaktion wird Harnsäure produziert. Harnsäure gilt als ein sehr potentes Antioxidans [100]. Die Gruppe der niedermolekularen Antioxidanten umfasst eine große Gruppe an Substanzen, die durch direkte oder indirekte Interaktion mit *ROS* den oxidativen Schaden verhindern [95]. Die indirekte Interaktion ist durch die *Chelation* von Übergangsmetallen gekennzeichnet. Dieser Vorgang ist wichtig, um zu verhindern, dass die Übergangsmetalle an der Haber-Weiss-Reaktion teilhaben können, welche durch sie katalysiert wird. Die Verhinderung dieser Reaktion ist wichtig, da in ihr *Hydroxyl-Radikale* produziert werden. [101, 102] Die direkt wirkenden niedermolekularen Antioxidantien sind dadurch charakterisiert, dass sie die Fähigkeit besitzen Elektronen auf *ROS* zu übertragen, so dass diese ihre Reaktionsfreudigkeit verlieren. Durch diese Übertragung werden die Radikalfänger selber zu Radikalen, weisen allerdings nicht die Reaktionsfreudigkeit von *ROS* auf. Die Radikalform der Radikalfänger kann enzymatisch oder chemisch wieder zur ursprünglichen Form regeneriert werden. Bei dieser Regeneration wirken die verschiedenen Radikalfänger synergistisch [85]. Radikalfänger können zum Teil *endogen* produziert werden, müssen allerdings auch teilweise *exogen* über die Nahrung zugeführt werden. Die Radikalfänger, welche endogen produziert werden können sind *Histidin-Dipeptide* [103], *Glutathion* [84], Harnsäure [17], *Liponsäure* [104] und *Bilirubin* [105]. Bekannte Radikalfänger, die exogen zugeführt werden müssen, sind die Vitamine A (*Betacarotin*), C (*Ascorbinsäure*) und E (*Tocopherol*) [85].

Zellen stehen mit all diesen Mechanismen eine Vielzahl an Abwehrmöglichkeiten zur Verfügung, die alle synergistisch miteinander agieren, um so den geringstmöglichen Schaden durch ROS zuzulassen. Die Vielzahl an verschiedenen Abwehrmechanismen macht allerdings auch die große Relevanz der ROS für zelluläre Prozesse deutlich.

1.6 Licht

1.6.1 Definition und Spektren

Licht ist definiert als der für das menschliche Auge sichtbare Teil der elektromagnetischen Strahlung, welcher sich im Wellenlängenbereich von 400 – 760 nm erstreckt. Die nicht wahrnehmbaren elektromagnetischen Strahlungen werden je nach Wellenlänge als Radiowellen, Mikrowellen, Infrarotstrahlung, UV-Strahlung, Röntgenstrahlung oder Gammastrahlung bezeichnet. In Abb. 2 sind diese verschiedenen Strahlentypen noch einmal nach ihrer jeweiligen Wellenlänge aufgeschlüsselt. Es ist zu erwähnen, dass die Energie der Strahlung umso höher ist, desto geringer die Wellenlänge ist. [106]

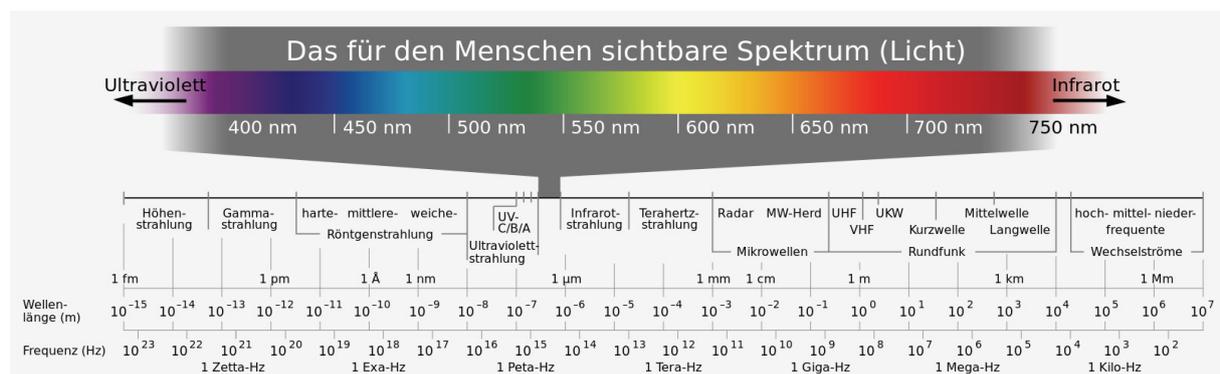


Abb. 2. Übersicht elektromagnetisches Spektrum

Quelle: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electromagnetic_spectrum.svg

Nicht alle Strahlentypen treffen in gleicher Menge auf die Erde. Das elektromagnetische Spektrum, welches auf die Erde trifft, gliedert sich auf in 3 – 7 % UV-Strahlung (290 – 400 nm), 44 % sichtbares Licht (400 – 700 nm) und 53 % Infrarotstrahlung (700 – 1440 nm). Strahlung aus dem UV-Bereich kann anhand der „*International Commission on Illumination*“ noch weiter untergliedert werden. Zum einem in die langwellige UVA-Strahlung (315 – 400 nm), welche am nächsten im Bereich des sichtbaren Lichtes liegt, sowie in die UVB-Strahlung (280 – 315 nm) und die kurzwellige UVC-Strahlung (100 – 280 nm). Auch die UV-Strahlung erreicht nicht in ihrem kompletten Umfang die Erdoberfläche, da die Ozonschicht der Erde in der Lage ist, Strahlung mit einer Wellenlänge von weniger als 310 nm zu absorbieren. Basierend auf dieser Tatsache kommen an der Erdoberfläche nur gut 5 % der UVB-Strahlung und nahezu keine UVC-Strahlung an, wohingegen die UVA-Strahlung im vollen Umfang auf die Erde trifft. [107]

Der Einfluss von Licht und elektromagnetischer Strahlung auf die Haut ist mannigfaltig. Er ist abhängig von einigen Faktoren. Eine sehr zentrale Rolle nimmt die jeweilige Wellenlänge ein, aber auch die Dosis

und die genaue Struktur des Gewebes sind von Bedeutung, ebenso wie die Konzentration und Verteilung von *Chromophoren* in der Haut. Die Strahlungen verschiedener Wellenlänge dringen verschieden tief in die Haut ein, wie in Abb. 3 zu sehen ist.

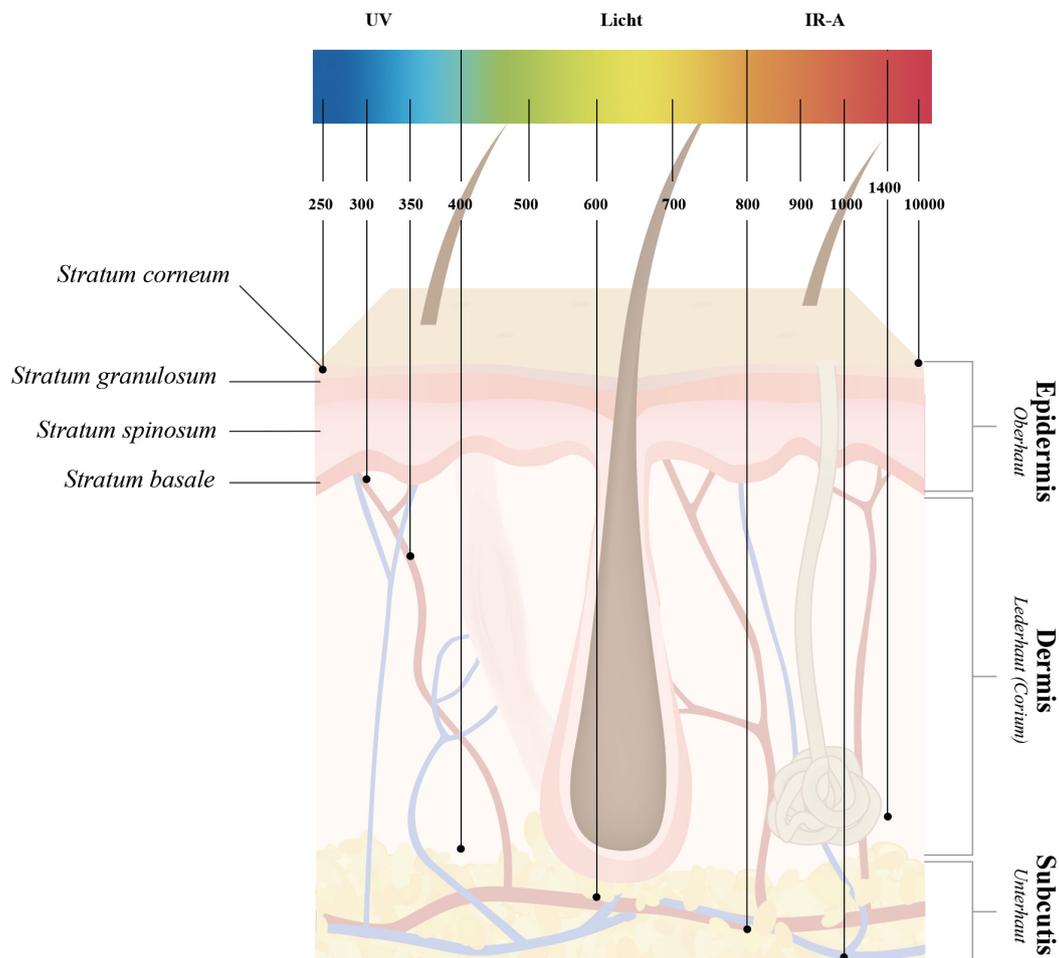


Abb. 3. **Schema Eindringtiefe von Strahlen**

Schematische Darstellung der Eindringtiefe von verschiedenen Strahlungstypen in die menschliche Haut. Modifiziert nach <https://katawan.de/koerper/haut/hauschichten/>

1.6.2 UV-Licht

Unter UV-Licht versteht man, wie in Kapitel 1.6.1 bereits erwähnt, Licht der Wellenlänge 100 – 400 nm, welches weiter untergliedert wird in UVA, UVB und UVC. Biologisch relevant aufgrund des Ozon Filters sind allerdings lediglich nur UVB- und UVA-Strahlung.

Die Wirkung von UV-Licht auf die Haut und den Organismus ist sehr vielseitig. Ein zentraler Punkt wurde bereits in Kapitel 1.3.2 erwähnt, nämlich dass UV-Licht eine sehr zentrale Rolle in Hautalterungsprozessen spielt und ihm gut 80 % Anteil an der Alterung im Gesicht zugeschrieben wird. Manche der Wirkungen von UV-Licht sind allein auf UVA-Strahlen, manche allein auf UVB-Strahlen, einige jedoch auch auf deren Zusammenwirkung zurückzuführen.

Die Effekte von UVA-Strahlung basieren im Zentralen darauf, dass die Strahlen von zellulären *Chromophoren* wie Melanin und seinen Vorläufern oder *Riboflavin* absorbiert werden. Im Rahmen dieser Absorption werden *ROS* generiert, welche, wie bereits in Kapitel 1.5.3 erwähnt, eine Vielzahl negativer Effekte auf den menschlichen Körper haben [34]. Für die Entstehung dieser Effekte ist auch die in Abb. 3 gezeigte relativ große Eindringtiefe von UVA-Strahlung in die Haut sehr wichtig. Die Eindringtiefe von UVB-Strahlung ist deutlich geringer, die Absorption findet größtenteils in der Epidermis statt. Hier schädigt die UVB-Strahlung die DNA durch die Bildung von *Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren* [108].

Über die durch *Chromophoren* erzeugten *ROS*, aber auch über direkte Einflüsse scheint UVA-Strahlung die *mtDNA* zu beeinflussen. In lichtgealterter Haut konnten mehr *mtDNA* Schäden festgestellt werden als in lichtgeschützter Haut [35]. Die häufigste Mutation in der *mtDNA* ist eine *4977 base-pair Deletion*, welche auch als „*common deletion*“ bezeichnet wird. Die *common deletion* gilt als Marker für weitere Mutationen in der *mtDNA*. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen dem Auftreten der *common deletion* und der Bestrahlung mit UVA. Haut, welche mit UVA bestrahlt wird, weist bis zu 40% mehr dieser Mutation auf. Die Anzahl an Mutationen steigt auch nach Beendigung der Bestrahlung noch weiter an, so dass 16 Monate nach Bestrahlungsende teilweise die 32-fache Menge an Mutationen messbar sind [109]. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch Schäden in der *mtDNA* die schädliche *ROS* Produktion weiter gesteigert wird, was in einer Art Kreislauf wiederum zu weiteren Schäden führt [110]. Ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen *mtDNA* Schäden und dem unten beschriebenen Anstieg an *Matrix-Metalloproteasen (MMP)* wird gesehen [111].

Die erkennbaren Effekte von UV-Licht auf *Telomere*, welche für Alterungsprozesse von zentraler Bedeutung sind, sind sowohl UVA- als auch UVB-Strahlung zuzuschreiben. Besonders bedeutend ist die *t-loop* Struktur der *Telomere*, Schäden in dieser Struktur führen zu *DNA*-Schäden, *Apoptose* oder *Seneszenz* [112]. *T-loop* Strukturen sind gekennzeichnet durch repetitive *TTAGGG-Sequenzen*, welche sich gut als Ziele für UV induzierte Schäden eignen. Die TT-Basen sind perfekter Angriffspunkt für UVB-Strahlung zur Formung von *Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren*. Auf die *Guanin-Basen* der *t-loops* hingegen nimmt UVA-Strahlung über die erhöhten *ROS* Spiegel Einfluss, da erhöhte Spiegel zu einer Oxidation der *Guanin-Basen* führt. Beides zusammen führt letztendlich zu einer Destabilisierung der *t-loops* und zur Induktion der oben genannten Folgeprozesse [36, 113].

Auch auf die Expression von Proteinen wird durch UV-Strahlung Einfluss genommen. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind *MMPs*, welche Enzyme sind, die Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagen abbauen [37]. Der Einfluss auf diese Proteinklasse ist wohl auch UVA- und UVB-Strahlung zuzuschreiben [114], wobei die UVB-Strahlung den größeren Anteil hat. Dies liegt daran, dass die Quelle der *MMP's* hauptsächlich Keratinozyten in der Epidermis sind, dem Hauptwirkort von UVB-Strahlung [115]. Über den durch UV-Strahlung erzeugten oxidativen Stress kommt es zur Aktivierung von Rezeptoren der Zelloberfläche, wodurch Signalwege über die *mitogen-activated protein-kinasen (MAP-Kinasen)*, *c-Jun-N-terminale-Kinasen (JNK)* und *extracellular-signal regulated Kinasen (ERK)*

aktiviert werden, was letztendlich in der Induktion des Transkriptionsfaktors *activator Protein 1 (AP-1)* resultiert. *AP 1* ist verantwortlich für die Induktion der Produktion von *MMP 1*, *MMP 3* und *MMP 9* [37]. Über *AP 1* ist auch der beobachtete Effekt zu erklären, dass nicht nur der Abbau von extrazellulärer Matrix gesteigert, sondern auch die Neuproduktion verringert ist. Hohe Level an *AP 1* dämpfen die Kollagenbildung-induzierenden Effekte von *transforming growth factor β (TGF- β)* [116]. Ein weiterer Transkriptionsfaktor von zentraler Rolle in diesem Prozess ist *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- κ B)*, welcher ebenfalls die Produktion von *MMPs* stimuliert und die Wirkung über die oben genannten Zelloberflächenrezeptoren steigert [30]. Auch auf die von Fibroblasten sezernierte *Elastase* nimmt UV-Strahlung Einfluss. *Elastase* ist ein Enzym, welches die elastischen Fasern der Haut abbaut, was unter anderem als ursächlich für die Induktion von Falten gesehen wird. Unter Bestrahlung mit UVB-Licht führt die Hochregulation der Zytokinproduktion der Keratinozyten zu einer Induktion der Bildung dieser *Elastase* [38].

Betrachtet man die Vaskularisierung von Geweben wie Haut, so sind auch hier Effekte durch UV-Strahlung zu erkennen. Diese Effekte sind auf die Einflüsse von UVB-Strahlung zurückzuführen und basieren auf Veränderung im Verhältnis des *Angiogeneseinhibitors Thrombospondin 1 (TSP 1)* zu dem *vascular endothelial growth factors (VEGF)*. Akute UVB-Bestrahlung führt zu einer ausgeprägten Anzahl an unreifen Gefäßen in der Haut, vermutlich bedingt durch eine Hochregulation des *VEGF* und einer Runterregulation des *TSP 1* [117]. Langfristige Bestrahlung hingegen scheint eher zu einer Verringerung der Gefäße in der Haut zu führen, wobei der genaue Mechanismus, welcher dahintersteht, noch nicht aufgedeckt ist. Hier spielen eventuell auch die anderen Wellenlängen des Lichtes, welches auf die Haut trifft, eine entscheidende Rolle [39].

UV-Strahlung führt auch zu einer Zunahme der allgemeinen Menge an oxidierten Proteinen in Zellen. Dies liegt primär an der Verringerung der Expression von antioxidativen Proteinen bedingt durch UV-Strahlung. Ursächlich für die Verringerung der Proteinexpression sind sowohl Strahlen im Wellenlängenbereich von UVA als auch UVB. Die Vorgänge gehen einher mit einer Abnahme der Aktivität der *Proteasomen*, deren Aufgabe normalerweise der Abbau von oxidierten Proteinen ist. *Proteasomen* werden durch die Aggregation von oxidierten Proteinen und *Lipofuszin* nach und nach inhibiert, dies wird weiter dadurch beschleunigt, dass die Entstehung der oxidierten Proteine durch die hohen *ROS*-Spiegel vermehrt ist [40].

1.6.3 Blaues Licht

Das Spektrum des blauen Lichts erstreckt sich, wie in Abb. 2 zu sehen, im Bereich von 400 – 500 nm. Wenn später im Versuchsteil dieser Arbeit von blauem Licht gesprochen wird, ist damit monochromatisches Licht der Wellenlänge 453 nm gemeint. Im Vergleich zu Licht anderer Wellenlänge, beispielsweise UV-Licht, ist blaues Licht noch nicht tiefgehend erforscht. Jedoch konnten auch für Licht dieser Wellenlänge bereits einige Einflussfaktoren auf menschliche Zellen und Gewebe nachgewiesen werden. Auch in der Therapie von einigen Erkrankungen wird blaues Licht bereits

eingesetzt, siehe dazu Kapitel 1.6.4. Eine wellenlängen- und dosisabhängige Toxizität von blauem Licht auf verschiedene Zelltypen, wie Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten kann detektiert werden. Hohe Dosen im Wellenlängenbereich von 410 nm – 430 nm haben eine Verringerung der Proliferationsrate zur Folge, Bestrahlung mit 453 nm resultieren in keiner Änderung der Proliferationsrate, blaues Licht der Wellenlänge 480 nm allerdings führt zu einer Erhöhung der Proliferationsrate [118, 119]. In anderen Zelltypen wie Keloidfibroblasten kann diese Veränderung der Proliferationsrate allerdings nicht beobachtet werden [120]. Bei der Bestrahlung von Gingivafibroblasten mit blauem Licht ist es nicht möglich, Kurzzeiteffekte wie *DNA*-Doppelstrangbrüche festzustellen, allerdings kann auf Dauer auch eine Hemmung der Proliferation erkannt werden [121]. Eine mögliche Erklärung der Hemmung der Proliferation könnte eine Inhibition der Mitose sein [122]. Es kann beobachtet werden, dass die Aktivität des an der Atmungskette beteiligten Enzyms *Succinat-Dehydrogenase* durch die Bestrahlung mit blauem Licht verringert wird. Diese verringerte Menge an Enzym könnte die für die Mitose fehlende Energie begründen und somit die beobachtete Hemmung der Proliferation von Zellen, welche mit blauem Licht bestrahlt werden, erklären [123].

Auch kann ein Zusammenhang zwischen der Entstehung von *ROS* und der Bestrahlung mit blauem Licht beobachtet werden. Neben gezeigten toxischen Effekten auf Pigmentepithelzellen kommt es in diesen Zelltypen auch abhängig von der Bestrahlung mit blauem Licht zur Zunahme von *mtDNA*-Läsionen und zu erhöhten Spiegeln von *Singulett-sauerstoff*, *Superoxidanionen* und *Hydroxylradikalen* [124]. Eine Erhöhung an *ROS*-Spiegeln ist auch in dermalen Fibroblasten nach der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 410, 415 und 420 nm beobachtbar [118, 125]. Grundlage für die Induktion der *ROS*-Produktion ist vermutlich die Tatsache, dass blaues Licht die Fähigkeit besitzt, Enzyme mit *Prophyrin-Ring* sowie *Flavinproteine* zu stimulieren, über welche dann die Atmungskette der Mitochondrien aktiviert werden kann [126]. Die zentrale Rolle der Mitochondrien und der Atmungskette im Rahmen der Generierung von *ROS* wurde bereits oben erläutert.

Neben diesen Einflüssen auf die Entstehung von *ROS* kann auch die Generierung von Stickstoffmonoxid auf nicht-enzymatische Wege in Abhängigkeit von der Bestrahlung mit blauem Licht beobachtet werden. In Keratinozyten führt diese Erhöhung der Spiegel von Stickstoffmonoxid zu einer Steigerung der Differenzierung [119].

In Tiermodellen zeigt sich auf der einen Seite, dass Bestrahlung mit blauem Licht im Zusammenhang mit der Entstehung von malignen Melanomen steht [127] und zu photochemischen Schäden der *Retina* führt, der sogenannten *Photoretinitis* [128]. Auf der anderen Seite zeigte sich im Tiermodell allerdings auch die Möglichkeit, mit Hilfe der Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 470 nm die Wundheilung zu verbessern [129] und das Wachstum von Plattenepithelkarzinomen der Haut zu verringern [130].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass blaues Licht viele verschiedene Wirkungen auf Zellen des Körpers hat, die besonders von der genauen Wellenlänge des Lichts, der Dosis und dem Zelltyp

abhängig sind. Es gibt bereits viele interessante Ergebnisse aus der Forschung mit blauem Licht, allerdings bietet dieses Gebiet auch noch sehr viel Möglichkeiten für weitere Forschungen zur Generierung neuer Erkenntnisse.

1.6.4 Lichttherapie

Heutzutage hat die Therapie mit Licht in unterschiedlichen Formen bereits vielseitigen Einzug in der Medizin, besonders in der Dermatologie, gefunden. Im Folgenden werde ich beispielhaft einige dieser lichtbasierten therapeutisch eingesetzten Methoden erläutern.

Eine Anwendungsform von Licht ist die „*Intense pulsed light*“-Therapie (*IPL*). Darunter versteht man polychromatisches, inkohärentes und nicht parallel gerichtetes Licht im Wellenlängenbereich von 420 – 1400 nm mit variierender Pulsationsdauer. Aufgrund dieser weiten Spannbreite ist es recht unselektiv in den Zielstrukturen, weshalb es oft zusammen mit Filtern verwendet wird, so dass nicht das komplette Spektrum wirkt. Eingesetzt wird die *IPL* zur Behandlung von vaskulären Anomalien [131], von kleineren pigmentierten Hautläsionen wie *melanozytäre Nävi* [132], sowie zur Haarentfernung [133].

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit von Licht ist die „*low-level light therapy*“ (*LLLT*), welche anders als die *IPL* auf monochromatischem Licht basiert. Als Quelle für dieses Licht dienen kohärente Laser oder nicht-kohärente *LEDs*. Die eingesetzten Wellenlängen sind mit 600 – 1000 nm nahe dem Infraroten Spektrum. Die *LLLT* kann eingesetzt werden zur Förderung der Wundheilung, dabei kann es auch zur Reduktion von Schwellungen, zur Verringerung von Inflammation und zur Abnahme von Schmerzen beitragen [134-136].

Eine dritte Anwendungsweise von Licht umfasst die Photodynamische Therapie (*PDT*). Zentraler Ansatz der *PDT* ist nicht das Licht selber, sondern die lichtabhängige Produktion von *ROS*, welche zytotoxische Effekte haben und *Apoptose* auslösen können mit Hilfe von *Photosensibilisatoren*. Diese *Photosensibilisatoren* induzieren bei der Bestrahlung mit Licht photochemische Reaktionen, die die Entstehung von *ROS* fördern. Die *Photosensibilisatoren* oder Vorstufen dieser werden bei der *PDT* vor der Bestrahlung meist von extern hinzugegeben. Die eingesetzten Lichtquellen sind variabel und hängen unter anderem von den verwendeten *Photosensibilisatoren* ab. Es können *LEDs*, Laser oder polychromatische Lichtquellen sein. Ein Beispiel für einen häufig eingesetzten *Photosensibilisator* ist *Delta-Amino-Lävulinsäure (ALA)*. Um genau zu sein fungiert *ALA* als Vorstufe, die die Bildung des eigentlichen *Photosensibilisators Protoporphyrin IX (PpIX)* triggert. Eingesetzt wird die *PDT* besonders zur Therapie von *aktinischer Keratose* [137] oder dem *Morbus Bowen*. Des Weiteren gibt es auch viele Studien, die sich mit dem Einsatz der *PDT* gegen verschiedenste Arten von Krebs sowie einer Vielzahl an Hauterkrankungen befassen [138].

Auch UV-Licht wird im Rahmen der *PUVA (psoralen plus ultraviolet A)* therapeutisch eingesetzt. Prinzip dieser Therapiemethode ist die Tatsache, dass die Zielstruktur mit Hilfe des Wirkstoffes *Psoralen* für die Bestrahlung mit UVA-Licht sensibilisiert wird, wodurch der Effekt des UVA-Lichts an den Zielstrukturen maximiert wird. Die *PUVA* findet breiten Einsatz in der dermatologischen

Therapie, zum Beispiel von *Psoriasis*, *Vitiligo* oder Neurodermitis, auch zur Behandlung von *cutanen T-Zelllymphomen* wird es angewendet [139].

Unter anderem basierend auf der oben beschriebenen Fähigkeit von blauem Licht, die Proliferation von Keratinozyten herunterzufahren, wird auch das blaue Licht bereits für therapeutische Zwecke in der Dermatologie im Rahmen der Behandlung von Erkrankungen wie *Psoriasis* [140], *Akne* [141] und *atopischer Dermatitis* [142] eingesetzt.

1.7 Ziele der Arbeit

Wie oben erwähnt, wird blaues Licht der Wellenlänge 453 nm bereits in der Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt. Zudem gibt es noch weitere Krankheiten, bei denen vermutet wird, dass der Einsatz von blauem Licht Fortschritte in der Therapie dieser mit sich bringt. Bei diesen auf der einen Seite scheinbar vielen positiven Eigenschaften von blauem Licht, zum Beispiel in Bezug auf die Wundheilung [129], muss allerdings auf der anderen Seite erwähnt werden, dass die Datenlage zur Wirkung von blauem Licht auf Alterungsprozesse der menschlichen Haut oder menschlicher Zellen im Vergleich zu Licht anderer Wellenlängenbereiche noch nicht sehr umfangreich ist. Bekannt ist, dass UVA-Licht, welches mit seinem Wellenlängenbereich sehr nah an dem Bereich von blauem Licht liegt, unter anderem über die Induktion der exogenen *ROS*-Synthese zu oxidativen Stress in humanen Zellen führen kann und somit Alterungsprozesse dieser Zellen beschleunigen kann [143]. Über blaues Licht ist bereits bekannt, dass es in menschlichen Zellen ebenfalls die exogene *ROS*-Synthese induzieren kann [124]. Es ist allerdings noch nicht bekannt, inwieweit diese Induktion der exogenen *ROS*-Synthese durch die Bestrahlung mit blauem Licht auch zu einer Beschleunigung von Alterungsprozessen der Zellen führt.

Ziel dieser Arbeit ist es daher nun herauszufinden, inwieweit es durch die Bestrahlung von Fibroblasten mit blauem Licht zu einer Veränderung des Anteils an seneszenten Zellen in Kultur beziehungsweise zu einer Veränderung von gängigen Seneszenzmarkern kommt, was letztendlich dann Hinweise auf den Einfluss von blauem Licht auf Alterungsprozesse gibt. Zusätzlich dazu sollen zelluläre antioxidative Mechanismen beleuchtet werden, um den Einfluss des blauen Lichts durch die bekannte Induktion der exogenen *ROS*-Synthese und den dadurch entstehenden oxidativen Stress auf die Fibroblasten zu analysieren. Hierzu soll zum einen die *ROS*-Produktion in Fibroblasten nach Bestrahlung reevaluiert werden und zum anderen mittels Western-Blot und PCR-Verfahren die Proteinexpression sowie die Genexpression von wichtigen antioxidativ wirkenden Enzymen in Abhängigkeit von Bestrahlung betrachtet werden.

Die Erkenntnisse dieser Analysen sollen dann letztendlich zum Aufdecken und zur Beurteilung möglicher Nebenwirkungen, die der therapeutische Einsatz von blauem Licht mit sich bringt, dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

| Gerät | Hersteller und Produktbezeichnung |
|-------------------------|--|
| Abzug | Waldner |
| Blotter | Life Technologies™ Blotter: Novex® Semi-Dry Blotter |
| Brutschrank | Thermo Electron Corporation HERAcell® 150 |
| Dot-Blot-Gerät | Minifold® Slot-Blot System |
| Eisschrank | Revco Ultima 2 |
| Geldokumentationsanlage | BioRad GelDoc |
| Heizbad | Lauda AL12 |
| Heizblock | Fisher Scientific drybath FB 15101 |
| Kamera | AxioCam MRC Zeiss |
| Kryo-Einfriergerät | Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen |
| Kühlschrank | Nalge Nunc International |
| LED-Array | Philips GmbH 453 nm LED Array |
| Magnetrührer | IKA® RET control/t IKAMAG® safety contro |
| Mikroskop | Zeiss Axiovert 40 / Axioskop 40 |
| Multiplattenlesegerät | Perkin Elmer VICTOR3™ V Multilabel Counter model 1420 |
| MyCycler | BioRad |
| Nanodrop | Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 pequlab |
| pH-Meter | HANNA instruments® HI 2211 Basic pH/ORP Benchtop Meter |
| Pipettboy | BRAND accu-jet® pro |
| Pipetten | Eppendorf Research® fix 0,5 - 10 µl / 10 - 100 µl / 100 - 1000 µl |
| Power supplier | BioRad Power Pac HC |
| Radiometer | Dr. Gröbel UV- Elektronik GmbH RM 21 |
| Real Time PCR System | 7300 Real Time PCR System Applied Biosystemes |
| Saugpumpe | KNF Neuberger |
| Sonifiziergerät | Dr. Hielscher GmbH UP 50H |
| Taumel-Rollenmischer | RM5-V 1750 / RM5-V 80 1752 |
| UVA-Lampe | Sellamed UV-A |
| Vortexer | VWR International Art. No 444-1372 |
| Waage | KenABJ Log NoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204 No WB1150 / Ken 440-45 |
| Werkbank | Thermo Electron Corporation HERAsafe® |
| Zentrifuge groß | Thermo Scientific Haraeus Megafuge 16 R |
| Zentrifuge klein | Thermo Scientific Haraeus Pico 17 Microcentrifuge |

Tabelle 2. Auflistung der verwendeten Geräte

2.1.2 Verbrauchsmaterial

| Material | Hersteller und Produktbezeichnung |
|--|---|
| Casting Frames | BioRad |
| Casting Stands | BioRad |
| Deckgläser, rund 15 mm \varnothing | Assistent [®] Deckgläser, rund, Stärke 1, CE, # 41001115 |
| Einwegskalpell | Feather Safety Razor Co., Ltd. |
| Falcons 15 ml / 50 ml | GREINER bio-one Art.-Nr. 188171 / 227261 |
| Glasplatten (0,75 mm) mit Spacer | BioRad |
| Kryogefäße | GREINER bio-one Cryo.s TM Einfrierröhrchen 2 ml TM |
| Nitrocellulose Blotting-Membran Porengröße 0,2 μ m | VWR peqlab, Blotting-Membranen, Nitrozellulose, peqGOLD, # PEQL39-1010 |
| Objektträger ca. 76 x 26 mm | Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH |
| Pasteurpipetten aus Glas | BRAND GmbH + CO KG Pasteurpipetten ISO 7712 |
| Petrischalen 100 x 20 mm | Greiner Bio-One GmbH Petrischale 100 x 20, # 664 102 |
| Pipettenspitzen | Tip One [®] RPT bevelled Tip |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf Safe-Lock Tubes TM 0,5 ml / 1,5 ml / 2,0 ml |
| Spritzen / Spritzenkolben | Braun Injekt [®] |
| Sterile Pinzette | KLS Martin Anatomische Pinzette, 16 cm, # 12-100-16-07 |
| Stripetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml | Costar [®] 5 ml / 10 ml / 25 ml Shorty Stripette [®] Serological Pipets |
| T75er Flaschen | CELLSTAR [®] Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap |
| Well-Platten | GREINER 6 / 12 / 96-Well CELLSTAR [®] Tissue Culture Plates |
| Whatman Filter Papier | BioRad, Extra Thick Blot Filter Paper, Precut, 15 x 15 cm, #1703959 |
| Zählkammer | Neubauer Zählkammer |
| Zellschaber (28 cm) | Greiner Bio-One |
| Zellsieb 70 μ m | Cell Strainer Becton Dickinson |

Tabelle 3. Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller und Prdouktbezeichnung |
|---|---|
| 2-Mercaptoethanol | SIGMA-ALDRICH® 2-Mercaptoethanol M7154 for electrophoresis |
| Acrylamid | Bio-Rad 30 % Acrylamide/Bis Solutions |
| APS | Promega Ammoniumpersulfat |
| Aqua dest. (steril) | Aqua B. Braun, 1000 ml |
| BSA | PAA BSA Fraction V pH 7,0 |
| β-Galaktosidase | β-Galaktosidase, aus E.coli, SIGMA-ALDRICH®, G5635 |
| CellTiter Blue | Promega CellTiter-Blue® Cell Viability Assay |
| Dihydrorhodamine 123 (DHR-123) | SIGMA-ALDRICH® D1054 - Dihydrorhodamine 123 |
| Dispase II | ROCHE Dispase II (neutral protease grade II) |
| DMEM (4,5 g/l Glucose) | PAN P04-03500 |
| DMSO | SIGMA-ALDRICH® Dimethyl sulfoxide D2650 - Hybri-Max™, sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7 % |
| DPBS | Dulbecco`s phosphate buffered saline w: Calcium w: Magnesium PAN-Biotech |
| Entwicklerlösung für Western-Blot Membranen | Clarity™ Western ECL Substrate BioRad |
| Ethanol zur Desinfektion | Merck KGaA 100974 Ethanol denatured with about 1% methyl ethyl ketone for analysis EMSURE® |
| FCS | PAA Fetal Bovine Serum Gold |
| Glucose | SIGMA-ALDRICH® D-(+)-Glucose G7528 BioXtra, ≥99.5 % (GC) |
| Glycerol | Roth Rotipuran® |
| Glycin | Merck KGaA 104201 Glycin zur Analyse |
| Hämatoxylin-Eosin | Merck KGaA |
| Hepes | SIGMA-ALDRICH® HEPES H3375 - ≥99.5 % (titration) |
| Isopropanol | Merck KGaA 818766 2-Propanol EMPLURA® |
| Kollagenase Typ I | Biochrom AG Collagenase Typ I, CLS I |
| Methanol | Merck KGaA 106009 Methanol zur Analyse EMSURE® ACS, ISO, Reag. Ph Eur |
| Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid | SIGMA-ALDRICH®, N1127 |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck KGaA |
| PBS | Biochrom AG PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco) |
| Penicillin / Streptomycin | Gibco® Penicillin-Streptomycin 100X Solution (1000 units) |
| Ponceau S | SERVA Electrophoresis Ponceau S |
| Protein-Marker | Roti® Marker Western |
| SDS | VWR® Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Molekularbiologie |
| TEMED | VWR® N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Analyse |

| | |
|---------------|--|
| Tris | Carl Roth® TRIS PUFFERAN®, ≥99,3 %, Buffer Grade, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tris-Base | Merck KGaA 648310 Tris Base, Molecular Biology Grade Calbiochem® |
| Tris-HCl | Merck KGaA 648310648313 Tris, Hydrochloride, ULTROL® Grade Calbiochem® |
| Triton™ X-100 | SIGMA-ALDRICH® Triton |
| Trypanblau | SIGMA-ALDRICH® Trypan Blue Solution 0,4 % |
| Trypsin/EDTA | Biochrom AG Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ |
| Tween 20 | SIGMA-ALDRICH® Tween |

Tabelle 4. Auflistung der benutzten Chemikalien

2.1.4 Molekularbiologische Materialien und Kit Systeme

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|--|
| Kit zur Bestimmung der Seneszenz via β -Glactosidase-Nachweis | Cell Signaling Staining Kit # 9860 |
| Kit zur Bestimmung der Proteinkonzentration | Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit # 23225 |
| Kit zur Bestimmung der Proteinoxidation | Millipore OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit |
| Kit zur RNA-Isolation | Qiagen Rneasy® Mini Kit # 74106 |
| DNA-free Kit <ul style="list-style-type: none"> • DNase I • Puffer • DNase-Inhibitor | Ambion |
| RT-PCR Kit <ul style="list-style-type: none"> • dNTP-Mix (5 mM) • Oligo dT- Primermix (20 μM) • RNase-Inhibitor (40 U/μl) • Omniscript Reverse Transcriptase (4 U/μl) | Qiagen Omniscript RT-PCR Kit 200 |
| Power SYBR Green | Applied Biosystems |
| Random primer (octamers) | Sigma |
| RNase Inhibitor 2500 U | Ambion |
| Oligo dT15 | SIGMA-ALDRICH® 10814270001 - Primer for cDNA Synthesis |
| Molekularbiologisch reines Wasser | 5PRIME |
| Cu-Zn-SOD Foward 5'AGGCATGTTGGAGACTTGGGC3' | eurofins |
| Cu-Zn-SOD Reverse 5'TTCATGGACCACCAGTGTGCG3' | |
| Mn-SOD Foward 5'GGCGCCCTGGAACCTCACAT3' | |
| Mn-SOD Reverse 5'CATCTCCCTTGGCCAACGCCTC3' | |
| CAT Foward 5'GCTGAGGGTGGAGACCCACG3' | |
| CAT Reverse 5'CATCTCCCTTGGCCAACGCCTC3' | |

Tabelle 5. Auflistung der molekularbiologischen Materialien und Kit-Systeme

2.1.5 Medien, Lösungen und Puffer

| Medium / Puffer | Zusammensetzung |
|---|--|
| Zellkulturmedium | 500 ml Dubleccos MEM |
| | 10 % oder 5 % FCS |
| | 1 % Penicillin / Streptomycin |
| Kollagenase Lösung Gelöst in Aqua dest. | 0,001 M CaCl |
| | 0,005 M Glucose |
| | 0,1 M HEPES |
| | 0,12 M NaCl ₂ |
| | 0,05 M KCl |
| | 0,2 % Kollagenase Typ I |
| | 1,5 % BSA |
| Dispase- Lösung Gelöst in Aqua dest. | PBS |
| | 0,1 % Dispase Typ II |
| | 5 % Hepes |
| RIPA-Puffer für die Proteinlysate nach Abcam Lagerung bei 4° Gelöst in Aqua dest. | 50 mM Tris pH=8 |
| | 150 mM NaCl |
| | 1 % NP-40 |
| | 0,5 % Na-deoxycholat |
| | 0,1 % SDS |
| | Vor Gebrauch werden dem Puffer Phopataseinhibitor und Proteinaseinhibitor zugesetzt. |
| Trenngelpuffer Gelöst in Aqua dest. | 1,5 M Tris |
| | 0,4 % SDS |
| Transferpuffer Gelöst in Aqua dest. | 25 mM Tris-Base, pH 8,0 - 10,5 |
| | 192 mM Glycin |
| Sammelgelpuffer Gelöst in Aqua dest. | 0,5 M Tris |
| | 0,4 % SDS |
| Elektrophoresepuffer Gelöst in Aqua dest. | 25 mM Tris, pH 8,3 - 8,8 |
| | 192 mM Glycin |
| | 0,1 % SDS |
| Blottingpuffer Gelöst in Aqua dest. | 150 ml 10x Transferpuffer |
| | 1200 ml H ₂ O |
| | 150 ml Methanol |
| TBS | 7,7 mM Tris, pH 7,5 |
| | 150 mM NaCl |
| Laemmli-Puffer bei 4°C aufbewahren Gelöst in Aqua dest. | 250 mM Tris-HCl, pH 6,8 |
| | 40 % Glycerol |
| | 8 % SDS |
| | 0,1 % Bromphenolblau |
| | Vor Gebrauch 20 % Mercaptoethanol zusetzen |

Tabelle 6. Auflistung der benutzten Medien, Lösungen und Puffer

2.1.6 Antikörper

| Antikörper | Bezeichnung |
|---------------------------------|---|
| Primärantikörper gegen GAPDH | Monoclonal Antibody to GAPDH-Loading Control IMGENEX |
| Primärantikörper gegen Katalase | ORIGENE Monoclonal Mouse Antibody to Catalase |
| Primärantikörper gegen Mn SOD | Stress Marq Biosciences Inc. Anti Mn-SOD Human |
| Primärantikörper gegen CuZn SOD | Stress Marq Biosciences Inc. Anti CuZn-SOD Human |
| Sekundärantikörper anti mouse | Polyclonal Goat Anti Mouse Immunglobulins/HRP Dako |
| Sekundärantikörper anti rabbit | Polyclonal Goat Anti Rabbit Immunglobulins/HRP Dako |

Tabelle 7. Auflistung der verwendeten Antikörper

2.2 Spender

Für die Arbeit wurden Fibroblasten aus *Präputium* Penis isoliert. Das Alter der Spender lag zwischen 0 und 9 Jahren. Es wurden Zellen in den Passagen 0 bis 10 verwendet. Die Patienten, oder der gesetzliche Vormund, haben gemäß den Richtlinien der Ethikkommission ihr Einverständnis erklärt, dass die Präparate zu Forschungszwecken eingesetzt werden dürfen. Die Nummer des Ethikvotums lautet 3634.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Isolation von Fibroblasten aus der Vorhaut

Die Vorhäute wurden während des Transports zum Labor in sterilen Transportbehältern sowie sterilem Zellkulturmedium (Tabelle 6) gelagert, um einem Austrocknen beziehungsweise Absterben des Gewebes vorzubeugen. Zu Beginn der Bearbeitung der Vorhäute wurde das Zellkulturmedium, so weit wie möglich, abgenommen und zweimal mit sterilem *PBS* ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (*PBS*²⁻) gewaschen, um die Reste des Zellkulturmediums zu entfernen. Anschließend wurde jede Vorhaut in eine separate Petrischale gegeben und mit einem Skalpell in 2 - 3 mm kleine Stücke geschnitten. Die Hautstücke wurden dann in jeweils ein steriles 50 ml Falcon gegeben, in welche je 8 ml der zuvor vorbereiteten *Dispase*-II-Lösung (Tabelle 6) hinzugegeben wurden. Die Präparate wurden in der *Dispase*-II-Lösung über Nacht im Kühlschrank (4 °C) auf einem Taumel-Rollenmischer inkubiert. Die *Dispase*-II-Lösung diente dazu, die Extrazellulärmatrix aufzulösen und somit die Isolation der Zellen zu ermöglichen. Am Folgetag wurden die Präparate für 45 min unter kontinuierlichem Schütteln im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 8 ml *PBS*²⁻ abgestoppt und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der sich ergebende Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Der zweite enzymatische Verdau der Hautstücke wurde nun mit 8 ml der vorbereiteten *Kollagenase*-Lösung

(Tabelle 6) gestartet. Nach 1-stündiger Inkubation unter Schütteln im Wasserbad bei 37 °C wurde zur Isolation der Fibroblasten aus den Hautstücken der gesamte Inhalt der Falcons in ein Sieb gegeben, welches in einer Petrischale lag. Mit Hilfe eines Stempels wurden durch Druck auf das Gewebe die Zellen aus dem Gewebeverband freigesetzt und von unverdauten Gewebebestandteilen getrennt. Dieser Vorgang wurde dreimal³-mal wiederholt, wobei das Sieb zwischenzeitlich immer mit *PBS*² gespült wurde. Der Siebinhalt wurde abschließend verworfen, das Filtrat aus der Petrischale in ein Falcon überführt und 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das entstandene Pellet enthielt die gewünschten Fibroblasten und wurde in Zellkulturmedium resuspendiert, um anschließend in einer sterilen Petrischale ausgesät zu werden. Der Überstand wurde verworfen. Die Fibroblasten in den Petrischalen befanden sich in Passage 0 und konnten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert werden. Um noch vorhandene Gewebsreste und unerwünschte, nicht adhärenente Zellen zu entfernen, wurde am nächsten Tag ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt. Hierzu wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 10 ml *PBS*² gespült und anschließend 10 ml neues Zellkulturmedium hinzugegeben. Im Verlauf wiederholte man diesen Wechsel des Zellkulturmediums alle 2 - 3 Tage, bis die gewünschte Zelldichte auf der Petrischale erreicht war und mit den Zellen weitergearbeitet werden konnte.

2.3.2 Subkultivierung der Zellen

Waren die Zellen im Kulturgefäß so gewachsen, dass sie konfluent waren und sollten sie noch nicht für konkrete Versuche eingesetzt werden, bedurfte es der Subkultivierung der Zellen. Von den adhärenenten Zellen musste das Zellkulturmedium abgenommen werden und anschließend mussten die Reste des Zellkulturmediums und eventuell vorhandene tote Zellen durch eine einmalige Waschung mit warmen *PBS*² entfernt werden. Um die Fibroblasten von dem Gefäßboden zu lösen, wurden sie mit 5 ml *Trypsin/EDTA*-Lösung bedeckt und 5 min bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Unter dem Mikroskop konnte eine Abrundung der Fibroblasten als Zeichen für die Ablösung vom Gefäßboden beobachtet werden. Die restlichen adhärenenten Zellen ließen sich durch leichtes Schlagen gegen das Kulturgefäß („*shake-off*“-Verfahren) vom Boden lösen. Waren alle Zellen gelöst, wurde die Reaktion mit mindestens der gleichen Menge an *FCS*-haltigem Zellkulturmedium gestoppt. Noch adhärenente Zellen ließen sich mit einem Zellkulturschaber durch leichtes druckfreies Schaben vom Gefäßboden lösen. Die Zellsuspension wurde anschließend in einen 50 ml Falcon überführt und bei Bedarf konnte ein Aliquot für die Bestimmung der Zellzahl (2.3.3) entnommen werden. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, woraufhin der entstehende Überstand abgesaugt und das Pellet in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert wurde. Um eine definierte Zellzahl auszusäen, musste vorerst eine Zellzahlbestimmung durchgeführt werden. War keine definierte Zellzahl nötig, wurde die Zellsuspension in gleichen Teilen auf Zellkulturgefäße aufgeteilt, in welche eine ausreichende Menge an Zellkulturmedium vorgelegt wurde. Durch den Vorgang des Ablösens der Zellen von dem Gefäßboden und der erneuten Aussaat erhöhte sich die Passage, in welcher sich die Zellen befinden.

2.3.3 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Für bestimmte Versuchsansätze oder auch zur Kryokonservierung von Zellen war es nötig, die genaue Anzahl der Zellen pro ml Suspension zu kennen. Daher musste eine Zellzahlbestimmung durchgeführt werden. Dies geschah mit Hilfe einer *Neubauer-Zählkammer*. Zu Beginn war es wichtig die Zählkammer vorzubereiten, indem Deckgläschen und Objektträger gut gereinigt wurden. Daraufhin musste der Objektträger befeuchtet und das Deckgläschen auf den Objektträger gedrückt werden, so dass sich *Newtonsche-Interferenzringe* bildeten. Für die Bestimmung der Zellzahl war ein Aliquot von 50 µl der Zellsuspension ausreichend, welches mit der gleichen Menge an *Trypanblau* gemischt wurde. Anschließend wurde es an die Kante des Deckgläschens pipettiert, von wo aus das Gemisch dann durch Kapillarkräfte unter das Deckgläschen und somit über die Zählkammer gesogen wurde. Bei *Trypanblau* handelt es sich um einen *Diazofarbstoff*, der Zellen mit perforierter Membran anfärbt., Lebende Zellen mit intakter Membran können den Farbstoff hingegen gar nicht aufnehmen und scheinen so unter dem Mikroskop weiß.

Um die Zellzahl pro ml bestimmen zu können, wurden mit Hilfe des Mikroskops alle vier äußeren Quadrate ausgezählt.

Die Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wurde wie folgt durchgeführt:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen}}{4} \times 2 \times 10^4$$

4 = 4 Quadrate

2 = Verdünnungsfaktor

10^4 = Kammerfaktor, da eine der Zählkammern 0,1 µl fasst

Sollte die absolute Zellzahl bestimmt werden, musste die Zellzahl pro ml noch mit der Gesamtmenge der Zellsuspension multipliziert werden.

2.3.4 Kryokonservierung der Zellen

Mit Hilfe der Kryokonservierung konnte man Zellen, die aktuell nicht für Versuche benötigt wurden einfrieren, um sie zu späteren Zeitpunkten wieder für Versuche in Kultur nehmen zu können.

Zu Beginn wurde das Zellkulturmedium von den Zellen abgenommen, anschließend wurden Mediumreste und tote Zellen mithilfe von warmen *PBS*²⁻ von den Zellen gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen wie in (2.3.2) beschrieben, mit Hilfe von *Trypsin/EDTA*-Lösung von dem Zellkulturplastik gelöst. Das Ziel war es, ca. 1×10^6 Fibroblasten pro ml Einfriermedium und pro Kryoröhrchen einzufrieren, daher wurde eine Bestimmung der Zellzahl (2.3.3) durchgeführt.

Anhand der ermittelten Zellzahl wurde die benötigte Menge an Kryoröhrchen vorbereitet und mit folgender Beschriftung versehen:

Art der Zellen – Name/Bezeichnung – Passage – Zellzahl / ml – Datum – Name

Das Einfriermedium mit dem die Zellen kryokonserviert wurden, besteht bestand aus *FCS* mit 10 % *Dimethylsulfoxid (DMSO)*. Die benötigte Menge wurde steril angesetzt und auf Eis gelagert, da *DMSO* bei über 0 °C zytotoxisch wirkt.

Die durch das Ablösen der Zellen vom Zellkulturplastik entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon gegeben, welches 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im eisgekühlten Einfriermedium resuspendiert (1 ml/1 x 10⁶ Zellen). Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und auf Eis gelagert. Die Kryoröhrchen wurden nun in ein Kryoeinfriergerät mit 100 % *Isopropanol* gestellt und dieses unmittelbar danach für mindestens 4 Stunden bei -80 °C gelagert. Dies diente dem kontrollierten Herunterkühlen der Zellen um 1 °C pro Minute. Anschließend konnten die Kryoröhrchen bei -80 °C gelagert werden. Für eine langfristige Lagerung mussten die Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert werden

2.3.5 Wiederaufnahme von kryokonservierten Zellen in Zellkultur

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur nehmen zu können, mussten diese aufgetaut werden. Bei dem Auftauen der Zellen war es äußerst wichtig, dass auf Eis gearbeitet wird, da das Einfriermedium 10 % des zytotoxischen *DMSO* enthielt.

Zur Vorbereitung des Auftauprozesses wurde für jedes aufzutauende Kryoröhrchen ein Falcon mit 10 ml warmen Zellkulturmedium bereitgestellt.

Die Kryoröhrchen mit der eingefrorenen Zellsuspension wurden im 37 °C warmen Wasserbad vorsichtig erwärmt, bis ca. die Hälfte der Suspension aufgetaut war. Anschließend wurde die flüssige Zellsuspension sofort in das bereitgestellte Zellkulturmedium überführt und die verbliebene, gefrorene Zellsuspension mit Hilfe des warmen Mediums aufgetaut und ebenfalls in das Falcon überführt. Es wurde dann 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Bei Bedarf konnte nun eine Bestimmung der Zellzahl (2.3.3) durchgeführt werden. Abschließend konnte die Zellsuspension auf die gewünschte Anzahl an Zellkulturgefäßen aufgeteilt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert werden. Am Folgetag wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt.

2.3.6 Bestrahlung von Zellen

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit *LED*-Lampen der Firma *Philips*, die Licht der Wellenlänge 453 nm emittieren (Abb. 4), sowie mit einer *UVA*-Lampe der Firma *Sellamed*

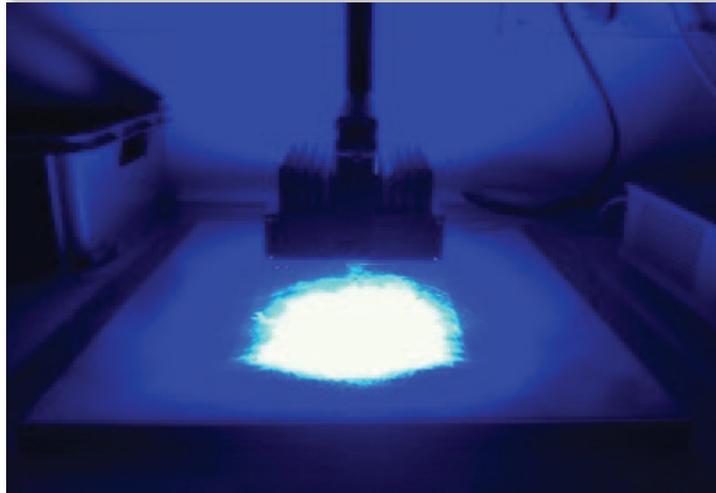


Abb. 4. Verwendete 453 nm LED Lampe

Mit Hilfe eines Radiometers wurde die Strahlflussdichte (*Irradianz*) der Lampen bei verschiedenen Abständen zur Unterlage gemessen. Durch die sich daraus ergebenden Werte konnte über die Dauer der Bestrahlung die Dosis reguliert werden.

$$\text{Zeit (Sek.)} = \frac{\text{Dosis (mJ/cm}^2\text{)}}{\text{Intensität (mW/cm}^2\text{)}}$$

Für die verwendeten 453 nm *LED*-Lampen von *Philips* ergaben sich in Tabelle 8 dargestellte Bestrahlungszeiten:

| Dosis (J/cm ²) | Bestrahlungszeit (min) |
|----------------------------|------------------------|
| 30 | 16 |
| 60 | 32 |
| 90 | 48 |

Tabelle 8. Verwendete Dosen und Bestrahlungszeiten 453 nm *LED*-Lampe

Für die verwendete UVA-Lampe der Firma *Sellamed* ergaben sich in Tabelle 9 aufgelistete Bestrahlungszeiten:

| Dosis (J/cm ²) | Bestrahlungszeit (min) |
|----------------------------|------------------------|
| 5 | 1:26 |
| 7,5 | 2:09 |
| 10 | 2:52 |

Tabelle 9. Verwendete Dosen und Bestrahlungszeiten UVA-Lampe

Diese genutzten Dosen zeigten sich in Vorversuchen als nicht toxisch für die Fibroblasten. Für die Bestrahlung wurden bestimmte Mengen an Fibroblasten in geschlossene 6- oder 12-Well-Platten kultiviert. Da das Zellkulturmedium aufgrund des enthaltenen *Phenolrots* Licht bestimmter

Wellenlängen absorbiert, musste es während der Bestrahlung von den Zellen abgenommen werden. Um einem Ablösen oder Austrocknen der Fibroblasten während der Bestrahlung vorzubeugen, wurden die Zellen für die Dauer der Bestrahlung mit 1 ml (12-Well-Platte) oder 2 ml (6-Well-Platte) *DPBS* (*PBS* mit Calcium und Magnesium) überschichtet. Nach der Bestrahlung wurde das *DPBS* wieder entfernt, durch Zellkulturmedium ersetzt und die Zellen wurden bis zur nächsten Bestrahlung im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ weiter kultiviert. Bei den Zellen, die als Kontrolle dienten, wurde ebenfalls für die Dauer der Bestrahlung das Zellkulturmedium durch *DPBS* ersetzt. Um möglichst identische Bedingungen in Bezug auf Luftzusammensetzung und Temperatur zu schaffen, wurden die Zellen der Kontrollreihe während der Bestrahlungszeit unter der Sterilbank gelagert.

Die Bestrahlung wurde je nach Versuch über einen Zeitraum von 1 bis 20 Tagen durchgeführt, wobei jeden Tag eine Bestrahlung stattfand.

2.4 Bestimmung der Seneszenzinduktion unter Bestrahlung mittels β -Galaktosidase Messung

Anhand der β -Galaktosidase-Aktivität in Zellen kann ermittelt werden, ob sich die Zelle im Seneszenzstadium befindet. Bei den β -Galaktosidasen handelt es sich um Enzyme, die endständige Zuckerreste von galaktosidischen Biomolekülen abbauen. Spezielle β -Galaktosidasen werden besonders in *seneszenten* Zellen exprimiert[57]. Die in diesem Versuch verwendeten Farbstoffe wurden unter Anwesenheit dieser β -Galaktosidasen zu einem blauen Farbstoff umgewandelt. Die Zellen in welchen dies der Fall war, ließen sich lichtmikroskopisch erkennen und galten definitionsgemäß als seneszent [144]. Die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität der Fibroblasten wurde mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* der Firma *Cell Signaling* (#9860) durchgeführt. Die Färbung wurde, wie vom Hersteller in der Kit-Beschreibung angegeben, wie folgt durchgeführt:

Am ersten Versuchstag wurde damit begonnen, das Medium von den Zellen zu entfernen und sie einmal mit *PBS* zu waschen. Es wurde 1 ml der *Fixative Solution* (20 % Formaldehyd, 2 % Glutaraldehyd in *PBS*) auf jedes 6-Well gegeben. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur mit der *Fixative Solution* für 10 - 15 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit *PBS* gereinigt. Um die Zellen für den Farbstoff zu permeabilisieren, wurden sie nun für 15 min mit einer 0,2 % *Triton*-Lösung überschichtet und 15 min inkubiert. Daraufhin wurde 1 ml der *beta-Galactosidase Staining Solution* (930 μ l *Staining Solution* (400 mM Zitronensäure (pH 6.0), 1,5 M NaCl, 20 mM MgCl₂), 10 μ l *Satining Supplement A* (500 mM *Potassium Ferrocyanide*), 10 μ l *Staining Supplement B* (500 mM *Potassium Ferricyanide*) und 50 μ l *X-gal* (5-bromo-4chloro-3-idolyl- β D-galactopyranoside powder) (20 mg gelöst in 1 ml *DMF*)) pro Well auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am zweiten Tag wurde die Färbung der Zellen unter dem Mikroskop (200fache Vergrößerung) kontrolliert. Dafür wurde die *beta-Galactosidase Staining Solution* von den Wells entfernt und durch *PBS* ersetzt. Um die quantitative Auswertung zu erleichtern, wurden die Zellen mit *Hämatoxylin-Eosin* (*HE*) gefärbt. Diese Färbemethode ist eine in der Histologie sehr häufig verwendete Methode zur Visualisierung von

Zellkernen. Die Färbelösung setzt sich aus 2 Bestandteilen zusammen: Der eine Bestandteil ist das *Hämatoxylin*, das in seiner basischen Form, dem *Hämalaun*, alle basophilen Strukturen der Zelle, wie zum Beispiel *DNA*, Zellkerne oder *Ribosomen* bläulich anfärbt. Der andere Bestandteil ist *Eosin*. Dieser synthetische Farbstoff färbt alle acidophilen Bestandteile der Zellen rötlich an, das sind zum Beispiel Proteine im Zytoplasma oder Mitochondrien. Um die Färbung durchzuführen, wurde das *PBS* von den Zellen abgenommen, 1 ml der *HE*-Färbelösung auf die Wells gegeben und die Zellen für 1 min mit dieser inkubiert. Um den Färbeprozess zu induzieren, wird etwas Leitungswasser auf die Wells hinzugegeben und erneut etwa für 1 min inkubiert. Abschließend wird jedes Well dreimal mit *Aqua dest.* gewaschen und letztendlich mit *PBS* beschichtet.

Zur Auswertung wurden von jedem Well mit dem *Zeiss Axiovert 40 Mikroskop* und dem *Axio Vision SE64 REL. 4.9 Programm 3* Fotos von repräsentativen Bereichen angefertigt, siehe dazu exemplarisch Abb. 5 - Abb. 7. Zur längerfristigen Aufbewahrung konnten die Zellen mit 70 % *Glycerol* beschichtet und bei 4 °C gelagert werden.

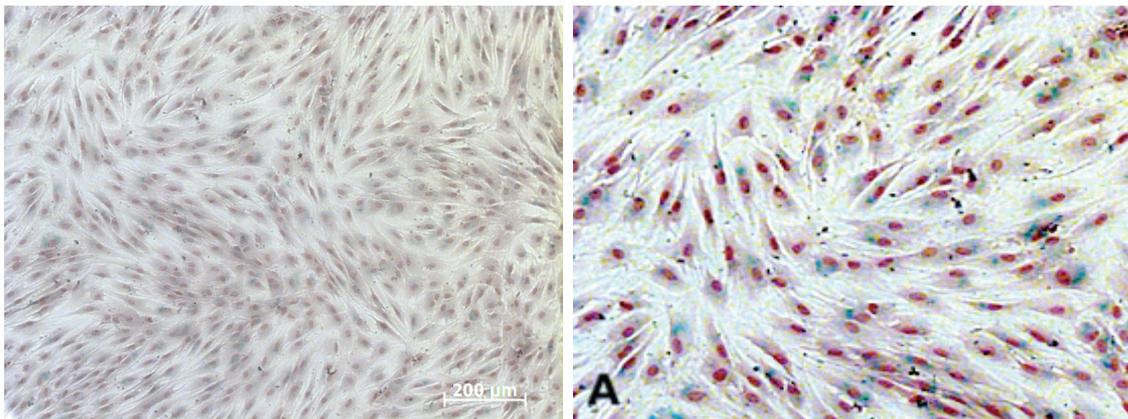


Abb. 5. Fotografie und bearbeitete Beispielaufnahme β -Galaktosidase-Assay Negativkontrolle
Links Fotografie mittels Fotomikroskop von Fibroblasten nach Behandlung mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* der Firma *Cell Signaling* und einer anschließenden Färbung mittels *HE*. Rechts bearbeitete Beispielaufnahme zur Verdeutlichung der Signale. Angefertigt wurde das Foto nach 15-tägiger Behandlung, zu sehen ist die Zellreihe, die als Negativkontrolle dient.

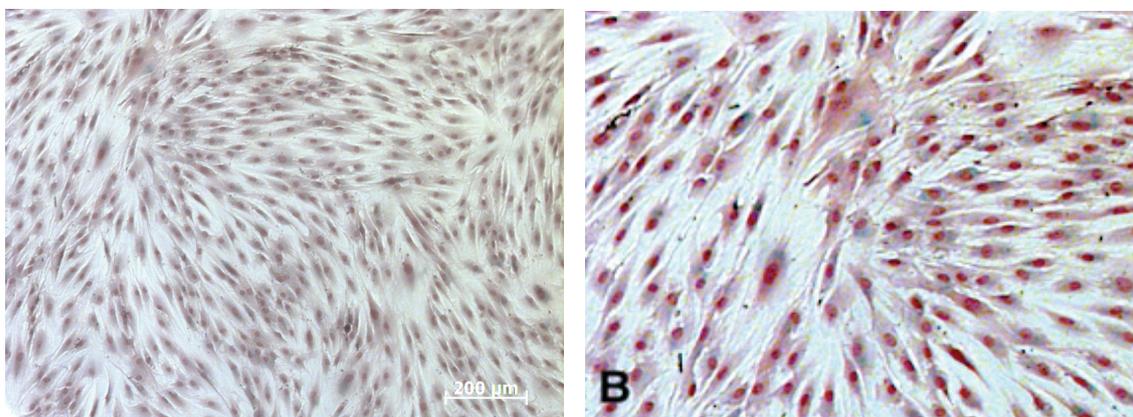


Abb. 6. Fotografie und bearbeitete Beispielaufnahme β -Galaktosidase-Assay blau bestrahlt
Links Fotografie mittels Fotomikroskop von Fibroblasten nach Behandlung mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* der Firma *Cell Signaling* und einer anschließenden Färbung mittels *HE*. Rechts

bearbeitete Beispielaufnahme zur Verdeutlichung der Signale. Angefertigt wurde das Foto nach 15-tägiger Behandlung, zu sehen ist die Zellreihe, die täglich mit 60 J/cm^2 blauem Licht bestrahlt wurde.

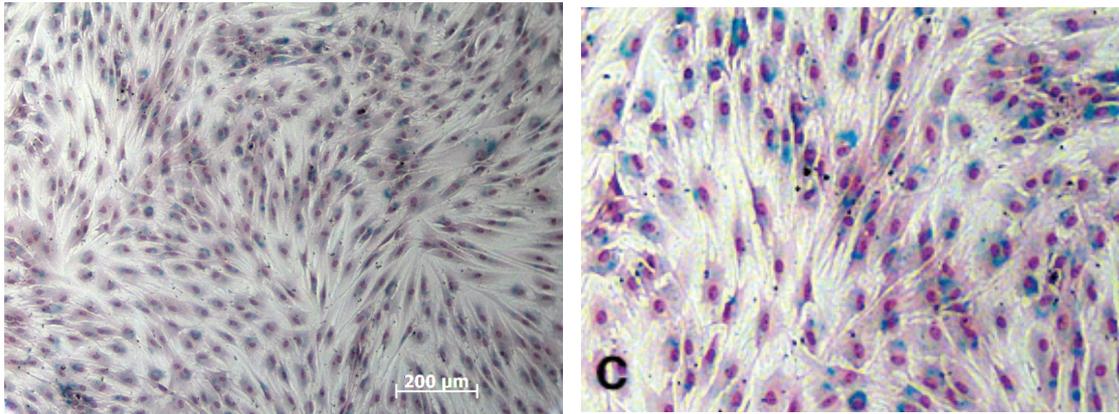


Abb. 7. Fotografie und bearbeitete Beispielaufnahme β -Galactosidase-Assay UVA bestrahlt
Links Fotografie mittels Fotomikroskop von Fibroblasten nach Behandlung mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* der Firma *Cell Signaling* und einer anschließenden Färbung mittels *HE*. Rechts bearbeitete Beispielaufnahme zur Verdeutlichung der Signale. Angefertigt wurde das Foto nach 15-tägiger Behandlung, zu sehen ist die Zellreihe, die täglich mit $7,5 \text{ J/cm}^2$ UVA-Licht als Positivkontrolle bestrahlt wurde.

Zum Ausschluss dessen, dass die β -Galaktosidase selber durch die Bestrahlung mit blauem Licht verändert wurde und es so zu einer Verzerrung der Versuchsergebnisse kam, wurde in einem Vorversuch das rekombinante Enzym alleine bestrahlt. Jeweils 100 Units des Enzyms wurden in 1 ml *PBS* gelöst und in ein 6-Well gegeben. Eine Well-Platte diente als Referenz, daher wurde sie nicht behandelt und kein Substrat hinzugegeben. Eine weitere Well-Platte dient als Negativ-Kontrolle, hier wurde Substrat zu dem Enzym hinzugegeben, ohne dass eine Bestrahlung stattfand. Eine dritte Well-Platte wurde mit 60 J/cm^2 blauem Licht wie oben beschrieben bestrahlt und anschließend das Substrat hinzugefügt. Als Substrat wurde *2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid* in einer Konzentration von $100 \mu\text{M}$ verwendet. Dieses Substrat ist ein Farbstoff, welcher durch die β -Galaktosidase in ein gelbes Produkt umgewandelt wird, dessen Absorption bei 420 nm messbar ist.

2.5 Bestimmung der *Catalase*, *Superoxiddismutase-1* und *Superoxiddismutase-2* Expression unter Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsdosen und -dauer mittels *Western Blot*-Analyse

2.5.1 Ernten von Fibroblasten

Um Enzyme in Fibroblasten bestimmen zu können, mussten die Fibroblasten nach den unterschiedlichen Bestrahlungsversuchen geerntet werden. Von den zu erntenden Fibroblasten wurde das Zellkulturmedium abgenommen und Reste des Nährmediums sowie eventuelle tote Zellen wurden mit *PBS*² herausgewaschen. Danach wurden die Fibroblasten wie in Punkt 2.3.2 beschrieben mit Hilfe von *Trypsin/EDTA*-Lösung vom Zellkulturplastik gelöst. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit *FCS*-haltigen Zellkulturmedium wurde die Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen und das Pellet mit 30

μl RIPA ++ (RIPA-Puffer mit zugesetztem *Protease-* und *Phosphataseinhibitor*) (Tabelle 6) überschichtet. Der RIPA-Puffer nach *Abcam* diente als *Protease-* und *Phosphataseinhibitor*, um die Proteine der Zellen vor dem Abbau zu schützen. Die Zellen mussten mittels *Sonifizierung* noch eröffnet werden, um die Proteine aus dem Zellinneren zugänglich zu machen. Dazu wurde das Gerät *UP 50H* der Firma *Dr. Hielscher GmbH* genutzt. Die Zellen konnten nun bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Ergebnisse der *Western-Blot*-Analyse adäquat miteinander vergleichen zu können war es nötig, dass gleiche Mengen an Proteinen eingesetzt werden. Dafür musste die Proteinkonzentration in den, wie in Punkt 2.5.1 beschrieben, geernteten Zellen gemessen werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in einer Zwei-Stufen-Reaktion und wurde mit Hilfe des *Biocinonic-Assays* durchgeführt. Die genaue Proteinkonzentration ließ sich unter Berücksichtigung des Standards (Tabelle 10) photometrisch ermitteln.

| Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | Probe | BSA-Standard (μl) | PBS (μl) |
|--|-------|--------------------------------|-----------------------|
| 2 | A | 300 | 0 |
| 1,5 | B | 375 | 125 |
| 1,0 | C | 325 | 325 |
| 0,75 | D | 175 von B | 175 |
| 0,5 | E | 325 von C | 325 |
| 0,25 | F | 325 von E | 325 |
| 0,125 | G | 325 von F | 325 |
| 0,025 | H | 100 von G | 400 |
| 0 = BLANK | I | 0 | 400 |

Tabelle 10. Volumina zur Herstellung des BSA-Proteinstandards

Im ersten Teil der Reaktion kommt es zur Komplexbildung von Peptidbindungen mit Cu^{2+} -Ionen, wobei je ein Cu^{2+} -Ion an vier Peptidbindungen bindet, dieser Teil der Reaktion wird als *Biuret*-Reaktion bezeichnet und findet im alkalischen Milieu statt. Im zweiten Reaktionsteil kommt es zur Reduktion, des sich im Komplex befindenden Cu^{2+} -Ion zu einem Cu^{+} -Ion, welches wiederum mit der *Bioconsäure* einen violetten Farbkomplex mit dem Absorptionsmaximum bei 562 nm bildet.[145]

Die Proben, deren Proteingehalt bestimmt werden sollte, wurden im ersten Schritt mit PBS^{2-} im Verhältnis 1:6 verdünnt. Die Proteinbestimmung wurde auf einer 96-Well-Platte durchgeführt. In die Wells wurde jeweils in Doppelbestimmung 10 μl des Proteinstandards (Tabelle 10) und 10 μl der verdünnten Proben pipettiert. Im folgenden Schritt wurde zu dem Standard, wie auch zu den Proben 200 μl des *Working Reagenzes*, bestehend aus Lösung A (*Biocinonsäure*) und Lösung B (4 % Kupfersulfat)

in einem Verhältnis von 50:1, gegeben. Daraufhin wurde die Platte mit einer Folie abgedeckt und zur Durchmischung für 30 Sekunden auf einen Schüttler gestellt. Nach einer anschließenden Inkubation über 30 min bei 37 °C wurde die Absorption mit Hilfe eines Photometers bei 562 nm gemessen.

2.5.3 Prinzip der *Western Blot*-Analyse

Das Blotting von Proteinen beschreibt die Übertragung von Proteinen auf eine Membran. Dieser Vorgang kann entweder durch direktes Tüpfeln der Proteine auf eine Membran (*Dot-Blot*) oder durch einen Transfer der Proteine auf die Membran nach vorheriger gelelektrophoretischer Auftrennung (*Gel-Blot*) vollzogen werden. Die Trennung mittels Gelelektrophorese kann dabei anhand der Molmasse, der Ladung, des isoelektrischen Punktes oder einer Kombination aus diesen erfolgen.

Als ein standardisiertes Verfahren des *Protein-Blottings* gilt der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Membran. Der Erfolg des *Blotting*-Vorgangs kann anschließend mittels einer *Ponceau*-Färbung, welche unspezifisch Proteine anfärbt, visualisiert werden, bevor die eigentliche Nachweisreaktion des zu untersuchenden Proteins durch den *Antikörper-Overlay* erfolgt.

2.5.4 Gießen der Gele

Bei den nachzuweisenden Proteinen Katalase, SOD 1 und SOD 2 handelt es sich 57 kDa, 15 kDa und 23 kDa große Proteine. Auf Grund dieser Größe wurden 12 %ige *Acrylamidgele* verwendet (Tabelle 11). Bevor die Gele gegossen wurden, mussten die Glasplatten, die als Form für die Gele dienen, gereinigt werden und in eine Halteapparatur eingespannt werden. Ebenso wurde ein Kamm, der als Form für die Taschen des Gels dient, mit der gewünschten Taschenanzahl und Dicke bereitgelegt. Der Gießvorgang bestand aus 2 Schritten, im ersten Schritt wurde das Trenngel gegossen, dafür mussten folgende Substanzen zusammengegeben werden (die Angaben beziehen sich auf 1 Gel):

| Proteingröße | % | 30% <i>Acrylamid</i> (ml) | H ₂ O (ml) |
|--------------|-----|---------------------------|-----------------------|
| >250 kDa | 5 | 1,25 | 4,375 |
| 250-120 kDa | 7,5 | 1,875 | 3,75 |
| 120-40 kDa | 10 | 2,5 | 3,125 |
| 40-15 kDa | 12 | 3 | 2,625 |
| <20 kDa | 15 | 3,75 | 1,875 |

Tabelle 11. Volumina zur Herstellung von Trenngelen

Dazu wurden noch unabhängig von der gewünschten Konzentration des Gels 1,875 ml 4fach Trenngelpuffers (Tabelle 6), 10 µl *TEMED* und 25 µl 10 % *APS* gegeben. Der Trenngelpuffer beinhaltete 1,5 M *Tris* und 0,4 % *SDS*. Beim Zusammenmischen der Chemikalien war darauf zu achten, dass das *TEMED* unter einem Abzug pipettiert werden musste. Die Polymerisation des Gels setzte ein, sobald das *APS* hinzugegeben wurde, daher musste das Gel nach der Zugabe zügig zwischen die

Glasplatten pipettiert werden, bis circa $\frac{3}{4}$ der Kammer mit dem Trenngel gefüllt waren. Anschließend wurde es mit 70%igem Ethanol beschichtet, um die Bildung von Luftblasen oder Austrocknung zu verhindern und für 15 - 20 min zur Polymerisierung bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Ethanol abgegossen und die Kammer mit Sammelgel aufgefüllt. Für 1 Sammelgel wurde 650 μ l 30 % *Acrylamid*, 3 ml H₂O, 1,25 ml des 7-fachen Sammelgelpuffers (Tabelle 6), 10 μ l *TEMED*, sowie 25 μ l 10 % *APS* benötigt. Zusammengesetzt war der Sammelgelpuffer aus 0,5 M *Tris* und aus 0,4 % *SDS*. Auch hier war wieder zu beachten, dass *TEMED* unter dem Abzug zu pipettieren und dass nach Zugabe von *APS* der Polymerisationsprozess einsetzte. Sobald das Sammelgel in die Kammer gegeben wurde, musste der bereitgelegte Kamm eingesetzt werden, damit im Sammelgel die gewünschten Taschen für die Proben entstanden. Um auszupolymerisieren wurden die Gele weitere 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Abschließend wurden die Gele zur Lagerung in der Glaskammer in angefeuchtetem Zellstoff eingewickelt, in einen Frischhaltebeutel verpackt und bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.5.5 Vorbereitung der Proben

Von den zu analysierenden Proben, wurde, mithilfe der Werte aus der Proteinbestimmung (2.5.2), die gewünschte Menge an Protein in ein vorbereitetes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert. In den Versuchen wurden 20 μ g Protein verwendet. Zu der Probe wurden 6 μ l eines Gemisches aus 80 % *Laemmli* (Tabelle 6) und 20 % *Beta-Mercaptoethanol* gegeben. Das Gesamtvolumen, welches später in die Taschen pipettiert werden sollte, beträgt 24 μ l, daher wurden die Eppendorf-Gefäße mit Aqua dest. auf 24 μ l aufgefüllt. Mit Hilfe eines *Vortexers* wurde die Probe gut vermischt und anschließend für wenige Sekunden bei 13.000 rpm zentrifugiert, damit keine Reste am Gefäßrand haften blieben. Bevor die Proben aufgetragen werden konnten, mussten sie für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock hitzedenaturiert werden. Daraufhin wurden sie bis zum Auftragen auf Eis gelagert.

2.5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese* (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen anhand ihrer Molmasse. *SDS* ist negativ geladen und überdeckt die Eigenladung der Proteine, die negative Ladung der Proteine, die mit *SDS* in Bindung sind, ist proportional zur Molmasse der Proteine. Dieser Bindungsvorgang findet bereits während der Vorbereitung der Proben statt, da in dem dort verwendeten *Laemmli*-Puffer *SDS* enthalten ist, welches an die Proteine bindet. Die nötige Linearität der Proteine ist durch die Reduzierung der Disulfidbrücken und der somit stattfindenden Auflösung der Tertiärstruktur der Proteine durch das im *Laemmli*-Puffer enthaltene β -*Mercaptoethanol* und der Behandlung im Heizblock gewährleistet.

Das System der diskontinuierlichen *SDS-Gelelektrophorese* basiert auf einem unteren Trenngel (*resolving gel*) und einem oberen Sammelgel (*stacking gel*). Die Funktion des großporigen Sammelgels besteht darin, das Proteingemisch an der Grenze zum Trenngel zu konzentrieren. Dieser Effekt beruht

auf den unterschiedlichen Ionen in den Gelen und dem Elektrophoresepuffer (Tabelle 6). Durch eine schnellere Wanderungsgeschwindigkeit der Cl⁻-Ionen im Sammelgelpuffer im Vergleich zu den *Glycinionen* des Elektrophoresepuffers und den Proteinen entsteht durch den Feldstärkegradienten an der Grenze zum Trenngel eine charakteristische Bande. Aufgrund des pH-Unterschiedes und der unterschiedlichen Porengröße von Sammel- und Trenngel kommt es zu einer Ladungsänderung und einer schnelleren Wanderungsgeschwindigkeit der *Glycinionen* im Trenngel. Dieser Effekt bewirkt, dass der Ladungsunterschied aufgehoben wird und die Proteine im Trenngel nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Um die *SDS*-Gelelektrophorese durchzuführen, mussten zur Vorbereitung die Gele in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden und der Elektrophoresepuffer in die Kammer gefüllt werden. Der Elektrophoresepuffer wurde zusammengemischt mit 25 mM *Tris*, 192 mM *Glycin* und 0,1 % *SDS*. Die Kämme wurden jetzt vorsichtig aus dem Gel gezogen und die auf Eis gelagerten Proben in die Taschen pipettiert. Um einen späteren Größenvergleich der Proteine durchführen zu können, wurde in die erste Tasche ein Western-Protein-Marker der Firma *Roti* pipettiert. Die Elektrophoresekammer wurde verschlossen und für die ersten 20 min eine Spannung von 60 V angelegt, damit die Proteine an der Grenze zum Trenngel konzentriert werden konnten. Anschließend wurde die Spannung auf 130 V erhöht und die Gelelektrophorese so lange laufen gelassen, bis die Proben durch das Trenngel gelaufen waren.

2.5.7 Blotting

Der Western Blot im eigentlichen Sinne fand mit der nun folgenden Übertragung der Proteine von dem Gel auf eine *Nitrocellulose*-Membran statt. Zum Blotten wurde die *Trans Blot Turbo Apparatur* für 30 min bei 25 V und 2,5 A verwendet. Zur Vorbereitung wurden zwei *Whatman*-Papiere und die *Nitrocellulose*-Membran auf die Größe der Gele zugeschnitten und in Transferpuffer (Tabelle 6) getränkt. Dieser Puffer bestand aus 25 mM *Tris*-Base und 192 mM *Glycin*. Bevor das Gel in die Apparatur gegeben wurde, musste es aus der Kammer gelöst werden und das Sammelgel entfernt werden. Die einzelnen Komponenten wurden wie in Abb. 8 schematisch gezeigt in die Blot-Kassette gegeben.

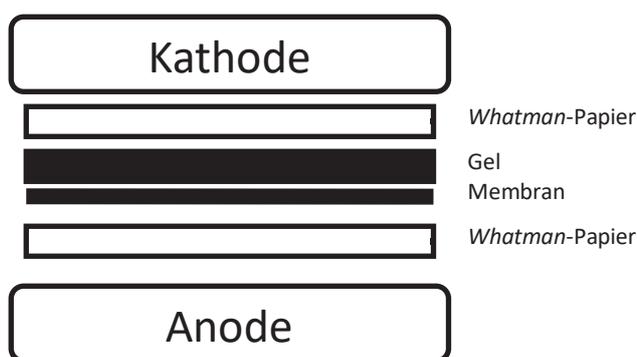


Abb. 8. Schematische Darstellung des Aufbaus der Blotting Apparatur

Anschließend wurde die Kassette geschlossen und der Blotting Vorgang konnte gestartet werden.

2.5.8 Ponceau-S-Färbung

Um zu kontrollieren, ob der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgreich war, wurde eine Färbung mit *Ponceau-S* durchgeführt. *Ponceau-S* färbt Proteine unspezifisch an. Zur Durchführung der Färbung wurde die Membran im Anschluss an den Blotting-Prozess in eine Schale überführt und für 3 min mit der *Ponceau-S*-Färbelösung überschichtet. Zum Sichtbarmachen der Proteine wurde die Membran mit *Aqua dest.* gespült. Die *Ponceau-S*-Färbelösung konnte mit Hilfe von *TBS-T* (*Tris Buffer Saline* mit *Tween*) wieder herausgewaschen werden. Die Membran wurde anschließend weiterbearbeitet oder in *TBS* bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

2.5.9 Immundetektion der *Katalase*, *SOD1* und *SOD2* Proteine sowie von *GAPDH*

Als Vorbereitung für die Immundetektion wurde die Membran für eine Stunde mit einer Blocking-Lösung aus 5 % *BSA* in *TBS-T* bei Raumtemperatur unter ständigem Rollen inkubiert. Durch diesen Vorgang konnte ein unspezifisches Binden der Antikörper an die Membran verhindert werden. Im Anschluss konnte mit der eigentlichen Immundetektion als Nachweis gestartet werden. Im ersten Schritt wurde ein *monoklonaler* Maus-Antikörper von *ORIGENE* gegen *Katalase* eingesetzt. Dieser Antikörper wurde im Verhältnis 1 : 2500 in einer *TBS-T* Lösung mit 3 % *BSA* verdünnt. Von dem Gemisch wurden 5 ml auf die Membran gegeben und unter ständigem Rollen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran noch für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur unter ständigem Rollen inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift, in welchem die Membran drei-mal für 5 min mit *TBS-T* gewaschen wurde, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, konnte der Sekundärantikörper eingesetzt werden. Der Sekundärantikörper der Firma *Dako* ist ein Anti-Maus-Antikörper, der mit einer *Meerettichperoxidase (HRP)* gekoppelt ist. Er wurde zusammen mit dem anti-Western Marker im Verhältnis 1 : 1000 in *TBS-T* verdünnt. 5 ml des Gemisches wurden auf die Membran gegeben und sie wurde für 1 Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur unter ständigem Rollen inkubiert.

Zur Detektion des Proteins *Katalase* wurde eine Geldokumentationsanlage verwendet. Das Prinzip dahinter ist, dass der Blot für eine kurze Zeit mit einer Entwicklerlösung, welche *Luminol* enthält überschichtet wurde. Die *HRP*, die mit dem Sekundärantikörper gekoppelt ist oxidiert das *Luminol*, wodurch eine Chemilumineszenzreaktion hervorgerufen wurde, welche durch die Geldokumentationsanlage mit UV-Licht sichtbar gemacht wurde. Mit Hilfe der ebenfalls lumineszierenden Banden des Markers konnten die Proteinbanden einem Molekulargewicht zugeordnet werden. Die nun sichtbaren Banden wurden für die spätere Auswertung fotografiert.

Anschließend wurde die Membran zur Detektion der *SOD 1* mit einem weiteren Primär-Antikörper inkubiert. Es wurde ein *monoklonaler Rabbit*-Antikörper von *Stress Marq Biosciences* gegen die *Cu-Zn-SOD* eingesetzt, der zuvor ebenfalls im Verhältnis 1 : 2500 mit einer 3 % *BSA TBS-T*-Lösung gemischt

wurde. Die Inkubation erfolgte wiederum über Nacht unter ständigem Rollen bei 4 °C mit einer anschließenden Stunde Inkubation bei Raumtemperatur am Folgetag. Bevor der Sekundär-Antikörper auf die Membran gegeben wurde, musste diese, wie oben bereits beschrieben, mit *TBS-T* gewaschen werden. Der eingesetzte Sekundärantikörper der Firma *Dako* war ein *Anti-Rabbit*-Antikörper, der ebenfalls mit *HRP* gekoppelt war. Er wurde ebenfalls zusammen mit dem anti-Western Marker im Verhältnis 1 : 1000 in *TBS-T* verdünnt und 5 ml von dem Gemisch auf die Membran gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation lichtgeschützt bei Raumtemperatur unter ständigem Rollen wurde der oben bereits beschriebene Detektionsprozess mit der Geldokumentationsanlage erneut durchgeführt. Um auch die *SOD 2* nachzuweisen, wurde die Membran anschließend mit einem Primär-Antikörper, ebenfalls von *Stress Marq Biosciences*, gegen dieses Protein inkubiert. Der eingesetzte Antikörper war ebenfalls ein *monoklonaler Rabbit*-Antikörper, der im Verhältniss 1 : 4000 in einer 3 % *BSA* enthaltenen *TBS-T* Lösung verdünnt wurde. 5 ml der erzeugten Lösung wurden auf die Membran gegeben und es folgte erneut eine Inkubation über Nacht unter ständigem Rollen bei 4 °C. Am folgenden Tag wurde nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur ebenso verfahren, wie es bei dem Nachweis von *SOD 2* bereits oben beschrieben wurde.

Nach der Detektion mit der Geldokumentationsanlage wurde der vierte Primär-Antikörper eingesetzt. Mit diesem Antikörper der Firma *IMGENEX* wurde das Protein *GAPDH* nachgewiesen, der Nachweis von *GAPDH* wurde dazu genutzt, um die Ergebnisse der Detektion der anderen Proteine auf dieses zu normieren und um Pipettierfehler während der Vorbereitung der Proben auszuschließen bzw. auszugleichen, da die Menge an *GAPDH* durch die Versuche unbeeinflusst bleibt (*Housekeepingprotein*). Der Antikörper gegen *GAPDH* war ein *monoklonaler Mouse*-Antikörper, der vor dem Einsatz im Verhältnis 1 : 10000 in einer *TBS-T* Lösung mit 3 % *BSA* verdünnt wurde. Die Membran wurde nach Zugabe des verdünnten Antikörpers für 3 - 4 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Rollen inkubiert. Der Waschprozess sowie der Inkubationsprozess mit dem Sekundär-Antikörper wurden wie oben bereits beschrieben durchgeführt. Der eingesetzte Sekundärantikörper war ein *Anti-Mouse* Antikörper, gekoppelt mit *HRP*. Abschließend wurde nochmals mit Hilfe der Geldokumentationsanlage, wie oben beschrieben, eine Detektion durchgeführt.

Musste dieser Versuch pausiert werden, bestand immer die Möglichkeit die Membranen, nach der Detektion mit der Geldokumentationsanlage, in *TBS* im Kühlschrank lichtgeschützt für mehrere Tage zu lagern.

Die *densitometrische* Auswertung der Blots erfolgte mit Hilfe der Software *QuantityOne* von *BioRad*.

2.6 Bestimmung der Menge an oxidierten Proteinen unter Einfluss von Bestrahlung mittels *Dot-Blot*-Analyse

Um den Effekt von *ROS* auf die Zellen zu analysieren, wurde mittels eines *Dot-Blots* die Gesamtmenge an oxidierten Proteinen in Zellen in Abhängigkeit von Bestrahlungen unterschiedlicher Dosen analysiert. Bei einer *Dot-Blot*-Analyse wird die Gesamtheit an Protein in einer Bande auf die Membran

aufgebracht, ohne vorher gelelektrophoretisch aufgetrennt zu werden. Die *Dot-Blot*-Analyse wurde mit Hilfe des „*OxyBlot Protein Oxidation Detection*“ – Kit der Firma *Millipore* durchgeführt. Prinzip hinter diesem Kit ist, dass durch oxidativen Stress in Zellen Carbonylgruppen in Aminosäuren und somit auch in Proteinen gebildet werden. Diese lassen sich mit Hilfe dieses Kits nachweisen, indem diese Gruppen mit *2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)* reagieren, wodurch *2,4-Dinitrophenylhydrazon (DNP-Hydrazon)* entsteht. An dieses wiederum kann ein *Rabbit*-Antikörper spezifisch binden. Diese Bindung kann im Folgenden mittels eines sekundären Antikörpers nachgewiesen werden.

Vor Versuchsbeginn musste mit den Proben eine wie in 2.5.2 beschriebene Proteinbestimmung durchgeführt werden. Das Kit wurde wie in den Herstellerangaben vorgegeben angewendet. Für jede Probe wurden 2 1,5 ml Eppendorf-Gefäße vorbereitet und passend beschriftet. Anhand der Daten aus der Proteinbestimmung wurden jeweils 5 µg Protein einer jeden Probe in die dafür vorgesehenen Eppendorf-Gefäße pipettiert. Um die Proteine zu denaturieren, wurde die gleiche Menge an 12 %igem *SDS* in *PBS* hinzugegeben. Eines der beiden Eppendorf-Gefäße wurde zur Bestimmung der oxidierten Proteine eingesetzt, das andere wurde als Negativkontrolle verwendet. In das Gefäß, welches zur Bestimmung der oxidierten Proteine eingesetzt wurde, wurde für jeden ml, der an Proteinlösung eingesetzt wurde, 2 ml der 1X *DNPH*-Solution gegeben. Dadurch reagierten die Carbonylgruppen der Aminosäuren der Proteine der Proben zu *DNP-Hydrzone*, welche später nachweisbar waren. In das Gefäß für die Negativkontrolle wurde die gleiche Menge an 1X *Derivatization-Control-Solution* gegeben. Anschließend wurden beide Ansätze für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als letzten Schritt, bevor die Proben in die *Dot-Blot*-Apparatur gegeben werden konnten, musste nach der Inkubationszeit in jedes Eppendorf-Gefäß 1,25 µl *Neutralization-Solution* sowie 0,2 µl *β-Mercaptoethanol* gegeben werden, um die Reaktion abzustoppen und um die Proteine zu denaturieren. In die Apparatur wurde eine in *PBS* vorgetränkte *Nitrocellulose*-Membran eingelegt. Auf diese Membran wurde ein ebenfalls in *PBS* getränktes *Whatman*-Papier aufgelegt. Wurden *Whatman*-Papier und Membran eingelegt, konnte eine Saugpumpe zur Erzeugung des Vakuums angeschlossen werden. Mit Hilfe des Vakuums wurden die Proteine in die *Nitrocellulose*-Membran gezogen. Die einzelnen Kammern der Apparatur wurden, bevor die Proben aufgetragen wurden, mit 500 µl *TBS* durchgespült. Anschließend wurden die Proben in jeweils 500 µl *TBS* gelöst und jede Probe in eine Kammer gegeben. War die komplette Menge durch die Membran gesaugt worden, wurde abschließend jede benutzte Kammer noch einmal mit 500 µl *TBS* gespült.

Für die Weiterbearbeitung der Membran wurde eine Schale mit Transferpuffer vorbereitet. Die *Nitrocellulose*-Membran wurde in die Schale gegeben und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die *Nitrocellulose*-Membran für eine Stunde unter ständigem Schwenken in einem Falcon mit 5 ml *Blocking-Puffer* bestehend aus 1 % *BSA* in *PBS-T*, inkubiert, um ein späteres unspezifisches Binden des Antikörpers zu verhindern. Daraufhin konnte die Membran mit dem Primäantikörper inkubiert werden. Der Primäantikörper war ein *Rabbit*-Antikörper, der an *DNP-Hydrazon* bindet. Vor seinem Einsatz musste der Antikörper im Verhältnis von 1 : 150 in einer Lösung aus 1 % *BSA* in *PBS-T* verdünnt

werden. 4 ml dieser Verdünnung wurden auf die Membran gegeben und es wurde über Nacht bei 4 °C unter ständigen Rollen inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur unter Rollen inkubiert und anschließend dreimal für 5 min unter ständigem Rollen mit *PBS-T* gewaschen. Im nächsten Schritt wurde ein *HRP* gekoppelter *Goat-Anti-Rabbit*-Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 300 in 1 % *BSA* in *PBS-T* auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Rollen inkubiert. Abschließend wurde mit der Membran eine Protein-Detektion wie in 2.5.9 beschrieben durchgeführt und fotografisch dokumentiert. Die densitometrische Auswertung der Blots erfolgte ebenfalls mit Hilfe der Software *QuantityOne* von *BioRad*.

2.7 Analyse der Entstehung von *ROS* durch Bestrahlung mit blauem Licht

2.7.1 Prinzip des *CellTiter-Blue*[®]-Assays

Das Verfahren des *CellTiter-Blue*[®]-Assays dient zur Bestimmung der Zellviabilität, Proliferation und Zytotoxizität. Hintergrund des Assays ist, dass der blaue Farbstoff *Resazurin* durch Zellen, welche Stoffwechselaktivität aufweisen zu dem violetten Farbstoff *Resorufin* umgesetzt wird und dessen Bildung bei der Wellenlänge von 590 nm fluorometrisch bestimmt werden kann.

CellTiterBlue wurde im Verhältnis 1 : 20 in Nährmedium verdünnt und anschließend in die Wells auf die zu analysierenden Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 min im Brutschrank wurden je Probe 2 mal 100 µl auf eine 96-Well Platte pipettiert, ebenfalls wurden 2 mal 100 µl eines mitgeführten Blanks auf die 96-Well Platte pipettiert. Diese Platte wurde anschließend im Multiplattenlesegerät *VICTOR3* von *Perkin Elmer* fluorometrisch ausgewertet. Die Zellen mussten einmal mit *PBS* gewaschen werden und konnten anschließend weiter behandelt oder kultiviert werden.

2.7.2 Messung von *ROS* mittels *Dihydrorhodamin 123 (DHR)*

Zur Bestimmung von *ROS*-Produkten nutzt man das ungeladene und nicht fluoreszierende Reduktionsprodukt *DHR*. *DHR* ist das Reduktionsprodukt des mitochondrienselektiven Farbstoffes *Rhodamin 123*. Nachdem *DHR* mittels Diffusion über die Zellmembran in die Zelle gelangt ist, wird es in den Mitochondrien lokalisiert und zu dem Kation *Rhodamin 123* oxidiert. Diese Reaktion findet unter Anwesenheit von *Peroxidasen*, *Cytochrom C* oder Eisen²⁺ mit Wasserstoffperoxid statt. Das *Rhodamin 123* lässt sich photometrisch bei einer *Emission* von 500 nm und *Exzitation* von 536 nm detektieren. Die *ROS*-Messung mittels *DHR* wurde jeweils vor und nach der Bestrahlung mit 60 J/cm² blauem Licht durchgeführt.

Das *DHR* wurde für den Versuch wie folgt verdünnt: in 1 ml Zellkulturmedium wurden 10 µl des *DHR* gegeben. Zu Beginn des Versuches wurde das Nährmedium von den Zellen abgenommen und durch jeweils 1 ml des *DHR*-Nährmedium-Gemisch pro Well einer 6-Well-Platte ersetzt. Anschließend wurde die Platte für circa 60 min zur Inkubation im Brutschrank gelagert. Nach der Inkubationszeit musste das *DHR* abgenommen und die Zellen einmal mit *PBS* gewaschen werden. Darauf folgend wurden in jedes

Well 500 µl *Isopropanol* gegeben, um die Zellen zu lysieren und das Zellinnere freizusetzen. Nach einer Wartezeit von 3 - 4 min konnten aus jedem Well 2 mal 100 µl des Lysates auf eine 96-Wellplatte für die Messung gegeben werden. Zusätzlich wurden in 2 Wells der 96-Well-Platte jeweils 100 µl reines *Isopropanol* als *Blank* gegeben. Die photometrische Auswertung fand mit Hilfe des Multiplattenlesegerät *VICTOR3* von *Perkin Elmer* statt. Die Zellen konnten nach diesem Versuch nicht mehr weiterkultiviert werden.

2.8 Real-time- quantitative- PCR (qRT-PCR)

Die *real-time quantitative PCR* ist eine moderne Variante der *polymerase-chain-reaction (PCR)* zur Amplifizierung und Quantifizierung von Nucleinsäuren. Das Prinzip der klassischen *PCR*-Reaktion besagt, dass in den frühen *PCR*-Zyklen eine exponentielle Vermehrung der *DNA*-Fragmente stattfindet. Akkumuliert das Produkt, kommt es unter anderem auch dazu, dass nicht mehr genügend *Primer* oder *Nukleotide* vorhanden sind oder auch dazu, dass durch die anhaltend hohen Temperaturen die *Polymerase* ihre Aktivität verliert. Diese Zunahme von Störfaktoren führt dazu, dass das lineare Wachstum von *DNA*-Fragmenten letztendlich zum Stillstand kommt. Die Zykluszahl, die bei der die Vermehrung exponentiell ist, wird als *CT (cycle threshold)* -Wert bezeichnet [146]. Um das Ergebnis der *qRT-PCR* nachzuweisen, nutzt man Farbstoffe wie zum Beispiel *SYBR*, welche unspezifisch in doppelsträngige *DNA* eingebaut werden.

2.8.1 Ribonukleinsäure (RNA) Isolierung

2.8.1.1 RNA-Isolierung mittels RNeasy Mini Kit von Quiagen

Die Zellen, welche mittels *PCR* analysiert werden sollten, mussten vorerst, wie in 2.3.2 beschrieben, vom Zellkulturplastik gelöst werden. Die im Rahmen der *RNA*-Isolierung verwendeten Puffer, *Collection Tubes* und Säulen, waren alle mitgelieferte Bestandteile des verwendeten *RNeasy Mini Kit's* von *Quiagen*. Die zu analysierenden Zellen mussten vorerst lysiert werden. Dies geschah mit Hilfe des *RLT*-Puffers, dafür wurden jeweils 350 µl des Puffers auf die Zellen gegeben und für circa 30 sec geschüttelt. Das erzeugte Zelllysat wurde nachfolgend auf die *QIAshredder* Säule gegeben, welche vorher in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß gestellt wurde. Das Lysat in der Säule wurde nun für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Durch diesen Vorgang wurden die Zellen mechanisch eröffnet. Die Säule wurde anschließend verworfen. Auf die Probe in dem Eppendorf-Gefäß wurden 350 µl 70 % Ethanol gegeben. Um die *RNA* aufzureinigen, wurde nach dem Mischen mittels Auf- und Abpipettieren das Gemisch auf eine *RNeasy Mini-Säule* aufgeladen, die für 30 Sekunden bei 13.000 rpm in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß zentrifugiert wurde. Die *RNA* befand sich nun in der Säule, so dass der Überstand, welcher die anderen Zellbestandteile enthält, verworfen werden konnte. Im folgenden Schritt wurde in jede Mini-Säule 350 µl *RWI*-Puffer gegeben und für 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss konnte erneut verworfen werden. Jetzt wurden 10 µl *DNaseI*-Stocklösung und 70 µl *RDD*-Puffer hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 80 µl des *DNase*-Mix auf die Membran

pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden erneut 350 μl *RWI*-Puffer hinzugegeben und es wurde für 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Säule in ein neues 2 ml *Collection-Tube* platziert und 500 μl *RPE* hinzugegeben, daraufhin fand eine erneute Zentrifugation für 30 sec bei 13.000 rpm statt. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, woraufhin dann die Säule in ein neues 2 ml *Collection-Tube* platziert und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml *Collection-Tube* überführt, 40 μl *Rnase*-freies H_2O direkt auf die Membran pipettiert und für circa 5 min gewartet, und dann nochmals eine Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die *RNA*-Lösung musste entweder auf Eis gestellt werden oder für den späteren Gebrauch bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren werden.

2.8.1.2 Spektrometrische Konzentrationsbestimmung der Total-*RNA*

Für die spektrometrische Konzentrationsbestimmung der Total-*RNA* wurden 2 μl der isolierten *RNA* mit 98 μl H_2O vermischt, so dass eine 1:50 Verdünnung entstand. Die Bestimmung erfolgte bei einer Absorption von 260 nm mithilfe des *NanoDrop*. Dazu wurden immer jeweils 1,5 μl der verdünnten Probe in das Gerät gegeben. Lag der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm bei 2,0 war er optimal, lag der Absorptionsquotient unter 1,7, so war dies ein Zeichen dafür, dass eine Kontamination mit Proteinen oder aromatischen Substanzen vorlag.

2.8.2 Reverse-Transkription der Total-*RNA* in *cDNA*

Mit dem Verfahren der *Reversen-Transkription* wandelt man die isolierte *RNA* in komplementäre *cDNA* um. Bevor man die *Reverse-Transkription* starten konnte, war es nötig, den oben beschriebenen *DNA*-Verdau durchzuführen.

Vor Beginn der *Reversen-Transkription* wurde die *RNA*-Probe auf eine Konzentration von 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 10 μl Wasser verdünnt. Für die Reaktion wurde ein Master Mix nach dem Schema in Tabelle 12 pipettiert.

| | Endkonzentration | Für eine Reaktion |
|---|------------------|--------------------|
| 10 x <i>PCR</i> -buffer | 1 x | 2 μl |
| <i>d</i> - <i>NTP</i> -Mix (5 mM each) | 0,5 mM each | 2 μl |
| <i>Oligo-dT</i> (20 μM) | 1 μM | 1 μl |
| <i>RNase</i> -free H_2O | | 4,5 μl |
| <i>RNase</i> -inhibitor | | 0,25 μl |
| <i>Omniscript RTase</i> | | 0,25 μl |

Tabelle 12. Volumina zur Herstellung eines *Master mixes* für die *RT-PCR*

Für die *Reverse-Transkriptase*-Reaktion wurden 10 μl des *Mastermix* und 10 μl der mit Wasser verdünnten *RNA* zusammen pipettiert und für 1 Stunde bei konstanten $37\text{ }^\circ\text{C}$ in den *Thermo Cycler* von

Bio Rad platziert. Nach der Reaktion konnte die *cDNA*, falls sie nicht direkt weiterverarbeitet wurde, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die *RNA* bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

2.8.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um die eigentliche *real time PCR* Messung zu starten, war es nötig, die optimale *Template*-Konzentration herzustellen. Bei der *Reversen-Transkription* wurde von optimalen Bedingungen ausgegangen, daher konnte man davon ausgehen, dass die eingesetzten 500 ng der *RNA* in 500 ng *cDNA* transkribiert worden sind. Das ergab bei einem Gesamtvolumen von 20 μl eine *cDNA*-Konzentration von 25 ng/ μl . Ziel war eine Konzentration von 0,5 ng/ μl *cDNA* einzusetzen, dafür war eine Verdünnung der Ausgangsprobe von 1 : 50 nötig. Im Folgenden wurde für jedes zu untersuchende Gen ein *Mastermix* nach dem Schema in Tabelle 13 angefertigt.

| | Endkonzentration | Für 1 Reaktion |
|---|------------------|--------------------|
| <i>SYBR green master mix 2x</i> | 1x | 12,5 μl |
| <i>Primer forward (10 μM)</i> | 300 nM | 0,75 μl |
| <i>Primer reverse (10 μM)</i> | 300 nM | 0,75 μl |
| <i>Rnase Dnase free water</i> | | 7 μl |
| <i>Sample (0,5 ng/μl <i>cDNA</i>)</i> | | 4 μl |
| Total | | 25 μl |

Tabelle 13. Volumina zur Herstellung eines *Master mixes* für die *qRT-PCR*

Zur Analyse wurden pro untersuchtem Gen jeweils dreimal der *Mastermix* auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Als Kontrolle wurden zusätzlich zu jedem untersuchten Gen in ein Well *pre-RT RNA* und in ein Well eine *non template control (NTP)*, in welche bei der Verdünnung keine *cDNA*, sondern Wasser pipettiert wurde, gegeben. Die Kontrollen dienten dem Ausschluss einer Kontamination der verwendeten Reagenzien.

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene waren die Gene für *Mn-SOD*, *Cu-Zn-SOD* und für *Katalase*. Die verwendeten *Primer* (Tabelle 14) wurden von der Firma *eurofins* bezogen. Als Haushaltsgen zur Normierung und Kontrolle wurde *S-18* verwendet.

| Primer Name | Sequenz 5' - 3' |
|--------------------------|------------------------|
| <i>Cu-Zn-SOD Foward</i> | AGGCATGTTGGAGACTTGGGC |
| <i>Cu-Zn-SOD Reverse</i> | TTCATGGACCACCAGTGTGCG |
| <i>Mn-SOD Foward</i> | GGCGCCCTGGAACCTCACAT |
| <i>Mn-SOD Reverse</i> | CATCTCCCTTGGCCAACGCCTC |
| <i>CAT Foward</i> | GCTGAGGGTGGAGACCCACG |
| <i>CAT Reverse</i> | GACATCAGCTTTCTGCGCGGC |

Tabelle 14. Auflistung der eingesetzten *Primer* der Firma *eurofins* mit zugehöriger Sequenz

Die Messung erfolgte im *Real-Time Thermocycler* der Firma *Applied Biosystems* nach dem Beladen der 96-Well-Platte wie folgt:

Stufe 1: 10 min bei 95 °C
 Stufe 2 (40 Zyklen): 15 Sekunden bei 95 °C
 60 Sekunden bei 60 °C

Das Ergebnis der Messung wurde grafisch ausgegeben, dabei wurde die gemessene Fluoreszenz gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen. Aus dem exponentiellen Bereich der Kurve konnte der *CT-Wert* ermittelt werden. Es wurde eine relative Quantifizierung der Daten mithilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode vorgenommen: Dabei wurde der *CT-Wert* des Referenzgens (*house-keeping gene*) vom *CT-Wert* des Zielgens abgezogen, sodass man den sogenannten ΔCT -Wert erhielt. Als Referenzgen wurde hier das *house-keeping gene S-18* verwendet. Im nächsten Schritt wurde vom ΔCT -Wert der behandelten Probe der ΔCT -Wert der unbehandelten Probe (=Kontrolle) abgezogen, sodass man den $\Delta\Delta CT$ -Wert erhielt. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (*Ratio*), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergab sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ [147].

2.9 Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplung unter Einfluss von Bestrahlung

Populationsverdopplung beschreibt die Zahl der Zellteilungen, die statistisch jede Zelle innerhalb einer Passage durchläuft. Die kumulative Populationsverdopplung gibt die Summe aller Populationsverdopplungen seit der Primärkultur an. In diesem Versuch sollte untersucht werden, inwiefern sich eine langfristige Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm auf diese Größen auswirkt. Um dies herauszufinden, wurden je Spender 250.000 Zellen in je 2 Petrischalen ausgesät. Die eine Petrischale wurde täglich wie oben in 2.3.6 beschrieben mit 60 J/cm² blauem Licht bestrahlt, die andere diente als Kontrolle. Sobald die Zellen in den Petrischalen konfluent gewachsen waren, wurden sie wie in 2.3.3 erläutert geerntet und gezählt. Die ermittelte Menge an Zellen und die Dauer bis zum Erreichen des Konfluenzniveaus wurden festgehalten. Jeweils 250.000 Zellen wurden erneut in je 2 Petrischalen ausgesät und wie oben beschrieben behandelt.

3 Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Seneszenzinduktion unter Bestrahlung mittels β -Galaktosidase Assay

In diesem Experiment wurde mit Hilfe eines β -Galaktosidase Assays der Einfluss von Bestrahlung von Fibroblasten zum einem mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm, zum anderen mit UVA-Licht auf die Induktion von Seneszenz untersucht. Durchgeführt wurde der Assay mit Hilfe des *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* der Firma *Cell Signaling*. Durch den Assay wurden seneszente Zellen gefärbt. Dies wurde mit Hilfe eines Fotomikroskops für die spätere Auswertung festgehalten. Abb. 9, Abb. 10 und Abb. 11 zeigen exemplarisch einige der für die Auswertung entstandenen Fotos. In diesen gezeigten Fotografien wurden die in der Versuchsreihe blau angefärbten Strukturen, welche der angefärbten β -Galactosidase entsprechen, zu Anschauungszwecken durch Bildbearbeitung hervorgehoben.

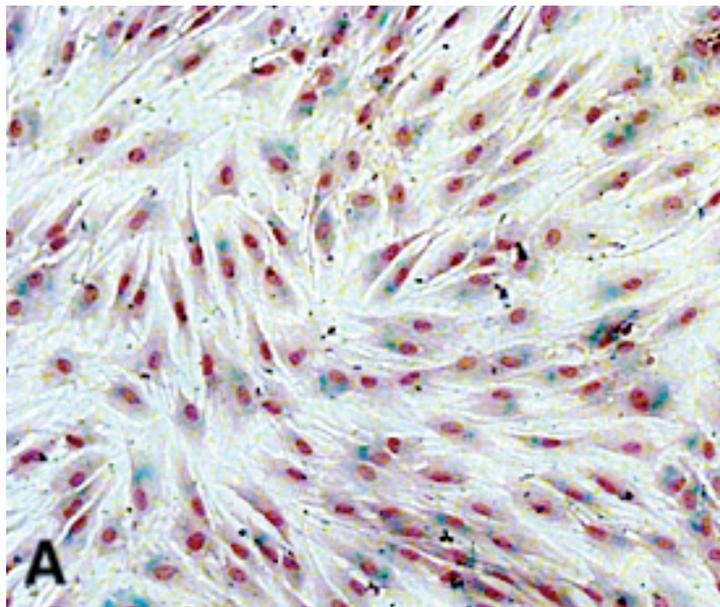


Abb. 9. **Bearbeitete Fotografie β -Galaktosidase-Assay Negativkontrolle**

Bearbeitete Fotografie mittels Fotomikroskop von Fibroblasten nach Behandlung mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* der Firma *Cell Signaling* und einer anschließenden Färbung mittels *HE*. Angefertigt wurde das Foto nach 15-tägiger Behandlung, zu sehen ist die Zellreihe, die als Negativkontrolle dient.

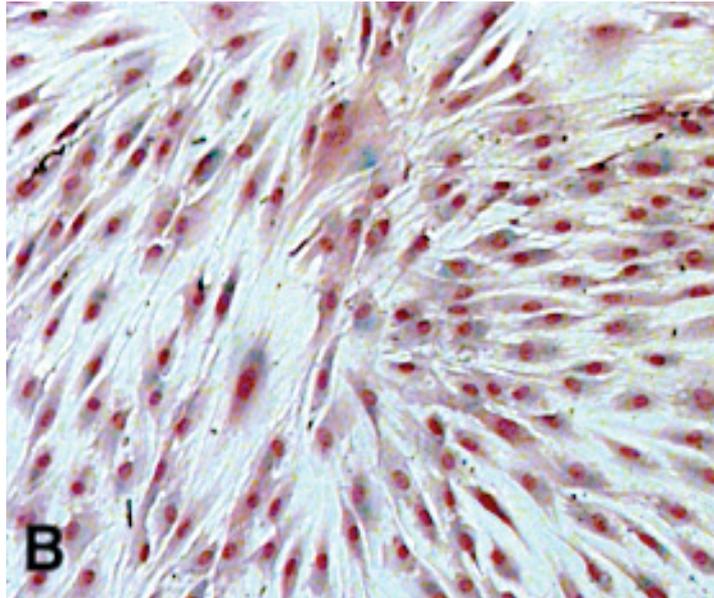


Abb. 10. Bearbeitete Fotografie β -Galactosidase-Assay blau bestrahlt

Bearbeitete Fotografie mittels Fotomikroskop von Fibroblasten nach Behandlung mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* der Firma *Cell Signaling* und einer anschließenden Färbung mittels *HE*. Angefertigt wurde das Foto nach 15-tägiger Behandlung, zu sehen ist die Zellreihe, die täglich mit 60 J/cm^2 blauem Licht bestrahlt wurde.

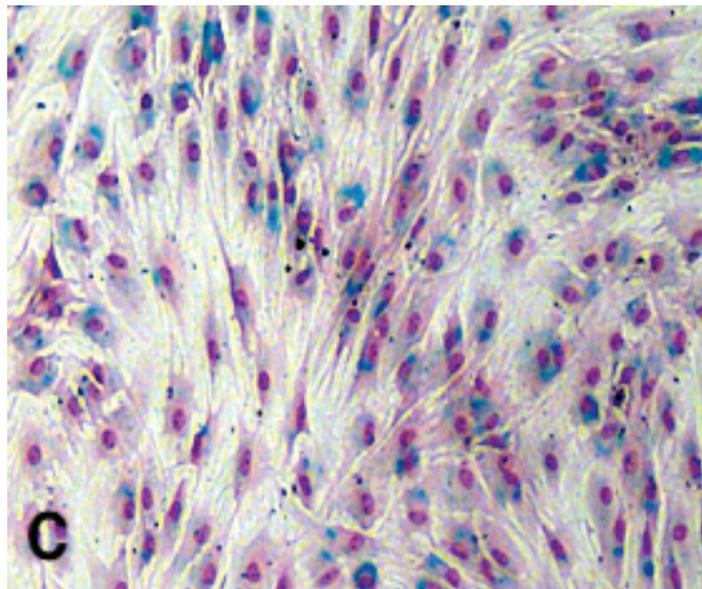


Abb. 11. Bearbeitete Fotografie β -Galactosidase-Assay UV bestrahlt

Bearbeitete Fotografie mittels Fotomikroskop von Fibroblasten nach Behandlung mit dem *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* der Firma *Cell Signaling* und einer anschließenden Färbung mittels *HE*. Angefertigt wurde das Foto nach 15-tägiger Behandlung, zu sehen ist die Zellreihe, die täglich mit $7,5 \text{ J/cm}^2$ UVA-Licht als Positivkontrolle bestrahlt wurde.

Auf den Fotos zu sehen sind Fibroblasten, die mittels *HE* und *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* gefärbt wurden, die zuvor verschieden behandelt worden sind. Die in den Zellen zu sehende türkisblauen Färbungen sind das Ergebnis der *Senescence β -Galactosidase* Färbung und wurden laut Kit-Protokoll so interpretiert, dass diese Zellen als in Seneszenz befindlich zu definieren sind. Bereits auf den beispielhaften Fotos ist zu erkennen, dass bei den Zellen, welche mit UVA-Licht bestrahlt worden sind, deutlich die meisten seneszenten Zellen zu sehen waren und bei den Zellen, welche mit blauem

Licht bestrahlt worden sind, deutlich am wenigsten zu sehen waren. Zur genauen quantitativen Auswertung wurden für jede verschiedene Behandlungsmethode von jedem Spender drei repräsentative Fotos angefertigt. In den folgenden Abbildungen (Abb. 12, Abb. 13) wurden die Ergebnisse der Auswertung zusammengetragen.

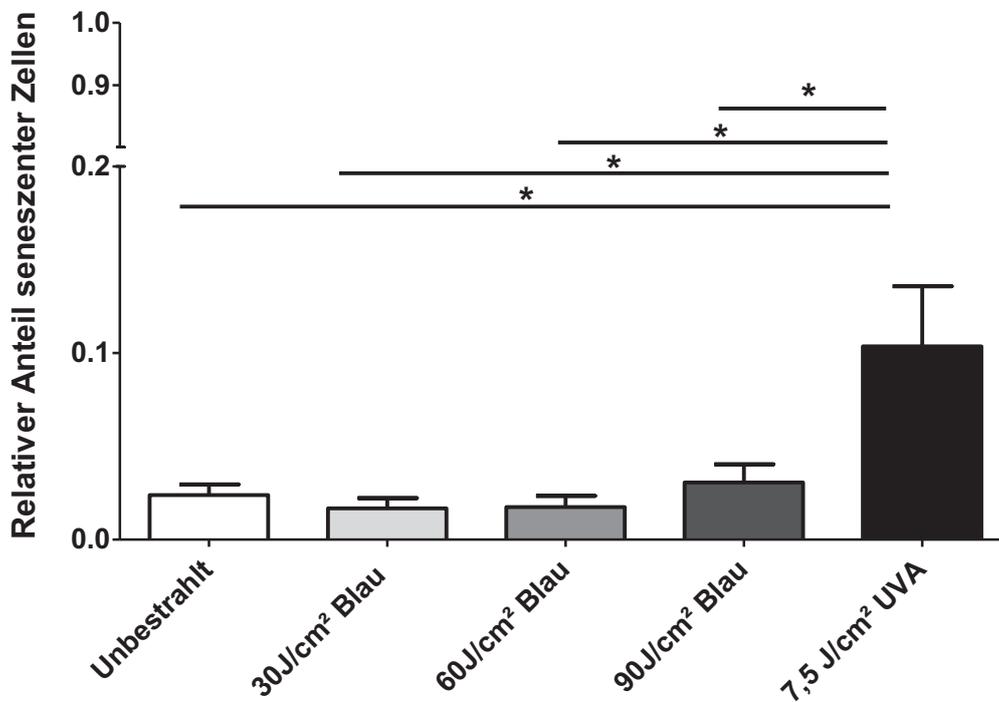


Abb. 12. Auswertung β -Galactosidase-Assay nach 5 Tagen

Vergleich des Relativen Anteils seneszenten Zellen in Abhängigkeit verschiedener Bestrahlungsmethoden nach 5 Behandlungstagen, n=6, *=Signifikant zum Niveau $p<0,05$

Das Ergebnis des β -Galaktosidase Assays nach 5 Behandlungstagen (Abb. 12) zeigte, dass es bei allen verschiedenen Behandlungsmethoden einen gewissen Anteil von seneszenten Zellen gab. Den größten Anteil an seneszenten Zellen fand man bei den Zellen, welche über 5 Tage täglich mit UVA-Licht bestrahlt wurden, er lag bei circa 10 %, wohingegen durch die anderen Behandlungsmethoden nur ein relativer Anteil von circa 1,5 % - 3 % seneszenten Zellen ermittelt wurde. Die statistische Auswertung ergab, dass der relative Anteil seneszenten Zellen durch die Behandlung mit UVA-Bestrahlung über 5 Tage zum Niveau von $p<0,05$ signifikant höher war gegenüber allen anderen Behandlungsmethoden.

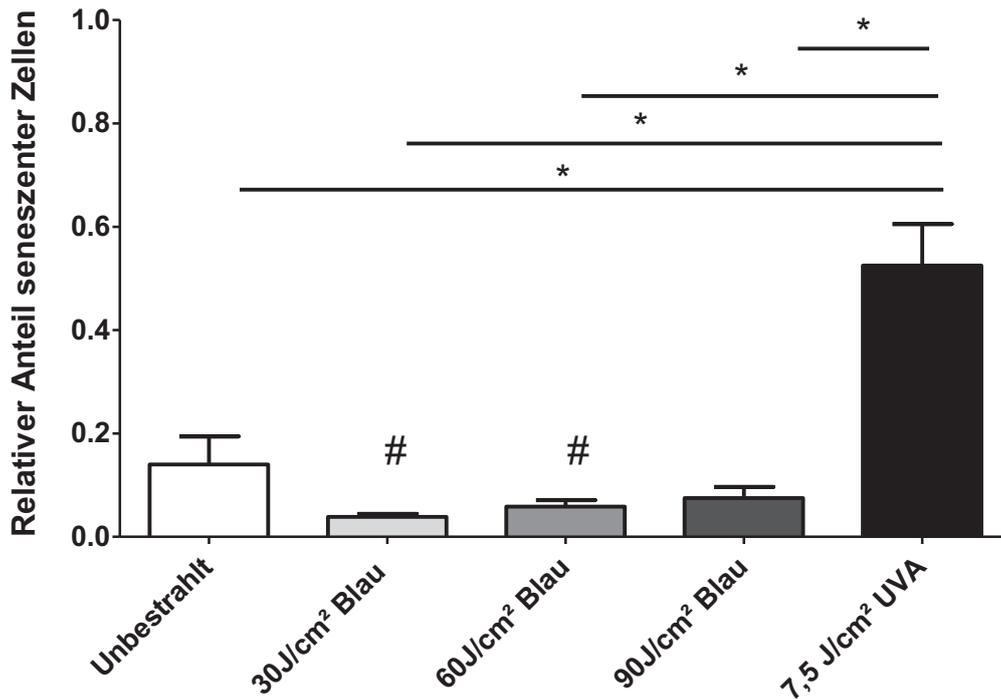


Abb. 13. **Auswertung β -Galactosidase-Assay nach 15 Tagen**

Vergleich des relativen Anteils seneszenten Zellen in Abhängigkeit verschiedener Bestrahlungsmethoden nach 15 Behandlungstagen, n=6, *=Signifikant zum Niveau $p < 0,05$, # = Signifikant zum Niveau $p < 0,05$ gegenüber der unbestrahlten Kontrolle

Das Ergebnis des β -Galaktosidase Assays nach 15 Behandlungstagen (Abb. 13) zeigte, dass es bei allen verschiedenen Behandlungsmethoden zu einer Zunahme des relativen Anteils von seneszenten Zellen gegenüber der Analyse nach Tag 5 kam. Den größten relativen Anteil an seneszenten Zellen wies erneut die Gruppe Zellen auf, die mit UVA-Licht bestrahlt wurden, er liegt hier bei circa 52 %. Dieser Anteil war wiederum in der statistischen Auswertung signifikant zum Niveau $p < 0,05$ erhöht gegenüber den anderen Behandlungsgruppen. Die Zellen, welche als unbestrahlte Kontrolle fungierten, zeigten gegenüber den Zellen, die mit verschiedenen Dosen blauem Licht bestrahlt wurden, einen deutlich stärkeren Anstieg des relativen Anteils an seneszenten Zellen im Vergleich zur Analyse nach 5 Tagen. Hier ergab sich in der statistischen Auswertung ebenfalls ein signifikanter Unterschied zum Niveau $p < 0,05$ im Vergleich der Zellen, welche mit 30 J/cm² und 60 J/cm² blauem Licht bestrahlt wurden, mit den Zellen, die als Kontrolle genutzt wurden.

In einem vorher durchgeführten Vorversuch sollte gezeigt werden, dass das blaue Licht direkt nicht Einfluss auf das Enzym β -Galaktosidase nimmt, wodurch es zu einer Verzerrung der Versuchsergebnisse hätte kommen können. Die Ergebnisse des Versuches sind in Abb. 14 dargestellt:

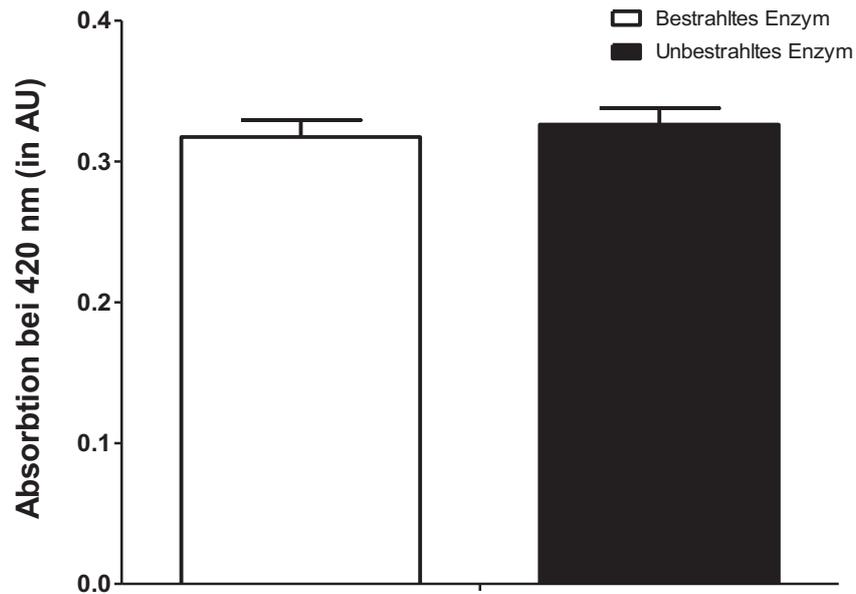


Abb. 14. **Auswertung Bestrahlung des rekombinanten Enzyms**

Vergleich der Absorbtion des durch β -Galaktosidase umgewandelten Substrates *2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid* bei 420 nm in Abhängigkeit einer vorherigen Bestrahlung des Enzyms mit 60 J/cm^2 blauem Licht. n=3

Die Bestrahlung des rekombinanten Enzyms ergab, dass eine Bestrahlung des Enzyms mit blauem Licht keine erkennbaren Einflüsse auf die Aktivität des Enzyms hatte und man somit nicht davon ausgehen musste, dass es zu einer Verzerrung der Versuchsergebnisse durch eine direkte Interaktion des blauen Lichts mit dem Enzym kam.

3.2 Bestimmung der *Catalase*, *Superoxiddismutase-1* und *Superoxiddismutase-2* Expression unter Einfluss unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und -dauer mittels *Western Blot*-Analyse

In dieser Versuchsreihe wurden Zellen mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm oder mit UVA-Licht über unterschiedliche Zeiträume bestrahlt. Anschließend wurde mit Hilfe von *Western Blot* Analysen die Expression der *Catalase*, der *SOD 1* und der *SOD 2* in den Zellen im Vergleich zur Kontrolle untersucht, um festzustellen, wie die Zellen auf die Belastung durch *ROS* bedingt durch die Bestrahlungen reagierten. Zur Normierung der Ergebnisse wurde auch die Expression des *House-Keeping-Proteins GAPDH* mitbestimmt. In der folgenden Abbildung (Abb. 15) sieht man exemplarisch die Ergebnisse der durchgeführten Westernblots für einen Spender.

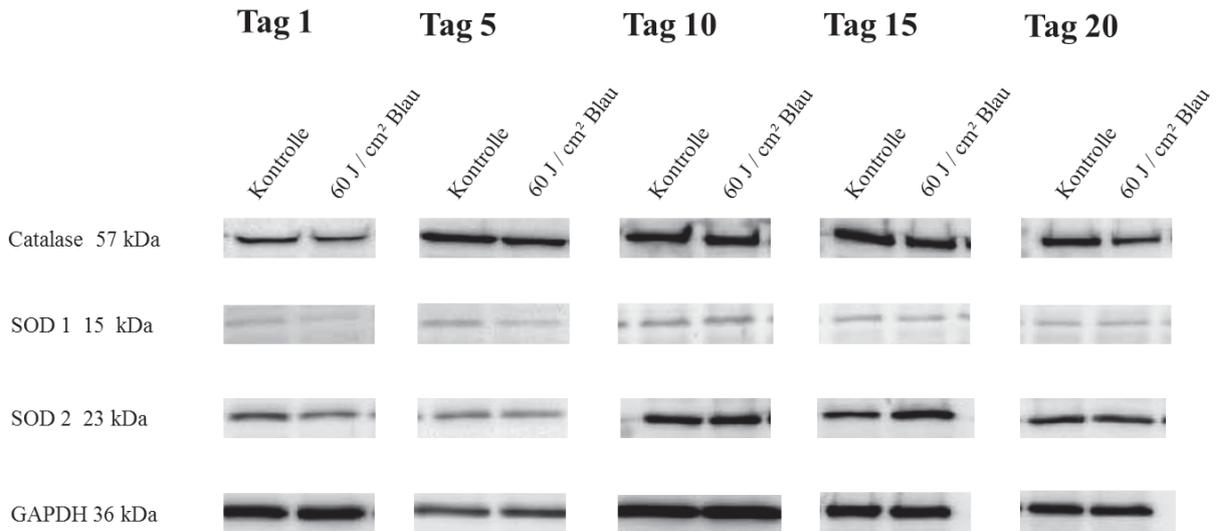


Abb. 15. **Fotographie Westernblot Membranen**

Ausschnitte von Fotos der Membranen, die bei den Westernblots erzeugt wurden. Zu sehen sind die Blots eines Spenders, die nach 1, 5, 10, 15 und 20 Versuchstagen angefertigt wurden und mit Antikörpern gegen *Catalase*, *SOD 1*, *SOD 2* und *GAPDH* inkubiert wurden.

Basierend auf den Fotos, die von den inkubierten Membranen angefertigt wurden, wurde die Expression der Proteine ausgewertet und auf *GAPDH* normiert. Die daraus entstandenen Ergebnisse wurden in den folgenden Abbildungen (Abb. 16, Abb. 17 und Abb. 18) dargestellt.

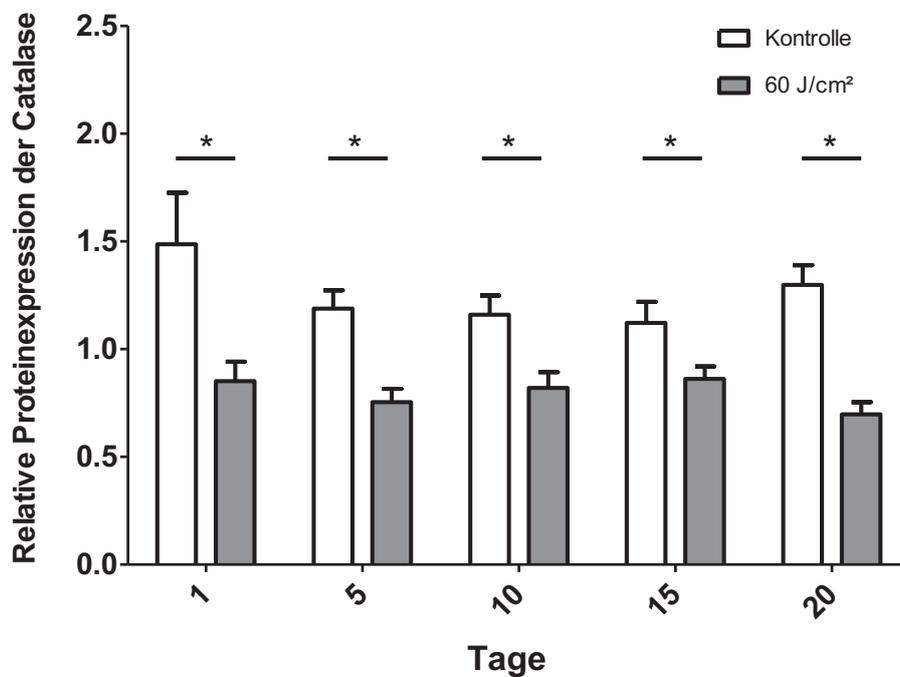


Abb. 16. **Auswertung Westernblots Catalase-Expression**

Analyse der relativen Proteinexpression von *Catalase* mittels *Western Blot* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm² blauem Licht über 1, 5, 10, 15 und 20 Tage. Verglichen wurden die Ergebnisse mit unbestrahlten Kontrollen. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte auf die Expression des *House-Keeping-Proteins GAPDH*. n=8. *=Signifikant zum Niveau p<0,05

In Abb. 16 ist die relative Proteinexpression von *Catalase* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht über verschiedene Zeiträume dargestellt. Es zeigte sich, dass unabhängig von der Dauer der Bestrahlung es zu einem signifikanten Abfall der relativen Menge an *Catalase* in Zellen kam, welche mit 60 J/cm^2 bestrahlt wurden. Die Differenz der relativen Proteinexpression war nach einer einmaligen Bestrahlung und einer Analyse nach einem Tag am größten. Nach 5 Tagen Bestrahlung nahm diese Differenz ab, war allerdings immer noch signifikant. Die Ergebnisse nach 10 und 15 Tagen waren annähernd identisch mit denen nach 5 Tagen. Bei der Analyse nach einer Bestrahlung über 20 Tage kam es zu einer erneuten Zunahme der Differenz der relativen Proteinexpression von *Catalase* in Kontrollzellen im Vergleich mit bestrahlten Zellen, welche allerdings noch nicht das Ausmaß erreichte, dass nach einer einmaligen Bestrahlung ermittelt werden konnte.

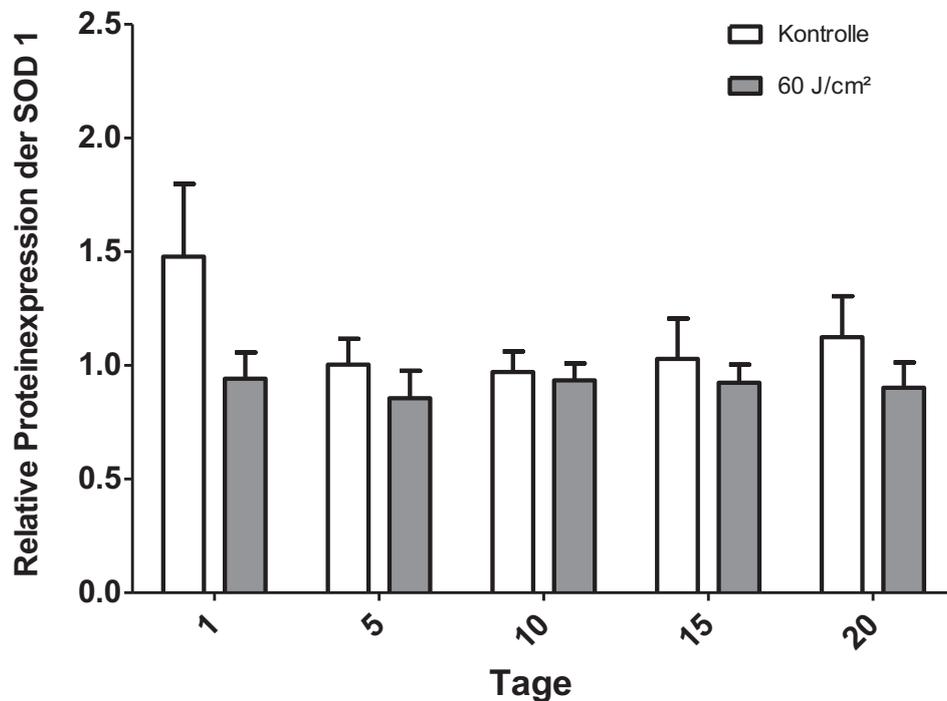


Abb. 17. **Auswertung Western Blots *SOD 1*-Expression**

Analyse der relativen Proteinexpression von *Catalase* mittels *Western Blot* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm^2 blauem Licht über 1, 5, 10, 15 und 20 Tage. Verglichen wurden die Ergebnisse mit unbestrahlten Kontrollen. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte auf die Expression des *House-Keeping-Proteins GAPDH*. n=8

In Abb. 17 ist die relative Proteinexpression von *SOD 1* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht über verschiedene Zeiträume dargestellt. Unabhängig von der Dauer der Bestrahlung konnten keine signifikanten Unterschiede in der relativen Proteinexpression von *SOD 1* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht analysiert werden. Allerdings zeigte sich der Verlauf der Differenz der Proteinexpression zwischen Kontrollzellen und bestrahlten Zellen über die Zeit ähnlich wie bei der Analyse der relativen Proteinexpression der *Catalase* in Abb. 16. Auch bei der Ermittlung der relativen Proteinexpression von *SOD 1* nach einem Tag Bestrahlung sah man, dass relativ weniger *SOD 1* Expression in bestrahlten Zellen festgestellt werden konnte. Die Differenz zwischen unbestrahlten und

bestrahlten Zellen nahm nach 5 Tagen Behandlung klar ab und blieb bis zu Behandlungstag 15 annähernd konstant, um an Behandlungstag 20 wieder leicht zuzunehmen, wobei allerdings wie oben bereits erwähnt nie signifikante Unterschiede festgestellt werden konnten.

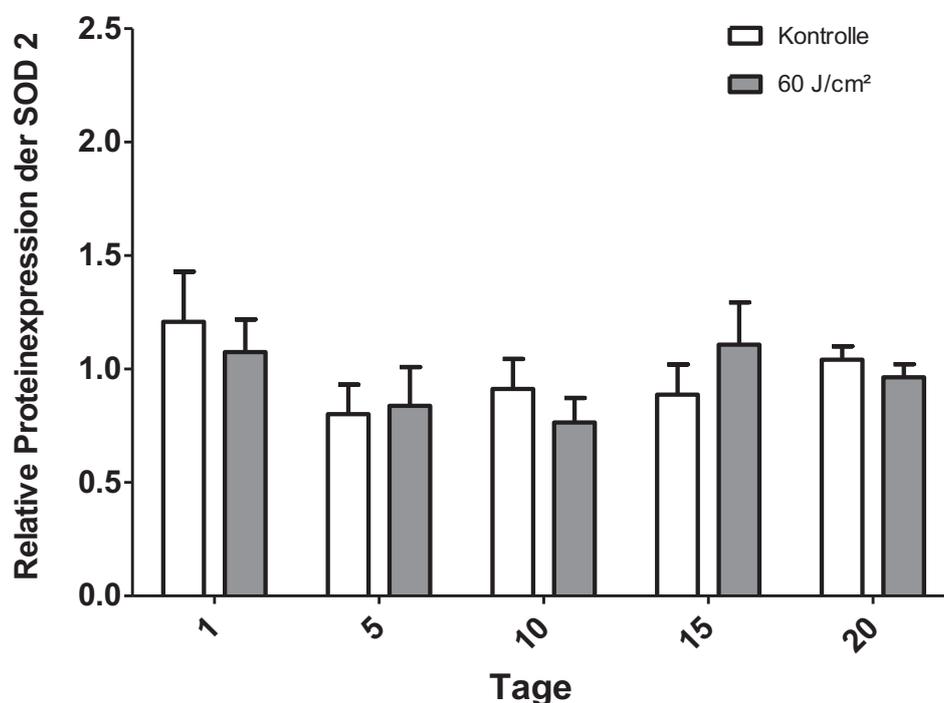


Abb. 18. **Auswertung *Western Blots* SOD 2-Expression**

Analyse der relativen Proteinexpression von *SOD 2* mittels *Western Blot* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm² blauem Licht über 1, 5, 10, 15 und 20 Tage. Verglichen wurden die Ergebnisse mit unbestrahlten Kontrollen. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte auf die Expression des *House-Keeping-Proteins GAPDH*. n=8

In Abb. 18 ist die relative Proteinexpression von *SOD 2* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht über verschiedene Zeiträume dargestellt. Unabhängig von der Dauer der Bestrahlung konnten keine signifikanten Unterschiede in der relativen Proteinexpression von *SOD 2* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht analysiert werden. Anders als bei der Analyse der relativen Proteinexpression von *Catalase* oder *SOD 1* konnte bei der Analyse der Proteinexpression von *SOD 2* keine Differenz in der Proteinexpression festgestellt werden, welche über den gesamten Behandlungszeitraum in die gleiche Richtung wies. Nach einer einmaligen Bestrahlung zeigte sich erneut eine eher geringere relative Expression an *SOD 2* in den bestrahlten Zellen. Nach 5 Tagen Behandlung lag die relative Expression in den bestrahlten Zellen allerdings etwas über der in den unbestrahlten Zellen. Das Gleiche konnte man bei der Analyse nach 15 Behandlungstagen feststellen, wohingegen sich bei der Analyse nach 10 und 20 Behandlungstagen erneut die Tendenz zeigte, dass die relative Proteinexpression in den bestrahlten Zellen unter derer in den Kontrollzellen liegt.

3.3 Bestimmung der Genexpression für *Catalase*, *Superoxiddismutase-1* und *Superoxiddismutase-2* Expression unter Einfluss unterschiedlichen Bestrahlungsdosen und -dauer mittels *Real-Time PCR*

Dieser Versuch schloss sich an die Analysen mittels *Western-Blot* (3.2) an, um herauszufinden, ob die Veränderungen der Menge an Proteinen auf Vorgängen basierte, die bereits auf Ebene der Genexpression stattfanden, oder erst im späteren Verlauf. Dafür wurden Fibroblasten mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm bestrahlt und nach den vorher festgelegten Zeitpunkten von einem Tag, fünf Tagen und zehn Tagen geerntet und eine Analyse mittels *PCR* durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den folgenden Abbildungen (Abb. 19, Abb. 20 und Abb. 21) dargestellt.

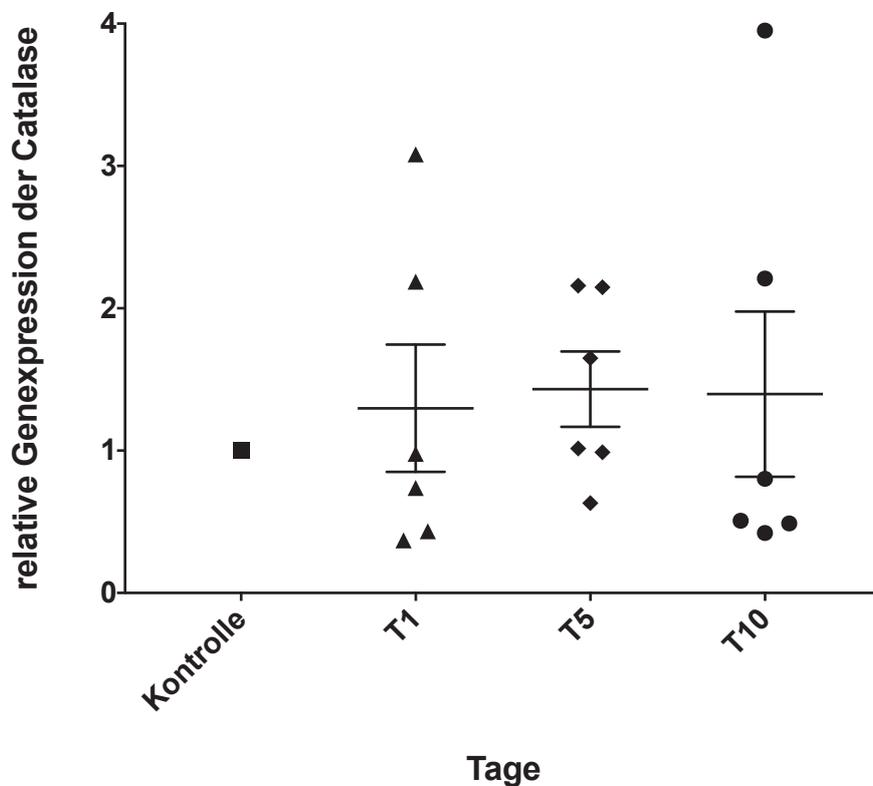


Abb. 19. Auswertung *rt-PCR Catalase*

Analyse der relativen Genexpression von *Catalase* mittels *rt-PCR* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm² blauem Licht über 1, 5 und 10 Tage. Verglichen wurden die Ergebnisse mit unbestrahlten Kontrollen. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte auf die Genexpression des *House-Keeping-Gens 18-S*. n=6

In Abb. 19 ist die relative Genexpression von *Catalase* mittels *rt-PCR* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm² blauem Licht über verschiedene Zeiträume dargestellt. Die Ergebnisse wurden auf das *House-Keeping-Gen 18-S* normiert und die Ergebnisse der Kontrollzellen als 1 gesetzt. Es war zu erkennen, dass die Ergebnisse der *rt-PCR* nach 1, 5 und 10 Behandlungstagen immer eine erhöhte relative Expression der Gene für *Catalase* zeigten. Diese Erhöhung war unabhängig von der Behandlungsdauer relativ gleich, aufgrund einer relativ hohen Standardabweichung allerdings nicht signifikant gegenüber der Kontrollgruppe.

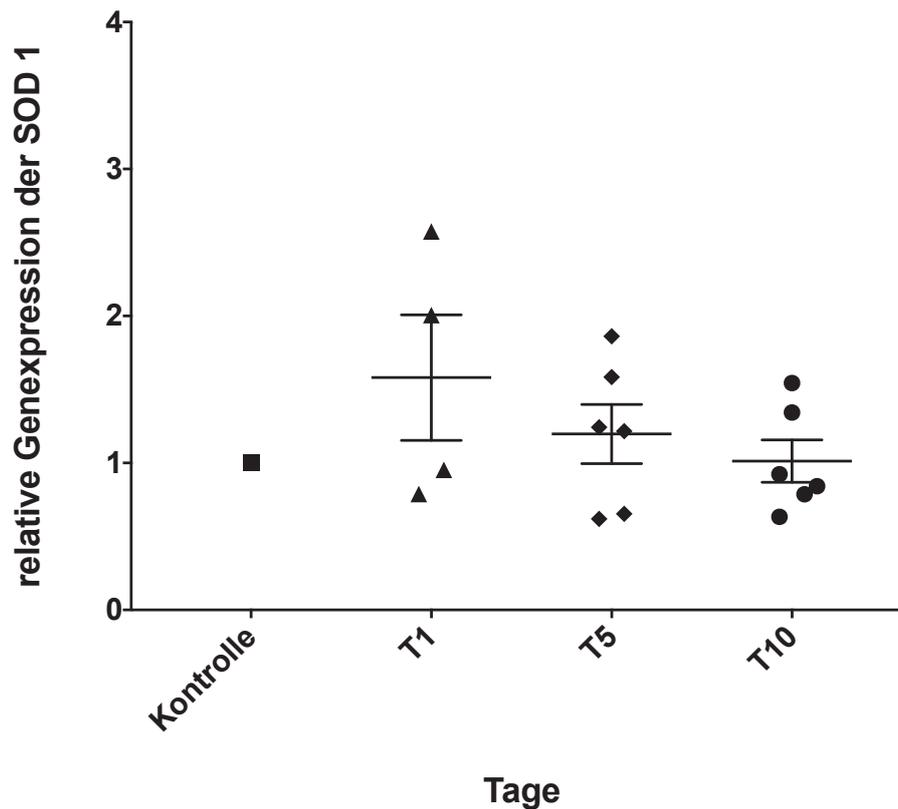


Abb. 20. **Auswertung *rt-PCR SOD 1***

Analyse der relativen Genexpression von *SOD 1* mittels *rt-PCR* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm^2 blauem Licht über 1, 5 und 10 Tage. Verglichen wurden die Ergebnisse mit unbestrahlten Kontrollen. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte auf die Genexpression des *House-Keeping-Gens 18-S*. $n=6$

In Abb. 20 ist die relative Genexpression von *SOD 1* mittels *rt-PCR* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm^2 blauem Licht über verschiedene Zeiträume dargestellt. Die Ergebnisse wurden ebenso wie bei der Analyse der relativen Genexpression der *Catalase* auf das *House-Keeping-Gen 18-S* normiert und die Ergebnisse der Kontrollzellen als 1 gesetzt. Es zeigte sich, dass die relative Genexpression von *SOD 1* in Zellen, welche einen Tag mit blauem Licht bestrahlt wurden gegenüber den Kontrollzellen erhöht war. Im zeitlichen Verlauf nahm die relative Genexpression bei der Analyse an Tag 5 und 10 wieder ab, so dass sie an Tag 10 wieder auf dem Niveau der Kontrollzellen lag. Es konnten zu keinem Analysezeitpunkt signifikante Unterschiede ermittelt werden.

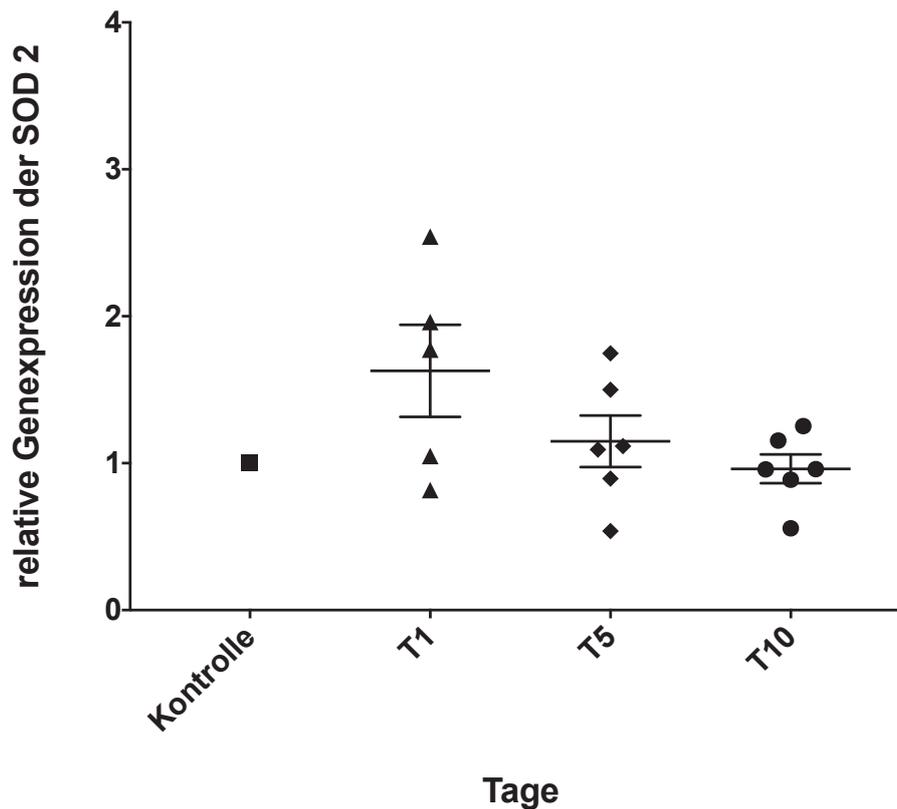


Abb. 21. **Auswertung *rt-PCR SOD 2***

Analyse der relativen Genexpression von *SOD 2* mittels *rt-PCR* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm² blauem Licht über 1, 5 und 10 Tage. Verglichen wurden die Ergebnisse mit unbestrahlten Kontrollen. Die Normierung der Ergebnisse erfolgte auf die Genexpression des *House-Keeping-Gens 18-S*. n=6

In Abb. 21 ist die relative Genexpression von *SOD 2* mittels *rt-PCR* in Abhängigkeit von Bestrahlung mit 60 J/cm² blauem Licht über verschiedene Zeiträume dargestellt. Die Ergebnisse wurden ebenso wie bei der Analyse der relativen Genexpression der *Catalase* und der *SOD 1* auf das *House-Keeping-Gen 18-S* normiert und die Ergebnisse der Kontrollzellen als 1 gesetzt. Es zeigte sich annähernd das gleiche Bild wie auch bei der Analyse der relativen Genexpression für die *SOD 1*. Bei der Analyse nach einem Tag Bestrahlung kam es zu einem deutlichen Anstieg der relativen Genexpression im Vergleich zur Kontrolle, welche über die Analyse an Tag 5 bis zu der an Tag 10 wieder auf das Niveau der Kontrollzellen abfiel. Auch bei der Analyse der relativen Genexpression der *SOD 2* konnte, genau wie bei der der *SOD 1*, keine Signifikanz in den Unterschieden festgestellt werden.

3.4 Bestimmung der Menge an oxidierten Proteinen unter Einfluss von Bestrahlung mittels *Dot-Blot*-Analyse

Um zu analysieren, welchen Einfluss die Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm auf die Entstehung von oxidierten Proteinen in Fibroblasten hat, wurde die Menge dieser Proteine unter Verwendung des *OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit* von Millipore mittels *Dot-Blot*-Analyse zum einen in unbehandelten Kontrollzellen, zum anderen in Zellen, die über 15 Tage täglich mit 60 J/cm² blauem Licht bestrahlt wurden, gemessen. In der folgenden Abbildung Abb. 22 sieht man exemplarisch die Ergebnisse der durchgeführten *Dot-Blots*.

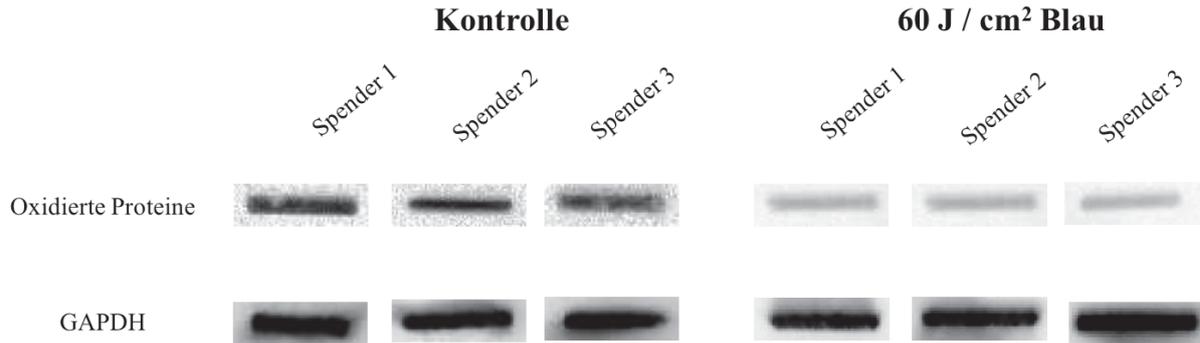


Abb. 22. **Fotografie *Dot- Blot* Membranen**

Ausschnitte von Fotos der Membranen, die bei den *Dot-Blots* erzeugt wurden. Zu sehen sind die Blots von 3 Spendern, die nach 15 Versuchstagen angefertigt wurden und mit Antikörpern gegen oxidierte Proteine und *GAPDH* inkubiert wurden.

Basierend auf den Fotos, die von den inkubierten Membranen angefertigt wurden, wurde die relative Menge an oxidierten Proteinen ausgewertet und auf *GAPDH* normiert.

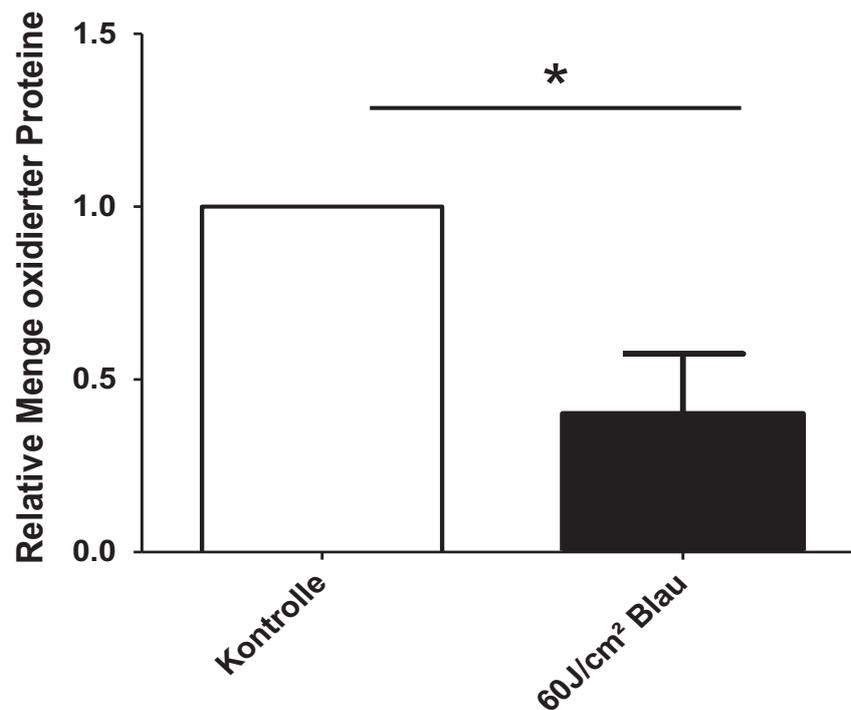


Abb. 23. **Auswertung *Dot-Blot* oxidierte Proteine**

Vergleich der relativen Menge oxidiertes Proteine in Fibroblasten in einer Kontrollreihe mit über 15 Tagen täglich mit blauem Licht bestrahlten Zellen, n=6, *=Signifikant zum Niveau $p < 0,05$

In Abb. 23 ist das Ergebnis des Versuches dargestellt. Die Werte, die für die Menge an oxidierten Proteinen in den Zellen der Kontrollreihe ermittelt wurden, wurden als 1 gesetzt. Es war deutlich zu erkennen, dass in Zellen, welche über 15 Tage täglich mit 60 J/cm² blauem Licht bestrahlt wurden, die relative Menge an oxidierten Proteinen nur circa 40 % des Anteils an oxidierten Proteinen entsprach, welcher in den Kontrollzellen gemessen wurde. Dieser ermittelte Unterschied in der Menge an oxidierten Proteinen in den bestrahlten Zellen war zum Niveau $p < 0,05$ signifikant.

3.5 Analyse der Entstehung von ROS in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht

Um nachzuweisen, inwiefern die Bestrahlung von Fibroblasten mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm zu einer Veränderung der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies in diesen Zellen führt, wurden diese zweimal mit blauem Licht bestrahlt und es wurden jeweils vor und nach der Bestrahlung die Menge an ROS in den Zellen mittels photometrischer Messung unter Verwendung des Farbstoffes *DHR* gemessen und auf die Ergebnisse von zu den gleichen Zeitpunkten durchgeführten *CellTiter-Blue* Messungen normiert. In der folgenden Abbildung (Abb. 24) sind die Ergebnisse dieser Versuchsreihe dargestellt.

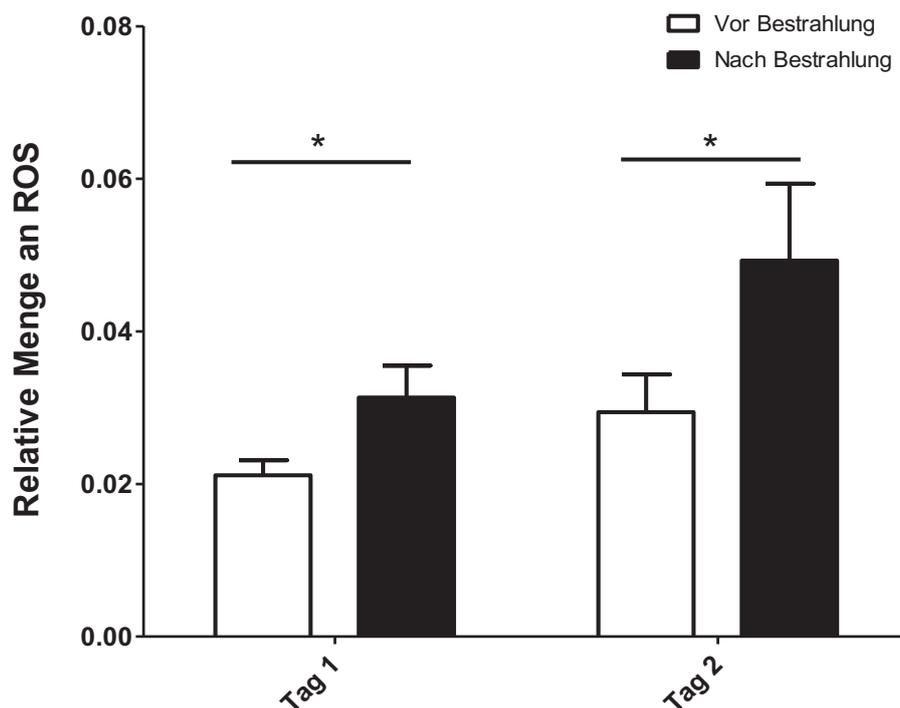


Abb. 24. **Auswertung ROS-Messung**

Vergleich der relativen Menge an ROS in Fibroblasten vor und nach einer beziehungsweise zwei Bestrahlungen mit blauem Licht der Wellenlänge 453nm, n=6, *=Signifikant zum Niveau $p < 0,05$

In Abb. 24 ist dargestellt, welche Menge an ROS in den Fibroblasten vor und nach einer Bestrahlung mit blauem Licht gemessen werden konnte. Es konnte festgestellt werden, dass es nach einer einmaligen Bestrahlung mit blauem Licht zu einer signifikanten Erhöhung der relativen Menge an reaktiven Sauerstoffspezies in den Fibroblasten um ca. 50 % kam. Diese Menge fiel über Nacht bis zur nächsten Messung an Tag 2 minimal, allerdings nicht signifikant ab. Eine erneute Bestrahlung an diesem Tag mit blauem Licht führte erneut zu einer signifikanten Erhöhung der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies um ca. 40 % in den bestrahlten Zellen.

3.6 Analyse der kumulativen Populationsverdopplungszeiten in Abhängigkeit von Bestrahlung mit blauem Licht

Mit diesen Versuchen sollte ermittelt werden, ob eine über viele Tage andauernde Bestrahlung mit blauem Licht der Wellenlänge 453 nm einen Einfluss auf das Populationsverdopplungsverhalten und somit auf das Zellteilungsverhalten von Fibroblasten hat. Dafür wurden Fibroblasten einer definierten Menge ausgesät und täglich mit 60 J/cm^2 blauem Licht der Wellenlänge 453 nm bestrahlt, eine Reihe an Zellen zur Kontrolle wurde parallel mitgeführt. Waren die Zellen konfluent gewachsen, wurden sie geerntet und gezählt und wiederum die zuvor definierte Menge von diesen Zellen neu ausgesät. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 25) sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt.

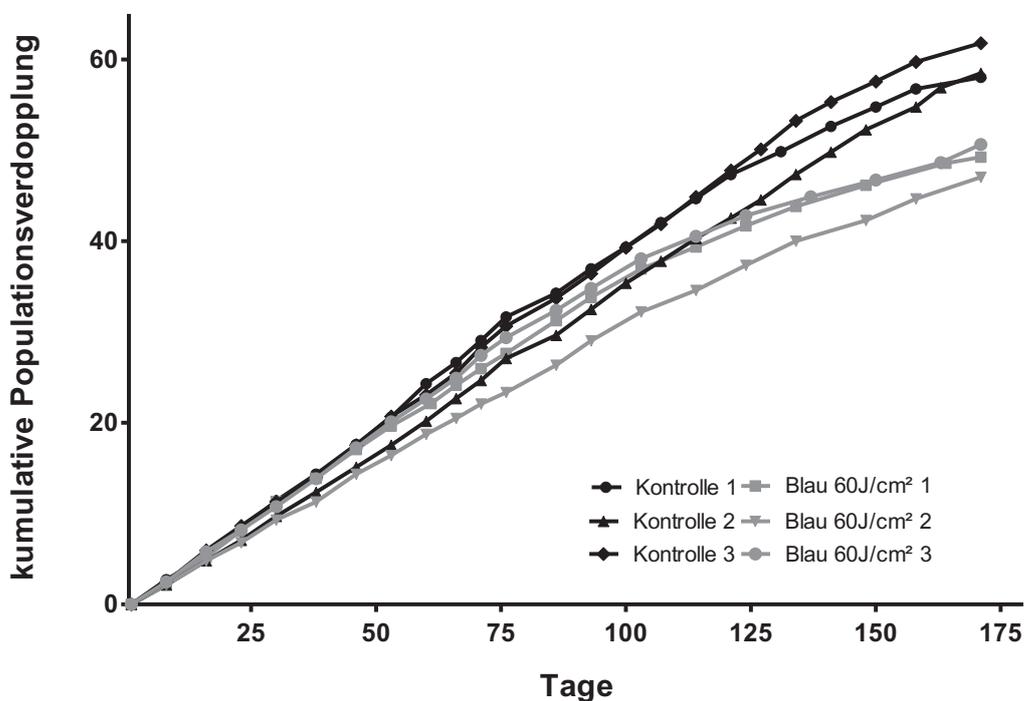


Abb. 25. **Auswertung kumulative Populationsverdopplung**

Darstellung der kumulativen Populationsverdopplung von Fibroblasten in Abhängigkeit von täglicher Bestrahlung mit 60 J/cm^2 blauem Licht. $n=3$

In Abb. 25 sieht man die anfangs relativ lineare Zunahme der Populationsverdopplungszeit der Fibroblasten, unabhängig davon, ob sie täglich mit 60 J/cm^2 blauen Licht bestrahlt wurden oder nicht. Im zeitlichen Verlauf kam es allerdings dazu, dass die Kurven, welche die kumulative Populationsverdopplung der bestrahlten Zellen darstellen, zu einem früheren Zeitpunkt und deutlicher abflachen als die Kurven, welche die kumulative Populationsverdopplung der Kontrollzellen zeigten. Es ergab sich nach einer Beobachtungszeit von 170 Tagen ein Mittelwert für die kumulativen Populationsverdopplungen der unbestrahlten Kontrolle von 59,42 wohingegen der Mittelwert bei den bestrahlten Zellen bei 48,98 lag, dieser Unterschied zwischen den Mittelwerten war zum Niveau $p < 0,01$ signifikant.

4 Diskussion

Die Haut ist das größte Organ des Menschen, sie hat viele wichtige Funktionen, wie den Schutz vor Umweltfaktoren, Regulation des Wasser- und Temperatúraushaltes oder auch als Sinnesorgan. Sie besteht aus mehreren Schichten, der Epidermis, der Dermis sowie der Subcutis, welche sich jeweils noch weiter aufgliedern lassen. Eine zentrale Zellpopulation der Haut sind Fibroblasten, welche sich quasi in allen Schichten der Haut finden und den Hauptzelltyp im Bindegewebe darstellen. Eine der wichtigsten Aufgaben, die Fibroblasten erfüllen, ist die Synthese fast aller Komponenten der extrazellulären Matrix von Bindegewebe, wie zum Beispiel die Kollagenfasersynthese. [1-3, 5]

Einer der größten Umweltfaktoren, welcher auf die Haut und somit auch auf Fibroblasten wirkt, ist Licht. Licht ist, wie oben gezeigt (siehe Abb. 2), aus vielen verschiedenen Wellenlängen zusammengesetzt [106]. Es hat neben physiologisch wichtigen Funktionen, wie zum Beispiel im Rahmen der Vitamin D Synthese [1], auch schädigende Einflüsse auf den Körper. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass UVA Licht deutlich zur Zellalterung beiträgt [143]. Ähnliche Effekte auf die Hautalterung konnten zum Beispiel auch für Licht aus dem infraroten Spektrum gezeigt werden [30]. Spricht man von Alterungsprozessen der Haut, so muss man die intrinsische Hautalterung von der extrinsischen Hautalterung differenzieren, wobei letztere hauptsächlich durch den Einfluss von Licht bedingt ist und daher teilweise auch als *photoaging* bezeichnet wird [7]. Ein wichtiges Konzept im Rahmen von zellulärer Alterung und somit letztendlich auch im Rahmen von Hautalterung ist die Seneszenz. Unter dem Begriff Seneszenz versteht man das Konzept, dass 1961 von Hayflick erstbeschrieben wurde, dass Zellen nicht die Möglichkeit besitzen sich unendlich zu teilen [45]. Man unterscheidet die *cellular senescence* auf der einen Seite von der *stress induced senescence* auf der anderen Seite. *Cellular senescence* basiert zum größten Teil auf einer Verkürzung der Telomeren der DNA der jeweiligen Zellen und der damit verbundenen Aktivierung von *DNA Damage response*-Prozessen, welche letzten Endes im Zellzyklusarrest münden [12, 46]. Neben den Telomerverkürzungen als Induktoren des Zellzyklusarrestes kann dieser auch durch direkte DNA- Schäden oder einer altersbedingten Hochregulation gewisser Proteine getriggert sein [49]. Im Status des Zellzyklusarrestes kann die Zelle entweder die ursächlichen Schäden reparieren, den Arrest aufrechterhalten oder in Apoptose übergehen [47]. Das Phänomen der *stress induced senescence* wird bei Zellen beobachtet, welche sich in Zellkultur befinden und tritt früher auf als die *cellular senescence*. Sie ist assoziiert, beziehungsweise begründet durch Stress, wie zum Beispiel dem Fehlen von Wachstumsfaktoren, dem die Zellen während der *in vitro* Kultivierung ausgesetzt sein können [50, 51]. Seneszenten Zellen sind durch typische Merkmale gekennzeichnet. Zum einen haben alle sich in Seneszenz befindenden Zellen einen langfristigen Zellzyklusarrest gemeinsam [50]. Außerdem gibt es typische morphologische Veränderungen, so präsentieren sich zum Beispiel Zellen, welche aufgrund von DNA- Schäden in Seneszenz gehen, relativ flach und groß, sowie reich an Nukleolen [55]. Weiterhin typisch ist eine Akkumulation von Proteinen, die im Zusammenhang mit dem Zellzyklusarrest stehen, wie zum Beispiel *p53* und *p16^{INK4A}* [56], oder auch eine Erhöhung der Spiegel an seneszenzassoziiierter *β-Galaktosidase*

in den Zellen [57]. Des Weiteren weisen seneszente Zellen auch bestimmte Sekretionsmuster, die sogenannten *senescence associated secretory phenotypes* [60, 61], und eine Hochregulation der Autophagie auf [65].

Ein sehr wichtiger Induktionsfaktor für Alterungsprozesse der Haut und somit auch für Seneszenz, welche zudem auch lichtassoziiert ist, sind reaktive Sauerstoffspezies [34]. Als *ROS* bezeichnet man eine Gruppe von Sauerstoffverbindungen, die Sauerstoffradikale, stabile molekulare Oxidantien sowie angeregte Sauerstoffspezies umfasst [66]. *ROS* entstehen zum einen endogen im Rahmen von physiologischen Stoffwechselprozessen [68], als auch exogen durch den Einfluss von chemischen, biologischen oder physikalischen Umweltfaktoren. Licht ist einer der wichtigsten dieser physikalischen Umweltfaktoren. So ist bekannt, dass nicht nur Licht aus dem UV-Spektrum [77], sondern auch Licht anderer Wellenlängen, wie zum Beispiel sichtbares Licht [76], die exogen getriggerte *ROS* Produktion fördert. *ROS* können in menschlichen Zellen oxidativen Stress induzieren. Dieser kann zu einer oxidativen Schädigung von zellulären Komponenten [82] sowie zu einer Veränderung von zellulären Funktionen führen [83]. Besonders anfällige Strukturen auf oxidativen Stress sind Proteine, Lipide und DNA [84]. Als Reaktion auf diese schädigenden Einflüsse durch *ROS* haben Zellen eine Vielzahl an Abwehrmechanismen gegen diese entwickelt. Die Abwehr der *ROS*, beziehungsweise der schädigenden Folgen kann auf verschiedenen Wegen erfolgen, so kann zum Beispiel durch direkte Chelation mittels Metallen die Entstehung von *ROS* bei Stoffwechselprozessen verhindert werden [85] oder durch DNA-Reparaturenzyme entstandene Schäden der DNA behoben werden [96]. Eine der zentralsten Rollen in der Abwehr von *ROS* nehmen Antioxidantien ein. Bei Antioxidantien unterscheidet man zum einen niedermolekulare Proteine, welche durch die Übertragung von Elektronen Radikale abfangen [85] und zum anderen antioxidativ wirkende Enzyme, welche *ROS* abbauen. Die wichtigsten Vertreter dieser antioxidativen Enzyme sind *Superoxiddismutasen* [97], *Peroxidasen* [98] und *Catalasen* [99].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen die Effekte von blauem Licht mit der Wellenlänge 453 nm. Es gab schon mehrere Arbeiten, in denen die Wirkung von blauem Licht auf Haut sowie menschliche Zellen untersucht wurden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass blaues Licht der Wellenlänge 453 nm bei Bestrahlung nicht zu einer umgehenden Verringerung der Zellzahl führt und so keine direkte toxisch – letale Wirkung auf die Zellen hat [118, 119]. Auch konnte gezeigt werden, dass es durch blaues Licht nicht zu kurzzeitigen Zell-Defekten über DNA-Doppelstrangbrüche kommt [121]. Allerdings konnten bereits auch negative Effekte auf menschliche Zellen durch die Bestrahlung mit blauem Licht gezeigt werden. Zum Beispiel, dass es über eine Hemmung der Mitose bei langfristiger Bestrahlung die Proliferation gehemmt werden kann [121, 122]. Ebenso konnte gezeigt werden, dass es nach der Bestrahlung mit blauem Licht zu einer Steigerung der *ROS*-Spiegel in den Zellen zu einer nicht enzymatischen NO-Produktion, sowie auch zu Schäden an der mitochondrialen DNA kommen kann [119, 124]. In der Medizin findet blaues Licht bereits therapeutische Anwendung, zum Beispiel in der Therapie von moderater Akne [141] oder bei atopischer Dermatitis [142]. Auch in der Behandlung von Psoriasis ist blaues Licht mittlerweile eine etablierte, zuhause anwendbare und als sicher beschriebene

Alternative zu der gängigen Lichttherapie mit UVA-Licht [148]. Eine bekannte Nebenwirkung des therapeutischen Einsatzes von UVA-Licht ist die Induktion von Zellalterung sowie von Seneszenz in menschlichen Zellen [33, 107]. Obwohl blaues Licht somit schon regen Einsatz in der Therapie von Hauterkrankungen erfährt, ist es trotz seiner mit UVA-Licht vergleichbaren Effekte auf ROS-Induktion sowie auf mitochondriale DNA-Schäden [124] und seiner Wellenlänge, welche nah am Bereich des UV-Lichtes liegt, noch nicht auf seinen Einfluss auf Hautalterung und Seneszenz untersucht worden. In dieser Arbeit wurden nun die Effekte auf Seneszenzinduktion sowie seneszenzbegünstigende Faktoren beleuchtet.

Hierzu wurden in einer ersten Versuchsreihe Fibroblasten über mehrere Tage (5 bzw. 15) täglich mit verschiedenen Dosen (30 J/cm^2 , 60 J/cm^2 , 90 J/cm^2) blauen Lichts bestrahlt. Als Positivkontrolle wurden Fibroblasten gewählt, die ebenfalls über die gleiche Dauer täglich mit $7,5 \text{ J/cm}^2$ UVA-Licht bestrahlt wurden. Zur Negativkontrolle dienten Zellen, die ohne Bestrahlung über die Zeit kultiviert wurden. Als Marker für die Seneszenzinduktion durch die Bestrahlung wurde seneszenzassoziierte β -Galaktosidase gewählt, ein wie oben bereits erwähnter typischer Marker, welchen Zellen, die sich in Seneszenz befinden aufweisen [57]. Die genaue Funktion der seneszenzassoziierte β -Galaktosidase für die zelluläre Seneszenz ist aktuell noch unbekannt. Bekannt ist allerdings, dass es seinen Ursprung in den Lysosomen zu haben scheint und der Anstieg mit der Zunahme an Lysosomen in seneszenten Zellen assoziiert ist [58]. Zum Nachweis wurde ein KIT der Firma *Cell Signalling* verwendet. Die Auswertung nach 5 Tagen (siehe Abb. 12) ergab, dass bei den mit UVA-Licht bestrahlten Zellen in signifikant mehr Zellen die seneszenzassoziierte β -Galaktosidase nachweisbar war, als bei den Zellen der Kontrollgruppe oder bei den mit blauem Licht bestrahlten Zellen. Einen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Zellen der Kontrollgruppe, in denen vermehrt seneszenzassoziierte β -Galaktosidasen nachweisbar war, verglichen mit den mit verschiedenen Dosen blauen Lichts bestrahlten Zellen, gab es nicht. So ließen sich anhand dieses Versuches nach einer 5 tägigen Bestrahlung bereits die vorbeschriebenen Ergebnisse, dass UVA-Licht zu einem Anstieg der Expression der seneszenzassoziierte β -Galaktosidase führt, bestätigen. Dieses Ergebnis bezüglich der Bestrahlung mit UVA-Licht ließ sich ebenso durch die Auswertung nach 15 Bestrahlungstagen (siehe Abb. 13) bestätigen. Bei der Auswertung an Tag 15 zeigten sich aber auch zusätzlich signifikante Unterschiede bei dem Vergleich zwischen Kontrollgruppe und den mit blauem Licht bestrahlten Zellen. Diese Unterschiede äußerten sich darin, dass der Anteil an Zellen, in denen seneszenzassoziierte β -Galaktosidase nachweisbar war, unter den mit blauem Licht der Dosis 30 oder 60 J/cm^2 bestrahlten Zellen signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe. Anhand dieser Versuchsergebnisse ließ sich vermuten, dass blaues Licht der Wellenlänge 453 nm trotz seiner Nähe zum Wellenlängenbereich des UVA-Lichtes und trotz der in Vorversuchen gezeigten ROS-Erhöhung [124] andere Effekte auf die seneszenzassoziierte β -Galaktosidasen hat als UVA-Licht. Dieser Effekt scheint eher eine Hemmung der Bildung von seneszenzassoziierte β -Galaktosidasen statt eine Erhöhung, wie sie bei UVA Licht beobachtet wird, zu sein. Solch einen hemmenden Effekt auf die Bildung der seneszenzassoziierte β -Galaktosidasen nach Bestrahlung mit Licht findet man unabhängig

von der verwendeten Wellenlänge der Bestrahlungsquelle aktuell nicht in der Literatur. Man findet lediglich neben den Daten zur seneszenzinduzierenden Wirkung von UV-Licht Daten zu Licht anderer Wellenlängen, welches oxidativen Stress in der Zelle induziert und somit eher seneszenzfördernde Effekte hat. Ein Beispiel dafür ist die Produktion von ROS durch die Bestrahlung mit infrarotem Licht [149].

Ich befürchtete, dass der von mir beobachtete hemmende Effekt auf die Induktion der Seneszenz durch die Bestrahlung mit blauem Licht auf einem Artefakt basieren könnte. Dieses hätte damit begründet sein können, dass die β -Galaktosidase durch die Bestrahlung so verändert wird, dass sie ihre Aktivität verliert und somit nicht mehr durch das verwendete KIT nachgewiesen werden kann. Daher bestrahlte ich in einem Kontrollversuch das reine rekombinante Enzym mit blauem Licht der Dosis 60 J/cm^2 . Die anschließende fluoreszenzzytometrische Überprüfung der Funktion des Enzyms (siehe Abb. 14) zeigte, dass durch die Bestrahlung des Enzyms mit blauem Licht kein Funktionsverlust der β -Galaktosidase induziert wurde. Die Resultate der ersten Versuchsreihe waren daher nicht als ein Artefakt der Interaktion von blauem Licht mit dem Enzym β -Galaktosidase zu deuten.

Um nun nach möglichen Erklärungen für das beobachtete Phänomen, dass blaues Licht der Wellenlänge 453 nm einen hemmenden Einfluss auf Seneszenzinduktion haben könnte zu suchen, betrachtete ich in der nächsten Versuchsreihe die Gesamtmenge an oxidierten Proteinen in bestrahlten Fibroblasten, und verglich diese mit der Menge an oxidierten Proteinen in unbestrahlten Zellen. Die Menge an oxidierten Proteinen in einer Zelle ist wichtig in Hinblick auf die Fragestellung nach zellulärer Seneszenz, sowie in Bezug auf Alterungsprozesse [40]. Oxidierte Proteine sind ein möglicher Endpunkt der schädigenden Wirkung von ROS auf menschliche Zellen. ROS reagieren mit speziellen Gruppen an Aminosäuren von Enzymen, was dazu führt, dass es zu Strukturänderungen in den Enzymen kommt. Veränderungen in der Enzymstruktur gehen einher mit Veränderungen in der Enzymfunktion [89]. Wenn durch oxidativen Stress nicht nur einzelne Enzyme verändert werden, sondern viele Enzyme Schaden nehmen, so führt dies zu Veränderungen des zellulären Stoffwechsels. Große Mengen an oxidierten Enzymen sind eng mit der Alterung von Zellen verknüpft. [150] Mithilfe des „OxyBlot Protein Oxidation Detection“ – Kit der Firma Millipore wies ich oxidierte Proteine mittels Dot-Blot Verfahrens nach. Die Auswertung dieser Dot-Blots (siehe Abb. 23) ergab, dass nach täglicher Bestrahlung mit 60 J/cm^2 blauem Licht über 15 Tage, in den bestrahlten Zellen eine signifikant geringere Menge an oxidierten Proteinen nachweisbar war, als in den Zellen der unbestrahlten Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu der Tatsache, dass, wie bereits erwähnt, von anderen Arbeitsgruppen gezeigt wurde, dass auch eine Bestrahlung mit blauem Licht zur Induktion der exogenen ROS-Produktion führt [124], welches dann über oxidativen Stress in einer Steigerung der Menge an oxidierten Proteinen in Zellen münden müsste. Daher stellte ich nach diesen beiden Versuchsreihen die Hypothese auf, dass blaues Licht zwar einen induzierenden Effekt auf die exogene ROS-Produktion hat, aber zusätzlich die Bestrahlung mit blauem Licht zu bisher noch unbekanntem Veränderungen in den Zellen führt, welche diese letztendlich resistenter gegenüber oxidativen Stress macht und somit auch einen hemmenden Effekt auf die

Induktion von Seneszenz, beziehungsweise die Bildung von seneszenzassoziierten β -Galaktosidasen in diesen Zellen hat.

Im Folgenden wollte ich nun zunächst die vorbeschriebene Induktion der ROS-Produktion durch die Bestrahlung mit blauem Licht reevaluiert. Diese vorbeschriebenen Ergebnisse waren mit den Resultaten meiner ersten beiden Versuchsreihen noch nicht in Einklang zu bringen. Zur Reevaluation der vorbeschriebenen Ergebnisse bestrahlte ich Fibroblasten über 2 Tage täglich mit jeweils 60 J/cm^2 blauem Licht. Mit Hilfe eines photometrischen Verfahrens bestimmte ich nach jeder Bestrahlung die Menge an ROS in den Zellen. Die Auswertung dieses Versuchs (siehe Abb. 24) zeigte, dass bereits durch eine einmalige Bestrahlung mit 60 J/cm^2 blauem Licht die Menge an ROS in den bestrahlten Zellen signifikant anstieg. Dieser beobachtete Anstieg war nach der erneuten Bestrahlung am Folgetag noch deutlicher ausgeprägt messbar als nach der ersten Bestrahlung. Somit ließen sich anhand meiner Versuchsergebnisse die vorbeschriebenen Ergebnisse, bezüglich der Induktion der ROS-Produktion durch die Bestrahlung mit blauem Licht [124], bestätigen. Der Widerspruch zwischen hohen ROS-Spiegeln in den bestrahlten Zellen und dennoch niedrigen Mengen an oxidierten Proteinen und geringer Menge an Zellen, welche seneszenzassoziierten β -Galaktosidasen bilden, blieb somit bestehen. Eine solche Beobachtung, dass trotz einer Steigerung der ROS-Produktion, getriggert durch die Bestrahlung mit Licht, es zu keiner Zunahme der Menge an oxidierten Proteinen sowie zu keiner Induktion des Seneszenzmarkers kam, findet man bisher in der Literatur nicht beschrieben. In der Literatur sind lediglich eine Vielzahl an antioxidativ wirkenden Mechanismen beschrieben, welche ich auch bereits oben erläutert habe. Diese antioxidativ wirkenden Mechanismen werden unter anderem durch hohe Spiegel an ROS hochreguliert [85]. Anhand dieser Datenlage scheint die Hochregulation der antioxidativ wirkenden Mechanismen durch die Bestrahlung mit blauem Licht eine mögliche Erklärung für die beobachtete geringere Menge an oxidierten Proteinen, sowie die geringere Expression von seneszenzassoziierte β -Galaktosidase durch blaues Licht zu sein.

Aufgrund dieser neuen Hypothese untersuchte ich im Folgenden die Expression der mRNA von Enzymen, die an der zellulären Abwehr von ROS beteiligt sind, in Abhängigkeit von der Bestrahlung mit blauem Licht. Wichtige Vertreter dieser Gruppe von Enzymen sind die *Superoxiddismutasen* [97], *Peroxidasen* [98] und das Enzym *Katalase* [99]. Ich bestimmte die Expression der mRNA der Kupfer-Zink-SOD (*SOD 1*), sowie der Mangan-SOD (*SOD 2*) und die Expression der *Katalase-mRNA* mittels *rt-PCR* Verfahren. Die Bestimmung der Expression der mRNA der oben genannten Enzyme erfolgte an Zellen, welchen jeweils für 1, 5 oder 10 Tage täglich mit 60 J/cm^2 blauem Licht bestrahlt worden sind. Als Kontrolle diente die Analyse der Expression der mRNA der jeweiligen Enzyme in unbestrahlten Zellen. Aus der statistischen Auswertung der Ergebnisse der *rt-PCR* für die mRNA, welche für *Katalase* codiert (siehe Abb. 19), ergaben sich, unabhängig von der Anzahl der Tage über welche die Bestrahlung durchgeführt wurde, keine signifikanten Veränderungen der Genexpression der *Katalase* gegenüber der unbestrahlten Kontrolle. Allerdings konnte man dennoch an allen Tagen eine tendenziell leicht erhöhte Menge an *Katalase-spezifischer mRNA* erkennen. Aufgrund einer großen Standardabweichung ließ sich

hier keine Signifikanz ableiten. Daher wäre hier eine Erhöhung der Anzahl an Spender nötig, um in Zukunft eine sichere Aussage bezüglich der Änderungen der Expression der *Katalase-spezifischen mRNA* treffen zu können. Abgesehen davon gab diese tendenziell leicht erhöhte Menge an für *Katalase* codierende *mRNA* dennoch einen Hinweis darauf, dass die von mir aufgestellte Hypothese, dass durch die Bestrahlung mit blauem Licht die antioxidativen Mechanismen der Zelle hochreguliert werden und die Zellen so weniger Schaden durch oxidativen Stress nehmen, bestätigt werden könnte. Die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Daten der *rt-PCR* für die *mRNA*, welche für *SOD 1* codiert, waren nahezu identisch mit den Ergebnissen der Auswertung für die *SOD 2* (siehe Abb. 20 und Abb. 21). Beide Auswertungen ergaben, genau wie auch bei der Expression der *Katalase mRNA* beobachtet, unabhängig von der Anzahl der Tage über welche die Bestrahlung durchgeführt wurde, keine signifikanten Veränderungen der Expression der *mRNA* der beiden Enzyme im Vergleich zu der Expression der *mRNA* in den unbestrahlten Zellen der Kontrolle. Genauso, wie auch bei den Daten für die *Katalase*, konnte man auch bei den Daten für die *SOD 1* und die *SOD 2* eine große Standardabweichung feststellen, woraus sich wiederum ableiten ließ, dass auch hier in Zukunft eine größere Spenderanzahl nötig ist, um die Ergebnisse zu bestätigen. Allerdings ließen sich auch hier wieder leichte tendenzielle Änderungen in der Menge an *mRNA*, welche für die *SOD 1*, sowie auch in der Menge an *mRNA*, welche für die *SOD 2* codieren, feststellen. Für die Expression der *mRNA* beider Enzyme war eine tendenzielle Hochregulation in den Zellen zu beobachten, welche lediglich einmalig bestrahlt worden sind. Anders als bei *Katalase* blieb diese tendenzielle Erhöhung der Expression der *mRNA* der *SOD 1*, sowie der *SOD 2* bei den Zellen, welche 5 oder 10 Tage bestrahlt worden sind, nicht konstant, sondern fiel wieder auf das Niveau ab, welches auch in den Zellen der Kontrollgruppe messbar war. Die Veränderungen der Expression der *mRNA* der *SOD 1* sowie der *SOD 2* in den Zellen, welche lediglich einmal bestrahlt worden sind ließen sich, genau wie die Veränderungen der Expression der *mRNA* der *Katalase*, mit meiner Hypothese zu den Einflüssen von blauem Licht auf die Widerstandsfähigkeit von Zellen gegenüber oxidativen Stress und *ROS* in Einklang bringen. Der beobachtete Abfall der Expression der *mRNA* der beiden *Superoxiddismutasen* bei 5 oder 10 Tagen bestrahlten Zellen war noch nicht mit dieser Hypothese in Einklang zu bringen und benötigte weitere Klärung. In der Literatur fanden sich bisher keine Daten zur Veränderung der Expression der *mRNA* von *Superoxiddismutasen* und *Katalase* in humanen Zellen durch die Bestrahlung mit blauem Licht. Allerdings findet man Daten zu der veränderten Expression der *mRNA* dieser Enzyme in Hähnchen nach der Bestrahlung mit blauem Licht. So zeigten zum Beispiel Abdo *et al.* in ihrer in 2017 veröffentlichten Arbeit, dass es durch die Bestrahlung von Hähnchen mit monochromatischem blauem Licht zu einer signifikanten Hochregulation an *Katalase-spezifischer* sowie *SOD-spezifischer mRNA*, in den Hähnchen kommt [151]. Bezüglich des Einflusses von UVA-Licht auf die Veränderung der Expression der *mRNA* der oben genannten Enzyme finden sich in der Literatur einige Daten. Es konnte gezeigt werden, dass in Zellen aus der Haut von Mäusen, welche mit UVA-Licht bestrahlt worden sind, eine gesteigerte Menge an *mRNA* codierend für die *SOD 1* sowie auch für die *SOD 2* nachweisbar waren [152]. Poswig

et al. zeigten in ihrer 1999 veröffentlichten Arbeit, dass auch in humanen Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit UVA-Licht ein signifikanter Anstieg der *SOD2-mRNA-Expression* messbar ist [153]. Dieser in verschiedenen Spezies gezeigte Anstieg der *mRNA-Expression* für die antioxidative Enzyme durch die Bestrahlung mit blauem Licht oder mit UVA-Licht, welches beides zu einer Erhöhung von *ROS*-Spiegeln in den bestrahlten Zellen führt, unterstützt die von mir gezeigten Ergebnisse bezüglich der tendenziellen Erhöhungen der Menge der für diese Enzyme codierenden *mRNA* in humanen Fibroblasten nach der Bestrahlung mit blauem Licht. Eine Schwäche, die diese Arbeit an diesem Punkt aufwies ist die, dass lediglich die Veränderungen in der Genexpression der *Katalase* sowie der verschiedenen *Superoxiddismutasen* betrachtet wurden. Es wurden keine Analysen zu Veränderungen der *mRNA-Expression* von *Peroxidasen* durchgeführt, obwohl diese ebenfalls wichtige Enzyme der zellulären Abwehr gegen *ROS* und oxidativen Stress sind [98]. Eine Betrachtung von Veränderungen der *mRNA-Expression* von *Peroxidasen* in Abhängigkeit von der Bestrahlung mit blauem Licht sollte in der Zukunft erfolgen, um Aussagen über alle wichtigen Enzyme der antioxidativen Abwehr treffen zu können.

In der folgenden Versuchsreihe wollte ich nun prüfen, ob die beobachteten Veränderungen im Bereich der *mRNA-Expression* auch auf Proteinebene nachweisbar sind. Hierzu bestimmte ich mittels *Western-Blot* Verfahren die Proteinexpression in dermalen Fibroblasten. Die Fibroblasten wurden zuvor über 1, 5, 10, 15 bzw. 20 Tage täglich mit jeweils 60 J/cm^2 blauem Licht bestrahlt. Auf Proteinebene betrachtete ich mit *Katalase*, *SOD 1* und *SOD 2* die gleichen Enzyme wie auch auf der Ebene der *mRNA-Expression*. Normiert wurde auf das *House-Keeping-Proteins GAPDH* und als Kontrollgruppe dienten unbestrahlte Fibroblasten. Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse der *Western-Blots* ergab sich in Bezug auf das Enzym *Katalase* (siehe Abb. 16), dass die Menge an Enzym in den Zellen, welche bestrahlt worden sind, signifikant geringer war als in den unbestrahlten Kontrollzellen. Diese signifikante Verringerung der Menge an *Katalase* war bereits in Zellen messbar, welche nur einmalig mit 60 J/cm^2 blauem Licht bestrahlt wurden. Mit zunehmender Dauer der Bestrahlung blieb dieser Unterschied in der Menge an *Katalase* in den bestrahlten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen annähernd konstant und zeigte keine Dynamik. Bei der Betrachtung der Auswertung der Resultate der *Western-Blots* bezüglich der *SOD 1* (siehe Abb. 17) waren keine signifikanten Unterschiede der Proteinmenge in den bestrahlten Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen festzustellen. Es waren lediglich Tendenzen dahingehend zu erkennen, dass auch die Menge an *SOD 1*, genau wie die *Katalase* in den Zellen, welche bestrahlt werden geringer ist als in den unbestrahlten. Diese Tendenz war am deutlichsten zu sehen bei den Zellen, welche lediglich einmal mit blauem Licht bestrahlt worden sind. Bei den Zellen welche über 5, 10 oder 15 Tage bestrahlt worden sind, konnte man diese Tendenz, wenn überhaupt, nur sehr geringfügig erkennen. Bei den Zellen welche 20 Tage behandelt worden sind, war die Tendenz wieder deutlicher zu erkennen. Bezüglich der Veränderung der Proteinmenge der *SOD 2* in Fibroblasten durch die Bestrahlung mit blauem Licht ergaben meine Versuche keine signifikanten Ergebnisse (siehe Abb. 18). Auch ließen sich aus den Versuchsergebnissen keine Tendenzen ableiten. Die Bestrahlung

mit blauem Licht scheint keinen Einfluss auf die messbare Menge an *SOD 2* in Fibroblasten zu haben. Die Ergebnisse der *Western-Blots*, welche teilweise signifikante und teilweise nur tendenzielle Verringerungen an antioxidativ wirkenden Enzymen in den Zellen durch die Bestrahlung zeigten, waren nicht eindeutig mit der von mir aufgestellten Hypothese zu vereinen. Niedrigere Spiegel an antioxidativ wirkenden Enzymen passten nicht zu der von mir postulierten besseren Abwehrfähigkeit von Fibroblasten gegen oxidativen Stress durch die Bestrahlung mit blauem Licht. Widersprüchlich waren auch die Ergebnisse der *rt-PCR* im Vergleich zu den *Western-Blot* Ergebnissen. Die auf Ebene der Genexpression beobachtete Hochregulation der *mRNA* für alle 3 Enzyme schlug sich auf Proteinebene nicht nieder. Stattdessen fand man hier sogar eher die beschriebenen, teilweise signifikanten, geringeren Enzymmengen. Diese Diskrepanz zwischen *mRNA-Expression* und der letztendlich messbaren Proteinmenge in den bestrahlten Zellen ließ die Vermutung nahelegen, dass blaues Licht direkten oder indirekten Einfluss auf den Abbau von Enzymen wie z.B. *Katalase* haben könnte. Ein weiterer Fakt, welcher für solch einen Einfluss des blauen Lichts auf den Abbau von Enzymen sprach war der, dass *Katalase* physiologisch eine Halbwertszeit von 4-5 Tagen aufweist [154] und ich in meinem Versuch bereits in den Zellen, welche nur einmalig bestrahlt worden sind, was einer Behandlungsdauer von 24 Stunden entsprach, einen signifikanten Abfall der Menge an *Katalase* feststellen konnte. Ein Prozess, über den *Katalase* abgebaut wird, ist die *c-Abl/Arg Tyrosin Kinase* abhängige Phosphorylierung des Enzyms, welche zu einer Ubiquitinierung mit anschließendem Abbau des Enzyms in *Proteasom* führt. Diese Phosphorylierung scheint insofern abhängig von *ROS*-Spiegeln in den Zellen zu sein, als sie bei leicht erhöhten *ROS* spiegeln inhibiert ist, bei stärker erhöhten *ROS*-Spiegeln allerdings vermehrt ist [155]. Diese beschriebene Abhängigkeit des Enzymabbaus ist vermutlich ein Ansatz zur Erklärung des von mir beobachteten Abfalls der Menge an *Katalase* in den mit blauem Licht bestrahlten Zellen. Aufgrund dieser Tatsache ist die Hochregulation der *Katalase-mRNA-Expression* in Zellen, welche mit blauem Licht bestrahlt wurden, eher als eine Reaktion auf die bestrahlungsbedingten Veränderungen auf Proteinebene zu deuten, als durch einen direkten durch blaues Licht induzierten Effekt zu erklären. In einer letzten Versuchsreihe standen die Effekte, welche eine langfristige Bestrahlung mit blauem Licht auf Fibroblasten hat im Mittelpunkt. Dafür betrachtete ich über 170 Tage die kumulative Populationsverdopplung von Zellen, welche täglich mit 60 J/cm^2 blauem Licht bestrahlt wurden und verglich diese mit der kumulativen Populationsverdopplung von Zellen, die ohne Bestrahlung über 170 Tage kultiviert wurden. Ich konnte feststellen (siehe Abb. 25), dass die Populationsverdopplungszeit der Zellen, welche täglich bestrahlt wurden, anfangs annähernd identisch mit der Populationsverdopplungszeit der unbestrahlten Zellen war. Mit zunehmender Dauer der Kultivierungs- beziehungsweise Bestrahlungstage entwickelte sich ein immer größer werdender Unterschied in den Populationsverdopplungszeiten der beiden Versuchsgruppen. So wiesen die Zellen, welche täglich bestrahlt worden sind, am Ende der Beobachtung nach 170 Tagen eine signifikant geringere Menge an Populationsverdopplungen auf als die Zellen aus der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe deuteten darauf hin, dass die Bestrahlung mit blauem Licht, zumindest bei langfristiger

Anwendung, eine negative Auswirkung auf die Wachstums- sowie die Teilungsgeschwindigkeit von Fibroblasten hat. Diese Langzeitergebnisse schienen in einem gewissen Maß im Widerspruch zu den Kurzzeitergebnissen der ersten Versuchsreihe zu stehen. So muss erneut hinterfragt werden, ob die nach der ersten Versuchsreihe aufgestellte Hypothese bezüglich des hemmenden Einflusses von blauem Licht auf die Induktion von Seneszenz in Fibroblasten haltbar ist. So zeigten zum Beispiel auch Wataha, J et. al 2004 einen negativen Einfluss auf die Populationsverdopplungszeit von Fibroblasten in Abhängigkeit einer Bestrahlung mit blauem Licht. Obwohl sie nicht wie ich monochromatisches blaues Licht, sondern ein Spektrum von 400-500 nm nutzten, lassen sich die Ergebnisse vergleichen. Die Gruppe um Wataha postulierte die Hemmung der Mitochondrien und der Atmungskette durch blaues Licht als Hauptursache für diesen beobachteten Effekt [123].

Betrachtet man nun alle Versuchsergebnisse in Zusammenschau, so lässt sich die von mir eingangs postulierte Hypothese, dass eine Bestrahlung mit blauem Licht die Induktion der Seneszenz von Fibroblasten hemmen könnte, lediglich durch die Ergebnisse weniger Versuchsreihen stützen. Dies sind zum Beispiel die Ergebnisse aus der Versuchsreihe, welche sich mit der Menge an β -Galaktosidase in bestrahlten Zellen beschäftigt hat, sowie aus der Versuchsreihe, in welcher die Gesamtmenge an oxidierten Proteinen in Zellen in Abhängigkeit von Bestrahlung betrachtet wurde. Auf der anderen Seite hingegen sprechen die Ergebnisse der ROS-Messungen in bestrahlten Zellen, sowie die gezeigten Veränderungen auf der Ebene Proteinexpression, sowie der Genexpression in bestrahlten Zellen und die Ergebnisse der Langzeitbetrachtung der kumulativen Populationsverdopplung eher gegen diese Hypothese. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihen sind stattdessen eher vergleichbar zu den in der Einleitung bereits beschriebenen Veränderungen, die man in Zellen sieht, welche mit UVA Licht bestrahlt wurden [77, 114, 115]. Hier bringt man die betrachteten Veränderungen der ROS Mengen und der Proteine in den Zellen in Zusammenhang mit der Induktion von Seneszenz und Alterung und nicht mit einer von mir postulierten Hemmung dieser Prozesse [33, 34].

So muss nun abschließend die Frage gestellt werden, ob β -Galaktosidase als Marker für Seneszenz in mit blauem Licht bestrahlten Zellen geeignet ist, oder ob hier ein Artefakt erzeugt wurde und es anderer Marker bedarf, um die Induktion von Seneszenz in mit blauem Licht bestrahlten Zellen nachzuweisen. Anhand der bisher erhobenen Ergebnisse lässt sich die Frage, wie blaues Licht auf die Induktion von Seneszenz und somit auch auf die Alterung von Fibroblasten wirkt, nicht endgültig beantworten. Um die Ergebnisse der Versuchsreihe mit β -Galaktosidase als Marker für Seneszenz zu verifizieren oder zu falsifizieren, bedarf es weiterer Versuchsreihen mit anderen Markern für Seneszenz. Solche anderen gängigen nachweisbaren Marker wären zum Beispiel die seneszenztypischen Sekretionsmuster (SAPS) oder Marker wie *p53* und *p16INK4A* [56, 60, 61]. Sollten unter Anwendung solcher anderer Marker meine Ergebnisse aus der Versuchsreihe mit β -Galaktosidase als Marker für Seneszenz bestätigt werden können, so würde dies wiederum weitere Versuche nach sich ziehen, um die zellulären Prozesse aufzudecken, über welche diese Hemmung der Induktion von Seneszenz und somit der Alterung von Fibroblasten abläuft. Ebenso müssten dann diese kurzzeitigen Effekte mit Hilfe weiterer Versuche mit

den beobachteten langzeitigen Effekten aus der Beobachtung der kumulativen Populationsverdopplung in Einklang gebracht werden. All dies ist aktuell Stand weiterer Forschung unserer Arbeitsgruppe.

5 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----------|---|----|
| Abb. 1. | Schema Hautschichten | 1 |
| Abb. 2. | Übersicht elektromagnetisches Spektrum..... | 16 |
| Abb. 3. | Schema Eindringtiefe von Strahlen..... | 17 |
| Abb. 4. | Verwendete 453 nm LED Lampe | 34 |
| Abb. 5. | Fotografie und bearbeitete Beispielaufnahme β -Galaktosiedase-Assay Negativkontrolle...36 | |
| Abb. 6. | Fotografie und bearbeitete Beispielaufnahme β -Galactosidase-Assay blau bestrahlt.....36 | |
| Abb. 7. | Fotografie und bearbeitete Beispielaufnahme β -Galactosidase-Assay UVA bestrahlt.....37 | |
| Abb. 8. | Schematische Darstellung des Aufbaus der Blotting Apparatur..... | 41 |
| Abb. 9. | Bearbeitete Fotografie β -Galaktosiedase-Assay Negativkontrolle..... | 50 |
| Abb. 10. | Bearbeitete Fotografie β -Galactosidase-Assay blau bestrahlt..... | 51 |
| Abb. 11. | Bearbeitete Fotografie β -Galactosidase-Assay UV bestrahlt..... | 51 |
| Abb. 12. | Auswertung β -Galactosidase-Assay nach 5 Tagen | 52 |
| Abb. 13. | Auswertung β -Galactosidase-Assay nach 15 Tagen | 53 |
| Abb. 14. | Auswertung Bestrahlung des rekombinanten Enzyms | 54 |
| Abb. 15. | Fotographie <i>Westernblot</i> Membranen | 55 |
| Abb. 16. | Auswertung <i>Westernblots</i> <i>Catalase</i> -Expression | 55 |
| Abb. 17. | Auswertung <i>Western Blots</i> <i>SOD 1</i> -Expression | 56 |
| Abb. 18. | Auswertung <i>Western Blots</i> <i>SOD 2</i> -Expression | 57 |
| Abb. 19. | Auswertung <i>rt-PCR Catalase</i> | 58 |
| Abb. 20. | Auswertung <i>rt-PCR SOD 1</i> | 59 |
| Abb. 21. | Auswertung <i>rt-PCR SOD 2</i> | 60 |
| Abb. 22. | Fotografie <i>Dot- Blot</i> Membranen | 61 |
| Abb. 23. | Auswertung <i>Dot-Blot</i> oxidierte Proteine | 61 |
| Abb. 24. | Auswertung <i>ROS</i> -Messung..... | 62 |
| Abb. 25. | Auswertung kumulative Populationsverdopplung..... | 63 |

6 Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|--|----|
| Tabelle 1. | Auflistung der <i>ROS</i> | 10 |
| Tabelle 2. | Auflistung der verwendeten Geräte | 24 |
| Tabelle 3. | Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien | 25 |
| Tabelle 4. | Auflistung der benutzten Chemikalien | 27 |
| Tabelle 5. | Auflistung der molekularbiologischen Materialien und Kit-Systeme | 28 |
| Tabelle 6. | Auflistung der benutzten Medien, Lösungen und Puffer | 29 |
| Tabelle 7. | Auflistung der verwendeten Antikörper | 30 |
| Tabelle 8. | Verwendete Dosen und Bestrahlungszeiten 453 nm <i>LED</i> -Lampe | 34 |
| Tabelle 9. | Verwendete Dosen und Bestrahlungszeiten UVA-Lampe | 34 |
| Tabelle 10. | Volumina zur Herstellung des <i>BSA</i> -Proteinstandards | 38 |
| Tabelle 11. | Volumina zur Herstellung von Trenngelen..... | 39 |
| Tabelle 12. | Volumina zur Herstellung eines <i>Master mixes</i> für die <i>RT-PCR</i> | 47 |
| Tabelle 13. | Volumina zur Herstellung eines <i>Master mixes</i> für die <i>qRT-PCR</i> | 48 |
| Tabelle 14. | Auflistung der eingesetzten Primer der Firma <i>eurofins</i> mit zugehöriger Sequenz | 48 |

7 Literaturverzeichnis

1. Welsch, U., U. Welsch, and T. Deller, *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 2014.
2. Benninghoff, A., *Anatomie : makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 2. Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut*. 2004.
3. Junqueira, L.C.U., *Histologie : mit 14 Tabellen*. 2002.
4. Zilles, K. and B.N. Tillmann, *Anatomie*. 2010.
5. Benninghoff, A., *Anatomie : makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. 2008.
6. 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.
7. Gilchrest, B.A., *Skin aging and photoaging: an overview*. J Am Acad Dermatol, 1989. **21**(3 Pt 2): p. 610-3.
8. Makrantonaki, E. and C.C. Zouboulis, *William J. Cunliffe Scientific Awards. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin*. Dermatology, 2007. **214**(4): p. 352-60.
9. Hayflick, L., *THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
10. Harley, C.B., *Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?* Mutat Res, 1991. **256**(2-6): p. 271-82.
11. Rassow, J., et al., *Biochemie*. 2016.
12. Bodnar, A.G., et al., *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. Science, 1998. **279**(5349): p. 349-52.
13. Wallace, D.C., *Mitochondrial defects in neurodegenerative disease*. Ment Retard Dev Disabil Res Rev, 2001. **7**(3): p. 158-66.
14. Michikawa, Y., et al., *Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication*. Science, 1999. **286**(5440): p. 774-9.
15. Ly, D.H., et al., *Mitotic misregulation and human aging*. Science, 2000. **287**(5462): p. 2486-92.
16. Harman, D., *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry*. J Gerontol, 1956. **11**(3): p. 298-300.
17. Ames, B.N., M.K. Shigenaga, and T.M. Hagen, *Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(17): p. 7915-22.
18. Lock-Andersen, J., et al., *Epidermal thickness, skin pigmentation and constitutive photosensitivity*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 1997. **13**(4): p. 153-8.
19. Lavker, R.M., *Structural alterations in exposed and unexposed aged skin*. J Invest Dermatol, 1979. **73**(1): p. 59-66.
20. Bregegere, F., et al., *Cellular senescence in human keratinocytes: unchanged proteolytic capacity and increased protein load*. Exp Gerontol, 2003. **38**(6): p. 619-29.
21. Engelke, M., et al., *Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation*. Br J Dermatol, 1997. **137**(2): p. 219-25.
22. Bauer, F.W., et al., *Flow cytometry as a tool for the study of cell kinetics in epidermis*. Br J Dermatol, 1980. **102**(6): p. 629-39.
23. Grove, G.L. and A.M. Kligman, *Age-associated changes in human epidermal cell renewal*. J Gerontol, 1983. **38**(2): p. 137-42.
24. Gilchrest, B.A., F.B. Blog, and G. Szabo, *Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin*. J Invest Dermatol, 1979. **73**(2): p. 141-3.
25. Breathnach, A.S., et al., *Ultrastructure of melanocytes in chronically sun-exposed skin of elderly subjects*. Pigment Cell Res, 1991. **4**(2): p. 71-9.
26. 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.
27. Eaglstein, W.H., *Wound healing and aging*. Clin Geriatr Med, 1989. **5**(1): p. 183-8.
28. Ashcroft, G.S., et al., *Human ageing impairs injury-induced in vivo expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-1 and -2 proteins and mRNA*. J Pathol, 1997. **183**(2): p. 169-76.

29. Kligman, L.H. and A.M. Kligman, *The nature of photoaging: its prevention and repair*. Photodermatol, 1986. **3**(4): p. 215-27.
30. Kohl, E., et al., *Skin ageing*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011. **25**(8): p. 873-84.
31. Elson, M.L., *Evaluation and Treatment of the Aging Face*, in *Evaluation and Treatment of the Aging Face*, M.L. Elson, Editor. 1995, Springer US: New York, NY. p. 1-8.
32. Lavker, R.M. and A.M. Kligman, *Chronic heliodermatitis: a morphologic evaluation of chronic actinic dermal damage with emphasis on the role of mast cells*. J Invest Dermatol, 1988. **90**(3): p. 325-30.
33. Fisher, G.J., et al., *Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light*. N Engl J Med, 1997. **337**(20): p. 1419-28.
34. Klotz, L.O., N.J. Holbrook, and H. Sies, *UVA and singlet oxygen as inducers of cutaneous signaling events*. Curr Probl Dermatol, 2001. **29**: p. 95-113.
35. Berneburg, M., et al., *Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system*. Photochem Photobiol, 1997. **66**(2): p. 271-5.
36. Kosmadaki, M.G. and B.A. Gilchrest, *The role of telomeres in skin aging/photoaging*. Micron, 2004. **35**(3): p. 155-9.
37. Fisher, G.J., et al., *Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 335-9.
38. Imokawa, G., *Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: a pivotal role of fibroblast-derived elastase*. Arch Dermatol Res, 2008. **300 Suppl 1**: p. S7-20.
39. Chung, J.H. and H.C. Eun, *Angiogenesis in skin aging and photoaging*. J Dermatol, 2007. **34**(9): p. 593-600.
40. Sander, C.S., et al., *Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(4): p. 618-25.
41. Lahmann, C., et al., *Matrix metalloproteinase-1 and skin ageing in smokers*. Lancet, 2001. **357**(9260): p. 935-6.
42. Boyd, A.S., et al., *Cigarette smoking-associated elastotic changes in the skin*. J Am Acad Dermatol, 1999. **41**(1): p. 23-6.
43. Kligman, L.H., *Intensification of ultraviolet-induced dermal damage by infrared radiation*. Arch Dermatol Res, 1982. **272**(3-4): p. 229-38.
44. Kim, M.S., et al., *Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin*. Mech Ageing Dev, 2006. **127**(12): p. 875-82.
45. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
46. d'Adda di Fagagna, F., et al., *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence*. Nature, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
47. d'Adda di Fagagna, F., *Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(7): p. 512-22.
48. Shay, J.W., O.M. Pereira-Smith, and W.E. Wright, *A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence*. Exp Cell Res, 1991. **196**(1): p. 33-9.
49. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
50. Kuilman, T., et al., *The essence of senescence*. Genes Dev, 2010. **24**(22): p. 2463-79.
51. Sherr, C.J. and R.A. DePinho, *Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?* Cell, 2000. **102**(4): p. 407-10.
52. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*. Embo j, 2003. **22**(16): p. 4212-22.
53. Kuilman, T., et al., *Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network*. Cell, 2008. **133**(6): p. 1019-31.
54. Parrinello, S., et al., *Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(8): p. 741-7.
55. Chen, Q. and B.N. Ames, *Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4130-4.

56. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
57. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
58. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 187-95.
59. Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci, 2000. **113** (Pt 20): p. 3613-22.
60. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. Cell, 2005. **120**(4): p. 513-22.
61. Coppe, J.P., et al., *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. PLoS Biol, 2008. **6**(12): p. 2853-68.
62. Rodier, F., et al., *Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(8): p. 973-9.
63. Krtolica, A., et al., *Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12072-7.
64. Kuilman, T. and D.S. Peeper, *Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(2): p. 81-94.
65. Young, A.R., et al., *Autophagy mediates the mitotic senescence transition*. Genes Dev, 2009. **23**(7): p. 798-803.
66. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, *An introduction to free radical biochemistry*. Br Med Bull, 1993. **49**(3): p. 481-93.
67. Fanjul-Moles, M.L. and G.O. Lopez-Riquelme, *Relationship between Oxidative Stress, Circadian Rhythms, and AMD*. Oxid Med Cell Longev, 2016. **2016**: p. 7420637.
68. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
69. Schartl, M., et al., *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. 2009.
70. Turrens, J.F. and A. Boveris, *Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria*. Biochem J, 1980. **191**(2): p. 421-7.
71. Bannister, J.V., W.H. Bannister, and G. Rotilio, *Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase*. CRC Crit Rev Biochem, 1987. **22**(2): p. 111-80.
72. Fenton, H.J.H., *LXXIII.-Oxidation of tartaric acid in presence of iron*. Journal of the Chemical Society, Transactions, 1894. **65**(0): p. 899-910.
73. Del Rio, L.A. and E. Lopez-Huertas, *ROS Generation in Peroxisomes and its Role in Cell Signaling*. Plant Cell Physiol, 2016.
74. Brandes, R.P., N. Weissmann, and K. Schroder, *Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation*. Free Radic Biol Med, 2014. **76**: p. 208-26.
75. Pospisil, P., A. Prasad, and M. Rac, *Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems*. J Photochem Photobiol B, 2014. **139**: p. 11-23.
76. Liebel, F., et al., *Irradiation of Skin with Visible Light Induces Reactive Oxygen Species and Matrix-Degrading Enzymes*. Journal of Investigative Dermatology, 2012. **132**(7): p. 1901-1907.
77. Wondrak, G., M. Jacobson, and E. Jacobson, *Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection*. Photochemical & photobiological sciences, 2006. **5**(2): p. 215-237.
78. Kruft, B. and A. Greer, *Photosensitization Reactions In Vitro and In Vivo*. Photochemistry and Photobiology, 2011. **87**(6): p. 1204-1213.
79. Grice, E. and J. Segre, *The skin microbiome*. Nature Reviews. Microbiology, 2011. **9**(4): p. 244-253.
80. Kuppusamy, P. and J.L. Zweier, *Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(17): p. 9880-4.
81. DeRosa, M.C. and R.J. Crutchley, *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **233-234**: p. 351-371.

82. Comporti, M., *Three models of free radical-induced cell injury*. Chem Biol Interact, 1989. **72**(1-2): p. 1-56.
83. Gracy, R.W., et al., *Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?* Mutat Res, 1999. **428**(1-2): p. 17-22.
84. Halliwell, B. and J.M.C. Gutteridge, *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2015: Oxford University Press.
85. Kohen, R. and A. Nyska, *Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification*. Toxicol Pathol, 2002. **30**(6): p. 620-50.
86. Meral, A., et al., *Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia*. Pediatr Hematol Oncol, 2000. **17**(8): p. 687-93.
87. Davies, K.J., *Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects*. J Biol Chem, 1987. **262**(20): p. 9895-901.
88. Grune, T., T. Reinheckel, and K.J. Davies, *Degradation of oxidized proteins in mammalian cells*. Faseb j, 1997. **11**(7): p. 526-34.
89. Levine, R.L. and E.R. Stadtman, *Oxidative modification of proteins during aging*. Exp Gerontol, 2001. **36**(9): p. 1495-502.
90. Stadtman, E.R., *Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, ageing and neutrophil function*. Trends in Biochemical Sciences. **11**(1): p. 11-12.
91. Ames, B.N., *DNA damage from micronutrient deficiencies is likely to be a major cause of cancer*. Mutat Res, 2001. **475**(1-2): p. 7-20.
92. Halliwell, B., *Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition*. Mutat Res, 1999. **443**(1-2): p. 37-52.
93. Poulsen, H.E., et al., *Antioxidants, DNA damage and gene expression*. Free Radic Res, 2000. **33 Suppl**: p. S33-9.
94. Ghezzi, P., et al., *The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects*. British Journal of Pharmacology, 2016: p. n/a-n/a.
95. Kohen, R. and I. Gati, *Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress*. Toxicology, 2000. **148**(2-3): p. 149-57.
96. Atamna, H., I. Cheung, and B.N. Ames, *A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base excision repair*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 686-91.
97. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein*. J Biol Chem, 1969. **244**(22): p. 6049-55.
98. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
99. Lardinois, O.M., *Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide*. Free Radic Res, 1995. **22**(3): p. 251-74.
100. Ames, B.N., et al., *Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(11): p. 6858-62.
101. Haber, F. and J. Weiss, *The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts*. Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences, 1934. **147**(861): p. 332-351.
102. Samuni, A., et al., *On the cytotoxicity of vitamin C and metal ions. A site-specific Fenton mechanism*. Eur J Biochem, 1983. **137**(1-2): p. 119-24.
103. Boldyrev, A.A., *Does carnosine possess direct antioxidant activity?* Int J Biochem, 1993. **25**(8): p. 1101-7.
104. Packer, L., K. Kraemer, and G. Rimbach, *Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications*. Nutrition, 2001. **17**(10): p. 888-95.
105. Stocker, R., et al., *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. Science, 1987. **235**(4792): p. 1043-6.
106. Wenisch, T. and T. Wenisch, *Kurzlehrbuch Physik (4th Edition)*. 2015.

107. Svobodova, A., D. Walterova, and J. Vostalova, *Ultraviolet light induced alteration to the skin*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2006. **150**(1): p. 25-38.
108. Freeman, S.E., et al., *Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1989. **86**(14): p. 5605-5609.
109. Berneburg, M., et al., *Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(5): p. 1277-83.
110. Birch-Machin, M.A., et al., *Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(2): p. 149-52.
111. Schroeder, P., et al., *Partial depletion of mitochondrial DNA from human skin fibroblasts induces a gene expression profile reminiscent of photoaged skin*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(9): p. 2297-303.
112. Lombard, D.B., et al., *DNA repair, genome stability, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 497-512.
113. Gilchrest, B.A., M.S. Eller, and M. Yaar, *Telomere-mediated effects on melanogenesis and skin aging*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2009. **14**(1): p. 25-31.
114. 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.
115. Quan, T., et al., *Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging*. J Invest Dermatol Symp Proc, 2009. **14**(1): p. 20-4.
116. Quan, T., et al., *Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription factor AP-1 in human skin fibroblasts*. J Biol Chem, 2005. **280**(9): p. 8079-85.
117. Yano, K., et al., *Ultraviolet B irradiation of human skin induces an angiogenic switch that is mediated by upregulation of vascular endothelial growth factor and by downregulation of thrombospondin-1*. Br J Dermatol, 2005. **152**(1): p. 115-21.
118. Oplander, C., et al., *Effects of blue light irradiation on human dermal fibroblasts*. J Photochem Photobiol B, 2011. **103**(2): p. 118-25.
119. Liebmann, J., M. Born, and V. Kolb-Bachofen, *Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(1): p. 259-69.
120. Bonatti, S., et al., *In vitro effect of 470 nm LED (Light Emitting Diode) in keloid fibroblasts*. Acta Cir Bras, 2011. **26**(1): p. 25-30.
121. Taoufik, K., et al., *Effect of blue light on the proliferation of human gingival fibroblasts*. Dental Materials, 2008. **24**(7): p. 895-900.
122. Gorgidze, L.A., S.A. Oshemkova, and I.A. Vorobjev, *Blue light inhibits mitosis in tissue culture cells*. Biosci Rep, 1998. **18**(4): p. 215-24.
123. Wataha, J.C., et al., *Blue light differentially modulates cell survival and growth*. J Dent Res, 2004. **83**(2): p. 104-8.
124. Godley, B.F., et al., *Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells*. J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21061-6.
125. Mamalis, A., M. Garcha, and J. Jagdeo, *Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation*. Lasers Surg Med, 2015. **47**(2): p. 210-5.
126. Hockberger, P.E., et al., *Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(11): p. 6255-60.
127. Setlow, R.B., et al., *Wavelengths effective in induction of malignant melanoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6666-70.
128. Okuno, T., *Hazards of solar blue light*. Appl Opt, 2008. **47**(16): p. 2988-92.
129. Adamskaya, N., et al., *Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats*. Injury, 2011. **42**(9): p. 917-21.
130. Ohara, M., et al., *Blue light inhibits the growth of skin tumors in the v-Ha-ras transgenic mouse*. Cancer Sci, 2003. **94**(2): p. 205-9.
131. Jay, H. and C. Borek, *Treatment of a venous-lake angioma with intense pulsed light*. Lancet, 1998. **351**(9096): p. 112.
132. Bjerring, P. and K. Christiansen, *Intense pulsed light source for treatment of small melanocytic nevi and solar lentigines*. J Cutan Laser Ther, 2000. **2**(4): p. 177-81.

133. Husain, Z. and T.S. Alster, *The role of lasers and intense pulsed light technology in dermatology*. Clin Cosmet Invest Dermatol, 2016. **9**: p. 29-40.
134. Huang, Y.Y., et al., *Biphasic dose response in low level light therapy - an update*. Dose Response, 2011. **9**(4): p. 602-18.
135. Skopin, M.D. and S.C. Molitor, *Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing*. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 2009. **25**(2): p. 75-80.
136. Robijns, J., et al., *The use of low-level light therapy in supportive care for patients with breast cancer: review of the literature*. Lasers Med Sci, 2016.
137. Braathen, L.R., et al., *Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus*. Journal of the American Academy of Dermatology, 2007. **56**(1): p. 125-143.
138. Oniszczuk, A., et al., *The potential of photodynamic therapy (PDT)-Experimental investigations and clinical use*. Biomed Pharmacother, 2016. **83**: p. 912-929.
139. Breuckmann, F., et al., *UVA/UVA1 phototherapy and PUVA photochemotherapy in connective tissue diseases and related disorders: a research based review*. BMC Dermatol, 2004. **4**(1): p. 11.
140. Weinstabl, A., et al., *Prospective randomized study on the efficacy of blue light in the treatment of psoriasis vulgaris*. Dermatology, 2011. **223**(3): p. 251-9.
141. Morton, C.A., et al., *An open study to determine the efficacy of blue light in the treatment of mild to moderate acne*. J Dermatolog Treat, 2005. **16**(4): p. 219-23.
142. Becker, D., et al., *Clinical efficacy of blue light full body irradiation as treatment option for severe atopic dermatitis*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20566.
143. Kligman, L.H., *The ultraviolet-irradiated hairless mouse: a model for photoaging*. J Am Acad Dermatol, 1989. **21**(3 Pt 2): p. 623-31.
144. Miller, J., *Experiments in molecular genetics*. 1972.
145. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
146. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. 2009.
147. Pfaffl, M., *Real-time RT-PCR: Neue ansätze zur exakten mRNA quantifizierung*. BIOSpektrum, 2004. **10**(1): p. 92-95.
148. Pfaff, S., et al., *Prospective Randomized Long-Term Study on the Efficacy and Safety of UV-Free Blue Light for Treating Mild Psoriasis Vulgaris*. Dermatology, 2015. **231**(1): p. 24-34.
149. Darvin, M.E., et al., *Formation of free radicals in human skin during irradiation with infrared light*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 629-31.
150. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, *Protein oxidation*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **899**: p. 191-208.
151. Abdo, S.E., et al., *Modulatory Effect of Monochromatic Blue Light on Heat Stress Response in Commercial Broilers*. Oxid Med Cell Longev, 2017. **2017**: p. 1351945.
152. Choung, B.Y., et al., *Extracellular superoxide dismutase tissue distribution and the patterns of superoxide dismutase mRNA expression following ultraviolet irradiation on mouse skin*. Exp Dermatol, 2004. **13**(11): p. 691-9.
153. Poswig, A., et al., *Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation*. J Invest Dermatol, 1999. **112**(1): p. 13-8.
154. Altmann, W. and F. Büchner, *Das Cytoplasma*. 2013: Springer Berlin Heidelberg.
155. Cao, C., et al., *Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases*. Biochemistry, 2003. **42**(35): p. 10348-53.

Danksagung

Ich möchte mich ausdrücklich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabores der Klinik für Unfall- und Handchirurgie für ihre Unterstützung bedanken. Besonders hervorheben möchte ich dabei Christoph Suschek, der mir als Doktorvater immer mit gutem Rat zur Seite stand, ebenso möchte ich den MTA's Jutta, Christa und Samira danken welche bei Technischen Fragen, Problemen mit Bestellungen oder ähnlichem immer ein offenes Ohr hatten und direkt halfen. Zu guter Letzt gilt ein großer Dank an Julia, welche mir zu Beginn meiner Arbeit unter ihre Obhut genommen hat und mir sämtliche Verfahren beigebracht hat, was ihr sicher ab und an viele Nerven gekostet hat.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, welche mich auch in Phasen der Frustration immer ermutigten, nicht aufzugeben und mich stets motivierten weiter zu machen.