

Jean Krutmann

Vorzeitige Alterungsprozesse durch Umwelteinflüsse: Molekulare Untersuchungen am Modellorgan Haut

Einleitung

In der modernen umweltmedizinischen Forschung gewinnt die molekulare Altersforschung stetig an Bedeutung. Zwei Fragen, die beide von großem wissenschaftlichem wie auch gesundheitspolitischem Interesse sind, stehen hierbei zurzeit im Vordergrund:

1. Durch welche molekularen Mechanismen sind Umwelttoxene in der Lage, im menschlichen Gewebe einen vorzeitigen Alterungsprozess auszulösen?
2. Zeichnen sich ältere Menschen (jenseits des 65. Lebensjahres) durch eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Umwelttoxenen aus?

An der Heinrich-Heine-Universität werden diese beiden Fragen seit Anfang 2002 systematisch von Wissenschaftlern des Arbeitsbereichs „Molekulare Altersforschung“ des Instituts für Umweltmedizinische Forschung an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gGmbH (IUF) bearbeitet. Ein Großteil dieser Untersuchungen wurde am Modellorgan Haut durchgeführt, da die Haut zum einen ein primäres Zielorgan für eine Vielzahl von Umwelttoxenen ist und es zum anderen vergleichsweise einfach ist, hier neben *In-vitro*- auch *In-vivo*-Untersuchungen mit gezielter Exposition und anschließender Probeentnahme durchzuführen. Im Folgenden wird ein Überblick über die wichtigsten Erkenntnisse gegeben, die zu unserem heutigen Verständnis der molekularen Grundlagen der durch Umwelttoxene hervorgerufenen Hautalterung beitragen. Wichtig ist hierbei, dass neben der ultravioletten Strahlung auch andere Umwelteinflüsse eine wesentliche Rolle für den vorzeitigen Alterungsprozess der menschlichen Haut spielen. Hierzu gehören neben dem Tabakrauch auch nach neuesten Erkenntnissen die Infrarotstrahlung sowie Ozon und andere Umwelttoxene.

Pathomechanismen der Lichtalterung

Die ultraviolette Strahlung ist die wichtigste exogene Noxe, durch die es zu einer vorzeitigen Alterung der menschlichen Haut kommt. Neben dem natürlichen Sonnenlicht spielt hier in zunehmendem Maße die Bestrahlung der menschlichen Haut mit künstlicher UV-Strahlung eine immer größer werdende Rolle. So ist davon auszugehen, dass der ungebrochene Trend zum Besuch von Sonnenstudios nicht nur zu einer ständigen Erhöhung der Hautkrebsrate, sondern auch zu einer deutlichen Zunahme der vorzeitigen Hautalterung bei einem immer größer werdenden Teil der Bevölkerung führen wird. Diese Entwicklung ist insofern paradox, als der Besuch von Sonnenstudios kosmetisch motiviert ist, oder anders ausgedrückt: Der Solariumbesucher erkaufte sich die kurzfristig erzielbare, reversible

und kosmetisch erwünschte Hautbräunung mit einer langfristig eintretenden, kosmetisch unerwünschten und nur schwer umkehrbaren vorzeitigen Hautalterung.

Es besteht heute kein Zweifel mehr, dass sowohl die kurzwelligere UVB-Strahlung im Wellenlängenbereich von 290 bis 315 nm als auch die langwelligere UVA-Strahlung im Wellenlängenbereich von 315 bis 400 nm wesentlich an der Pathogenese der Lichtalterung beteiligt sind. Die pathogenetischen Untersuchungen der letzten Jahre haben eindeutig gezeigt, dass sich die für das klinische Bild der lichtinduzierten Hautalterung verantwortlichen strukturellen Veränderungen in der Haut vor allem in der Dermis finden. Da die langwelligere UVA-Strahlung auf Grund strahlenphysikalischer Gesetzmäßigkeiten in der Lage ist, im Gegensatz zur UVB-Strahlung in einem signifikanten Dosisbereich in die Dermis einzudringen und dort direkte Effekte hervorzurufen, ist es sogar vorstellbar, dass UVA-induzierte molekulare Veränderungen für die Pathogenese der Lichtalterung von größerer Bedeutung sind als UVB-induzierte biologische Wirkungen. In diesem Zusammenhang sei daher noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die zurzeit von den Solarienbetreibern in ihren Sonnenstudios verwendeten Geräte überwiegend, wenn nicht sogar ausschließlich, im UVA-Bereich emittieren und somit hinsichtlich der UV-induzierten Hautalterung als besonders problematisch anzusehen sind.

Kollagen, Matrixmetalloproteinasen und Elastin

Die lichtgealterte Haut ist insbesondere durch Veränderungen auf Ebene der Dermis charakterisiert. So wird die Elastizität und Festigkeit der menschlichen Haut wesentlich durch die beiden Hauptbestandteile der dermalen extrazellulären Matrix, nämlich Kollagen und Elastin, bestimmt. Für die lichtgealterte Haut sind bestimmte Veränderungen der dermalen extrazellulären Matrix hoch charakteristisch. So findet sich eine Elastose, die üblicherweise im Grenzbereich zwischen papillärer und dermaler Dermis beginnt und nicht in intrinsisch gealterter Haut beobachtet wird. Typisch ist auch, dass reife Kollagenfasern vermindert sind und sich stattdessen basophiles Kollagen findet (basophile Degeneration). Weitere für die lichtgealterte Haut typische Befunde sind eine starke Zunahme der Ablagerungen von fragmentierten elastischen Fasern sowie dermalen extrazellulärer Matrixproteine, wie Elastin, Glycosaminoglykane und interstitiellem Kollagen. Es wird heute allgemein davon ausgegangen, dass diese UV-induzierten Veränderungen der dermalen extrazellulären Matrix wesentlich für die Ausbildung des klinischen Bildes der lichtgealterten Haut, insbesondere ihren Elastizitätsverlust und die Entstehung von Falten, sind.

Die extrazelluläre Matrix der menschlichen Dermis besteht zu 85 bis 90 Prozent aus Kollagen-1, das ausschließlich von dermalen Fibroblasten gebildet wird. Immunhistochemische Untersuchungen haben in den letzten Jahren gezeigt,¹ dass lichtgealterte Haut im Vergleich zu lichtgeschützten Hautarealen desselben Individuums signifikant reduzierte Mengen an Pro-Kollagen-1 in Fibroblasten sowie an extrazellulärer Matrix in der papillären Dermis aufweist. Interessanterweise korreliert diese Reduktion negativ mit dem zunehmenden Schweregrad des chronischen Lichtschadens. Neben dem Kollagen-1 sind aber auch andere Kollagen-Peptide in der chronisch lichtgealterten Haut reduziert. Zu nennen sind hier besonders die Kollagen-3 Pro-Peptide. Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass auch das Kollagen-7 betroffen ist.²

¹ Vgl. Fisher *et al.* (1997).

² Vgl. Fisher *et al.* (1997).

Es stellt sich nunmehr die Frage, durch welche molekulare Mechanismen UV-Strahlung in der Lage ist, diese Veränderungen auf Ebene der extrazellulären Matrix hervorzurufen. Grundsätzlich ist vorstellbar, dass UV-Strahlung eine hemmende Wirkung auf die Synthese von Kollagenfasern ausübt und/oder zu ihrem beschleunigten Abbau beiträgt. Der momentane Stand der Forschung weist darauf hin, dass beide Mechanismen relevant sein könnten. So wurde gezeigt,³ dass eine UVB-Bestrahlung zu einer vorübergehenden Störung der Pro-Kollagen-1 Synthese in menschlichen dermalen Fibroblasten führt. Zudem konnte sowohl für UVB- als auch für UVA-Strahlung nachgewiesen werden, dass es zur Induktion von Matrixmetalloproteinasen kommt, d. h. von Enzymen, die in der Lage sind, Kollagenfasern proteolytisch abzubauen. Diese Induktion konnte sowohl *in vitro* in kultivierten humanen dermalen Fibroblasten als auch *in vivo* in der UV-bestrahlten menschlichen Haut beobachtet werden. Diese Befunde korrelieren mit der Beobachtung, dass sich in der lichtgealterten menschlichen Haut erhöhte Spiegel der Matrixmetalloproteinase-1 (Collagenase-1) und der Matrixmetalloproteinase-2 (72 Kilo Dalton Gelatinase) nachweisen lassen. Die der UV-induzierten Expression der Matrixmetalloproteinase-1 zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen wurden in den letzten Jahren im Detail charakterisiert. So führt UVB-Bestrahlung durch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, die wiederum Folge der Aktivierung so genannter MAP-Kinasen, nämlich der MAP-Kinasen JNK und p38, ist, zu einer verstärkten Transkription und schließlich zur Proteinsynthese der Matrixmetalloproteinase-1. Während dieser UVB-induzierte Signalweg vor allem für die epidermalen Keratinozyten von Bedeutung ist, ist UVA-Strahlung in der Lage, sowohl direkt in dermalen humanen Fibroblasten als auch indirekt, nämlich durch parakrine Mechanismen in epidermalen Keratinozyten in der Haut, die MMP-1 Expression zu induzieren. Die direkte Aktivierung wird ganz wesentlich durch die Generation von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere durch die Entstehung von Singulett-Sauerstoff, vermittelt.

Ein weiteres histologisches Charakteristikum einer lichtgealterten Haut ist die weitgehende Zerstörung oder signifikante Veränderung des elastischen Fasernetzwerkes. So findet sich normalerweise in der Haut von Kindern und jungen Menschen ein Netzwerk aus elastischen Fasern, das sich kontinuierlich von der dermo-epidermalen Junctionszone bis in die tiefe Dermis erstreckt und aus dicken, elastinreichen Fasern in der retikulären Dermis, einem Netzwerk aus feinen Fasern mit einem reduzierten Elastingehalt in den unteren Anteilen der papillären Dermis und einem kandelaberähnlichen Geflecht aus feinen, mikrofibrilären Bündeln, die kein Elastin enthalten, in der oberen papillären Dermis besteht. Es konnte gezeigt werden,⁴ dass Fibrillin-1, das ein wesentlicher Bestandteil dieser mikrofibrilären Bündel ist und das überwiegend von epidermalen Keratinozyten gebildet wird, in lichtgealterter Haut vermindert exprimiert wird und dass eine akute UV-Bestrahlung von zuvor lichtgeschützter Haut zu einer vorübergehenden Reduktion von Fibrillin-1 führt. Diese könnte Folge einer verstärkten Expression von Matrixmetalloproteinasen sein. Darüber hinaus ist eine chronisch lichtgealterte Haut vor allen Dingen durch signifikante Ablagerungen von trunziertem elastotischem Material charakterisiert. Es wird heute allgemein davon ausgegangen, dass diese Elastose eine Folge direkter biologischer Wirkungen der UV-Strahlung auf die Synthese der elastischen Fasern ist. So führen beispielsweise re-

³ Vgl. Berneburg *et al.* (2000).

⁴ Vgl. Berneburg *et al.* (2000).

aktive Sauerstoffspezies, die wesentliche Mediatoren der biologischen Wirkung von UV-Strahlung sind,⁵ zu einer verstärkten Tropo-Elastin-Synthese in Fibroblasten und tragen somit vermutlich wesentlich zur solaren Elastosebildung bei.

Die Rolle von Gefäßveränderungen bei der Lichtalterung

Die Neubildung von Gefäßen (Neo-Angiogenese) ist für die Pathogenese einer Vielzahl von Hauterkrankungen von fundamentaler Bedeutung. Aber auch die lichtgealterte Haut weist Gefäßveränderungen auf, die sich in dieser Form bei der intrinsisch gealterten Haut nicht finden. So kommt es insbesondere zu einer – zum Teil sehr stark ausgeprägten – Erweiterung und Verdrehung der Gefäße; insgesamt ist das horizontale Gefäßmuster stark gestört. UV-Strahlung ist zudem in der Lage, die dermale Vaskularisierung zu verstärken. In diesem Zusammenhang ist von großem Interesse, dass die Gefäßneubildung durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren und Inhibitoren der Angiogenese kontrolliert wird. Einige dieser Wachstumsfaktoren, wie z. B. bFGF, TGF- β und PDGF, haben darüber hinausgehende Funktionen, während Wachstumsfaktoren, die zur Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) und der Angiopoietine gehören, spezifisch angiogenetisch wirken. Neben diesen, die Gefäßneubildung und das Gefäßwachstum fördernden Molekülen konnten in den letzten Jahren jedoch auch natürlich vorkommende Hemmstoffe der Angiogenese identifiziert werden. Hierzu gehören die Thrombospondine, eine Familie von matrixzellulären Glyko-Proteinen. Thrombospondine lagern sich entlang der Basalmembran ab und bilden dort eine Anti-Angiogenese-Barriere, die es verhindert, dass sich Gefäße in der Epidermis bilden können.

Untersuchungen mit transgenen Mausmodellen haben nun erstmals gezeigt,⁶ dass neo-angiogenetische Prozesse auch von kausaler Bedeutung für die Pathogenese der Lichtalterung sind. So kommt es in transgenen Mäusen, die Thrombospondin-1 überexprimieren, nicht zu dem normalerweise nach einer UV-Bestrahlung zu beobachtenden Anstieg in der dermalen Vaskularisierung. Von besonderem Interesse ist nunmehr, dass diese Hemmung der UV-induzierten Vaskularisierung einhergeht mit einer deutlichen Reduktion der durch UV-Strahlung hervorgerufenen Lichtalterung, insbesondere der Faltenbildung in diesem Mausmodell. Diese Befunde deuten erstmals darauf hin, dass die dermale Vaskularisierung entscheidend mitbeteiligt ist an UV-induzierten Hautveränderungen, insbesondere an der UV-induzierten Hautalterung. Natürlich ist diese Beobachtung auch von unmittelbarer klinischer Relevanz, denn sie weist darauf hin, dass die Hemmung der Angiogenese ein möglicher Ansatzpunkt ist, um einer Lichtalterung der menschlichen Haut vorzubeugen.

Lichtalterung als chronischer Entzündungsprozess

Die intrinsisch gealterte menschliche Haut weist eine verminderte Zellzahl auf. So ist beispielsweise die Zahl der dermalen Fibroblasten sowie die der sich in der Dermis befindlichen Mastzellen gegenüber einer jungen Haut reduziert. Im Gegensatz dazu ist die lichtgealterte Haut durch eine zahlenmäßige Zunahme der dermalen Fibroblasten, die zudem hyperplastisch sind, sowie durch eine Zunahme der Zahl von Mastzellen, aber auch von Histiozyten und anderen mononukleären Zellen, charakterisiert. Diese Beobachtungen

⁵ Siehe auch weiter unten den Teil: „Die Bedeutung mitochondrialer DNS-Mutationen für die Lichtalterung“.

⁶ Vgl. Yano *et al.* (2002).

weisen darauf hin, dass die lichtgealterte Haut chronisch entzündet ist. Daher wurde dieser Zustand der Haut auch als Heliodermatitis oder Dermatoheliosis bezeichnet.⁷

Die exakte pathogenetische Bedeutung des zuvor beschriebenen entzündlichen Infiltrates in der Dermis der lichtgealterten Haut ist zurzeit nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass lösliche Mediatoren, die von diesen Zellen freigesetzt werden, die Produktion von Matrixmolekülen bzw. die Aktivität von Matrix degradierenden Enzymen, wie z. B. Matrixmetalloproteinasen, beeinflussen. Zelluläre Quellen für diese Entzündungsmediatoren sind zum einen residente Hautzellen, wie Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und vor allem Mastzellen, und zum anderen Haut infiltrierende Zellen, wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und T-Lymphozyten. Insbesondere für Mastzellen wurde bereits Ende der 1980er Jahre eine pathogenetische Bedeutung für die Lichtalterung der menschlichen Haut vermutet. So lassen sich Mastzellen in deutlich erhöhter Anzahl in lichtgeschädigter Haut im Vergleich zu lichtgeschützter Haut nachweisen. Mastzellen sind in der Lage, eine Reihe von Mediatoren, wie z. B. TNF- α , TGF- β und Prostaglandin, zu bilden, die wiederum in der Lage sind, direkt oder indirekt die Produktion von extrazellulärer Matrix und ihre Degradation zu beeinflussen. Neuere Untersuchungen haben zudem gezeigt, dass das T-lymphozytäre Infiltrat in der lichtgealterten Haut vor allem aus CD-4-positiven T-Zellen besteht. Es ist zurzeit noch nicht bekannt, ob es sich hierbei um Zellen handelt, die entzündliche bzw. immunologische Reaktionen verstärken, oder aber um so genannte regulatorische T-Zellen, die eher antientzündlich bzw. immunsuppressiv wirken würden. Aber nicht nur die T-Lymphozyten, sondern auch die Antigen präsentierenden Zellen sind in der lichtgealterten Haut zumindest zahlenmäßig verändert. So haben neuere ultrastrukturelle Untersuchungen gezeigt, dass sich in der lichtgealterten Haut in der Epidermis ein Infiltrat aus so genannten indeterminierten Zellen, d. h. Zellen, die sowohl Makrophagen als auch dendritischen Zellen ähneln, findet und dass die Ausbildung dieses Infiltrates einhergeht mit einer Abnahme der Anzahl epidermaler Langerhanszellen. Die pathogenetische Bedeutung dieser Veränderungen ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Proteinoxidation und Lichtalterung

Die Alterung von Zellen ist u. a. dadurch charakterisiert, dass es zu einer Anhäufung von Proteinen kommt, die durch Oxidation verändert wurden. Es wurde zudem die Hypothese aufgestellt, dass diese Veränderungen von pathogenetischer Bedeutung für den Alterungsprozess selbst sind.⁸ Eine Reihe neuerer Untersuchungen ist daher der Frage nachgegangen, inwieweit oxidierte Proteine auch vermehrt in der lichtgealterten menschlichen Haut nachgewiesen werden können. Die bislang vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, dass sich, ähnlich wie für andere Gewebe beschrieben, auch in humanen dermalen Fibroblasten mit zunehmendem Alter ein signifikanter Anstieg der Menge an oxidierten Proteinen findet.⁹

Neuere Untersuchungen an Hautbiopsien haben diesen Befund bestätigt und gezeigt, dass sich eine altersabhängige Zunahme des Proteinkarboxylgehaltes in der Epidermis nachweisen lässt. Oxidierte Proteine sind allgemein betrachtet weniger aktiv und weniger

⁷ Vgl. Berneburg *et al.* (2000).

⁸ Vgl. Levine und Stadtmann (2001).

⁹ Vgl. Merker *et al.* (demnächst).

stabil. Die Beobachtung, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Anhäufung von oxidierten Proteinen in Hautzellen zu kommen scheint, wirft die Frage auf, welche Mechanismen hierzu führen. Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass oxidativer Stress die wesentliche Ursache für eine vermehrte Proteinoxidation ist. Da UV-Strahlung die physiologisch relevanteste Quelle für oxidativen Stress in der menschlichen Haut ist, liegt ein Kausalzusammenhang mit einer chronischen UV-Exposition nahe. So war es in der Tat kürzlich erstmals möglich zu zeigen, dass die Lichtalterung mit einer vermehrten Proteinoxidation in der menschlichen Haut *in vivo* assoziiert ist. Aktuelle Forschungsarbeiten des IUF beschäftigen sich zurzeit intensiv mit der Aufklärung der Proteinoxidation und mit den in menschlichen Hautfibroblasten zugrunde liegenden biochemischen Mechanismen sowie den sich hieraus ergebenden funktionellen Konsequenzen. Unter Verwendung eines *In-vitro*- Seneszenzmodells der Hautfibroblasten konnte erstmals gezeigt werden,¹⁰ dass sowohl während der proliferativen Seneszenz als auch während der Seneszenz von Zellen, die sich nicht teilen, der Proteinumsatz sowie die Aktivität des proteasomalen Systems in diesen Zellen vermindert wird. Diese funktionellen Veränderungen gehen einher mit einer deutlichen Zunahme des Gehalts dieser Zellen an oxidierten Proteinen und einer Akkumulation von Lipofuscin-ähnlichem Material. Inwieweit es sich hierbei jedoch um ein Epiphänomen handelt oder aber ein Kausalzusammenhang besteht, muss durch zukünftige Studien geklärt werden. Interessant sind in diesem Zusammenhang auch neuere Beobachtungen, dass die Zunahme des Gehalts an oxidativ veränderten Proteinen nicht nur auf der UV-induzierten Generation dieser Proteine beruhen könnte, sondern dass UV-Strahlung auch in der Lage zu sein scheint, das die Proteine degradierende System, das so genannte Proteasom, funktionell zu beeinflussen. So wurde kürzlich erstmals beobachtet, dass die Aktivität der Proteasom-Peptidasen in menschlichen Keratinozyten sowohl durch eine UVA- als auch durch eine UVB-Bestrahlung reduziert werden kann.

Die Bedeutung mitochondrialer DNS-Mutationen für die Lichtalterung

In unabhängigen Untersuchungen von drei Arbeitsgruppen einschließlich des IUF konnte übereinstimmend gezeigt werden,¹¹ dass bei ein und demselben Individuum in chronisch lichtgealterter Haut im Vergleich zu sonnengeschützter Haut deutlich (bis zu zehnfach) erhöhte Mengen an mitochondrialen DNS-Mutationen nachweisbar sind. Der Hintergrund dieser Untersuchungen ist die so genannte mitochondriale Theorie des Alterns. Mitochondrien sind Zellorganellen, deren Hauptaufgabe darin besteht, die menschliche Zelle mit Energie zu versorgen. Der hierbei zu Grunde liegende Prozess wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. An der oxidativen Phosphorylierung sind insgesamt fünf Proteinkomplexe beteiligt, die im Bereich der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind und dort einen elektrochemischen Protonengradienten aufbauen, in dessen letztem Schritt aus ADP und Organo-Phosphat ATP hergestellt wird. Dieser Vorgang ist nicht vollkommen irrtumsfrei, d. h., es kommt permanent zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. In der Tat sind die Mitochondrien der Ort einer menschlichen Zelle mit der höchsten Produktionsrate an reaktiven Sauerstoffspezies. Dies bleibt nicht ohne biologische Konsequenzen, denn in unmittelbarer Nachbarschaft zur inneren mitochondrialen Membran liegt das den Mitochondrien eigene genetische Material, die so genannte mitochondriale

¹⁰ Vgl. Merker *et al.* (demnächst).

¹¹ Vgl. Berneburg *et al.* (1997).

DNS. Die menschliche mitochondriale DNS ist ein 16.559 Basenpaare langes, kreisförmiges und doppelsträngiges Molekül, das in vier bis zehn Kopien pro Zelle vorliegt. Die gesamte Information, die in diesem DNS-Molekül kodiert, wird für die Synthese von Proteinen verwendet, die wiederum an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind. Dies hat zur Folge, dass es durch das Auftreten von mitochondrialen DNS-Mutationen zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung kommt, wodurch vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, die wiederum zu einer vermehrten Bildung von mitochondrialen DNS-Mutationen führen. Dieser *Circulus vitiosus* spielt vermutlich nicht nur für das Auftreten einer Reihe sehr seltener degenerativer Erkrankungen, sondern auch für den normalen Alterungsprozess menschlicher Gewebe eine wichtige Rolle. Diese hypothetische Annahme basiert auf folgenden Beobachtungen:

1. mitochondriale DNS-Mutationen lassen sich nicht nur im Rahmen degenerativer Erkrankungen, sondern auch in normalem, gesundem menschlichen Gewebe nachweisen;
2. im normalen, gesunden Gewebe steigt der Gehalt an mitochondrialen DNS-Mutationen mit zunehmendem Gewebeeralter an;
3. diese Zunahme des Gehalts an mitochondrialen DNS-Mutationen geht einher mit einer eingeschränkten Fähigkeit der Gewebe, Sauerstoff zu verbrauchen;
4. dies wiederum korreliert mit einer verminderten Fähigkeit der betroffenen Gewebe, mittels oxidativer Phosphorylierung Energie zu erzeugen.

Zusammengenommen weisen diese vier Beobachtungen darauf hin, dass ein Kausalzusammenhang bestehen könnte zwischen dem Entstehen mitochondrialer DNS-Mutationen und dem fortschreitenden Alterungsprozess menschlicher Gewebe.

Die zuvor erwähnte Beobachtung, dass mitochondriale DNS-Mutationen im intraindividuellen Vergleich in lichtgealterter Haut in deutlich erhöhtem Ausmaß nachweisbar sind, weist zudem darauf hin, dass sie für den Lichtalterungsprozess der menschlichen Haut von Bedeutung sein könnten. In der Tat haben weiterführende Untersuchungen zwischenzeitlich zeigen können, dass keine Korrelation mit der intrinsischen Hautalterung zu bestehen scheint. Neueste Untersuchungen haben zudem erstmals belegt, dass nicht nur eine Assoziation zwischen dem Auftreten von mitochondrialen DNS-Mutationen und den klinischen Zeichen der chronischen Lichtschädigung besteht, sondern dass vielmehr UV-Strahlung kausal an der Entstehung mitochondrialer DNS-Mutationen beteiligt ist. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden. *In vitro* war es uns möglich, durch eine repetitive, mehrmals durchgeführte UVA-Bestrahlung in primären humanen dermalen Fibroblasten zeit- und dosisabhängig mitochondriale DNS-Mutationen zu induzieren.¹² Das Auftreten dieser mitochondrialen DNS-Mutationen war von funktioneller Relevanz, denn es kam zu einer Beeinträchtigung einer Reihe von mitochondrialen Funktionen und interessanterweise auch zu einer verstärkten Expression von Genen, die an der Pathogenese der Lichtalterung beteiligt sind, wie z. B. von Matrixmetalloproteinasen. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass das Entstehen mitochondrialer DNS-Mutationen die molekulare Grundlage der UV-induzierten Lichtalterung darstellen könnte. Kürzlich konnten wir zeigen, dass ähnliche Veränderungen auch *in vivo* induziert werden können.

¹² Vgl. Berneburg *et al.* (1999).

So war es möglich, in zuvor nicht UV-exponierter Haut bei gesunden Freiwilligen durch eine mehrfach täglich durchgeführte repetitive Bestrahlung über eine und zwei Wochen eine deutliche Zunahme des Gehalts an mitochondrialen DNS-Mutationen zu induzieren. Diese Zunahme ließ sich in der Dermis, nicht jedoch in der Epidermis beobachten.¹³

Interessanterweise blieben die einmal induzierten mitochondrialen DNS-Mutationen auch nach Beendigung der repetitiven Bestrahlung in einem erhöhtem Ausmaß über Jahre hinweg weiter bestehen. Von besonderem Interesse ist hierbei, dass es bei einigen der Probanden auch ohne weitere Bestrahlung zu einer kontinuierlichen Zunahme des Gehalts an mitochondrialen DNS-Mutationen kam. Dies ist der erste *In-vivo*-Hinweis darauf, dass die eingangs erwähnte Hypothese von der Existenz eines *Circulus vitiosus*, der durch das Entstehen von mitochondrialen DNS-Mutationen in Gang gesetzt wird und zu einem verstärkten Alterungsprozess ursächlich beiträgt, in der Tat in menschlichen Geweben im Allgemeinen und in der aktinisch geschädigten menschlichen Haut im Besonderen zu existieren scheint. Aktuell im IUF durchgeführte Arbeiten untersuchen, inwieweit das Auftreten der mitochondrialen DNS-Mutationen die zuvor beschriebenen molekularen, biochemischen und zellulären Veränderungen, die für die lichtgealterte menschliche Haut charakteristisch sind, zu erklären vermögen.¹⁴

Chromophore und Mediatoren der Lichtalterung

Das wichtigste Chromophor für die UVB-Bestrahlung in der menschlichen Haut ist die zelluläre DNS. UVB-Strahlung ist in der Lage, in der DNS zwischen benachbarten Pyrimidinbasen eines DNS-Stranges Photoprodukte zu induzieren. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Zyklobutanpyrimidindimere und 6-4 Photoprodukte. Obwohl die exakte kausale Bedeutung UVB-induzierter DNS-Schäden für den Prozess der Lichtalterung bisher nur unzureichend untersucht worden ist, gibt es eine Reihe von sehr gewichtigen Gründen für die Annahme, dass die Generation von DNS-Photoprodukten als Auslöser für eine Vielzahl der zuvor beschriebenen Vorgänge fungieren kann. So besteht beispielsweise heute kein Zweifel mehr daran, dass die UVB-induzierte Generation von Zytokinen in epidermalen Keratinozyten auf der Entstehung von Zyklobutanpyrimidindimeren beruht. Zudem konnten wir kürzlich erstmals zeigen, dass die topische Applikation von DNS-reparaturenzymhaltigen Liposomen, die in der Lage sind, spezifisch UVB-induzierte Zyklobutanpyrimidindimere zu reparieren, dazu führt, dass es zu einer signifikanten Hemmung der UVB-induzierten Induktion der Matrixmetalloproteinase-1 in der Epidermis kommt.

Neben Nukleinsäuren sind aber auch Proteine in der Lage, als Chromophore für UVB zu fungieren. Als Aminosäuren sind hier neben Tryptophan und Tyrosin die im dermalen Kollagen und Elastin enthaltenen Aminosäuren Desmosin und Isodesmosin zu nennen.

Oxidative Prozesse sind vermutlich von herausragender Bedeutung für das Entstehen UVA-induzierter biologischer Wirkungen in der menschlichen Haut. Von besonderer Wichtigkeit scheint in diesem Zusammenhang die Generation von Singulett-Sauerstoff zu sein. So konnten wir in Kooperation mit dem Institut für Physiologische Chemie I (Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Sies) unserer Universität zeigen, dass Singulett-Sauerstoff ein wichtiger Mediator der UV-induzierten Generation von mitochondrialen DNS-Mu-

¹³ Vgl. Berneburg *et al.* (2000).

¹⁴ Vgl. Berneburg *et al.* (2000).

tationen in dermalen humanen Fibroblasten ist.¹⁵ Darüber hinaus spielt Singulett-Sauerstoff auch eine wesentliche Rolle als Mediator der UVA-induzierten Expression der Matrixmetalloproteinase-1 in dermalen humanen Fibroblasten. Zudem wurde beobachtet, dass neben Singulett-Sauerstoff auch Hydrogenperoxid an der UVA-induzierten Expression der Matrixmetalloproteinase-1, -2 und -3 beteiligt ist.¹⁶ Im Gegensatz hierzu erscheint die UVB-induzierte, durch oxidativen Stress vermittelte Expression von MMP-1 und MMP-3 vor allem durch Hydroxyl-Radikale und Lipidperoxidations-Produkte vermittelt zu sein. Reaktive Sauerstoffspezies sind zudem in der Lage, auf die Synthese elastischer Fasern in der menschlichen Haut einzuwirken. So kommt es nach einer Generation von reaktiven Sauerstoffspezies zu einer verstärkten Expression von Tropo-Elastin-mRNS – ein Mechanismus, der wesentlich zur solaren Elastogenese beitragen könnte.

Hautalterung durch andere exogene Noxen

Weitere Umweltnoxen, die wesentlich am Alterungsprozess der menschlichen Haut beteiligt sind, sind Tabakrauch, Infrarotstrahlung und Ozon. Darüber hinaus ist zumindest theoretisch davon auszugehen, dass letztlich jede Umweltnoxe, die in der Lage ist, in die Haut einzudringen und oxidativen Stress hervorzurufen, für vorzeitige Alterungsprozesse von pathogenetischer Bedeutung sein könnte. Da hinsichtlich der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen vor allen Dingen für den Tabakrauch, die Infrarotstrahlung und im geringeren Ausmaß auch für eine Ozonbelastung experimentelle Daten verfügbar sind, sollen hier diese drei exogenen Noxen im Detail diskutiert werden.

Tabakrauch und Hautalterung

Epidemiologische Studien haben eindeutig gezeigt, dass eine Assoziation besteht zwischen dem Rauchen von Tabak und dem Alterungsprozess der menschlichen Haut. So kommt es bei Rauchern signifikant häufiger zur Ausbildung einer ausgeprägten Faltenbildung im Bereich der Gesichtshaut als bei Nichtrauchern. Dieser Unterschied lässt sich nicht nur bei jüngeren, sondern auch bei älteren Menschen (Durchschnittsalter 76 Jahre) nachweisen. Neuere epidemiologische Untersuchungen weisen zudem darauf hin, dass Tabakrauch ein Faktor ist, der unabhängig vom Lebensalter und unabhängig von der Sonnenexposition zur Hautalterung beiträgt.¹⁷ Im Einklang mit dieser epidemiologischen Beobachtung stehen mechanistische Studien, die sich mit der Analyse der molekularen Grundlagen der durch Tabakrauch induzierten vorzeitigen Hautalterung beschäftigen. So konnte gezeigt werden, dass nicht nur eine UV-Bestrahlung, sondern auch eine Stimulation mit Tabakrauch in primären humanen dermalen Fibroblasten zu einer signifikanten Aufregulation der Expression der Matrixmetalloproteinase-1 führt und dass die kombinierte Stimulation einen additiven Effekt hat.¹⁸ Neben einer Induktion der Matrixmetalloproteinase-1 wurde in *In-vitro*-Untersuchungen nach Stimulation von Fibroblasten auch eine deutliche Aufregulation der Matrixmetalloproteinase-3 Expression, und zwar in beiden Fällen sowohl auf der mRNS- als auch auf der Proteinebene, beobachtet. Im Gegensatz hierzu

¹⁵ Vgl. Berneburg *et al.* (1999).

¹⁶ Vgl. Berneburg *et al.* (2000).

¹⁷ Vgl. Yin *et al.* (2000).

¹⁸ Vgl. Yin *et al.* (2000).

kam es zu keiner veränderten Expression der gewebespezifischen Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, d. h. von TIMP-1 und TIMP-3.¹⁹ Zigarettenrauch hat aber auch direkte Wirkung auf die Kollagenbiosynthese. So zeigte sich in humanen Fibroblasten, die mit einem wasserlöslichen Extrakt, der aus Tabakrauch hergestellt worden war, behandelt wurden, dass es zu einem verminderten Gehalt an Kollagen im Überstand der Zellen kam. Dies ging einher mit einer ca. 40-prozentigen Reduktion der Kollagenbiosynthese.²⁰ In weiterführenden Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass diese durch Tabakrauch induzierten Veränderungen durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt werden, denn es war möglich, sie durch Zugabe von Antioxidantien, insbesondere von Singulett-Sauerstoffängern, zu inhibieren. Die Rolle der verminderten Expression der Matrixmetalloproteinase bei durch Tabakrauch induzierter vorzeitiger Hautalterung wurde zudem kürzlich in *In-vivo*-Untersuchungen bestätigt. Mittels *real time*-PCR wurde nachgewiesen, dass der Gehalt an MMP-1 mRNA in der Haut von Rauchern signifikant höher ist als in der Haut von Nichtrauchern, wohingegen kein Unterschied beobachtet werden konnte, wenn die Expression des gewebespezifischen Inhibitors der Matrixmetalloproteinase-1 (TIMP-1) untersucht wurde.

Über weitere Mechanismen, die an der durch Tabakrauch induzierten vorzeitigen Hautalterung beteiligt sein könnten, gibt es bislang keine Informationen. Grundsätzlich kann aber davon ausgegangen werden, dass viele der zuvor für UV beschriebenen Mechanismen auch für die durch Tabakrauch induzierte Hautalterung relevant sind. So ist beispielsweise bekannt, dass in Lungenepithelzellen Tabakrauch in der Lage ist, mitochondriale DNS-Mutationen zu generieren. Auch wenn dies bislang noch nicht für kultivierte humane dermale Fibroblasten oder aber für die menschliche Haut *in vivo* gezeigt werden konnte, liegt doch zumindest die Vermutung nahe, dass ganz ähnliche Wirkungen auch für die Hautalterung von Bedeutung sein könnten. Eine weitere Aufklärung dieser Mechanismen ist für die exakte Beurteilung von kosmetischen Strategien, die die Haut vor einem vorzeitigen Alterungsprozess schützen sollen, von großer Bedeutung.

Infrarotstrahlung

Sonnenstrahlung, die auf die menschliche Haut auftrifft, umfasst einen Spektralbereich von 290 bis 4.000 nm und damit neben der ultravioletten Strahlung (290 bis 400 nm) auch sichtbares Licht (400 bis 700 nm) sowie Infrarotstrahlung (700 bis 4.000 nm) (Abb. 1). Zudem wird die menschliche Haut nicht nur natürlicher Infrarotstrahlung ausgesetzt, sondern auch Infrarotstrahlung aus künstlichen Strahlungsquellen. Hierzu gehören neben therapeutisch eingesetzten Infrarotbestrahlungsgeräten, die beispielsweise in der Physiotherapie oder bei der Krebsbehandlung als adjuvante Therapieprinzipien verwendet werden, auch die kontaminierende Infrarotbestrahlung, die von UVA-Bestrahlungsgeräten stammt, wie sie beispielsweise in Sonnenstudios verwendet werden. Man muss heute davon ausgehen, dass Infrarotstrahlung ähnlich wie auch UV-Strahlung in der Lage ist, eine Reihe von biologischen Wirkungen an der menschlichen Haut auszulösen. So konnte bereits vor mehr als 20 Jahren von Kligman erstmals gezeigt werden, dass eine chronische Infrarotbestrahlung in enthaarten Albinomeerschweinchen Hautveränderungen hervorruft, die klinisch

¹⁹ Vgl. Yin *et al.* (2000).

²⁰ Vgl. Yin *et al.* (2000).

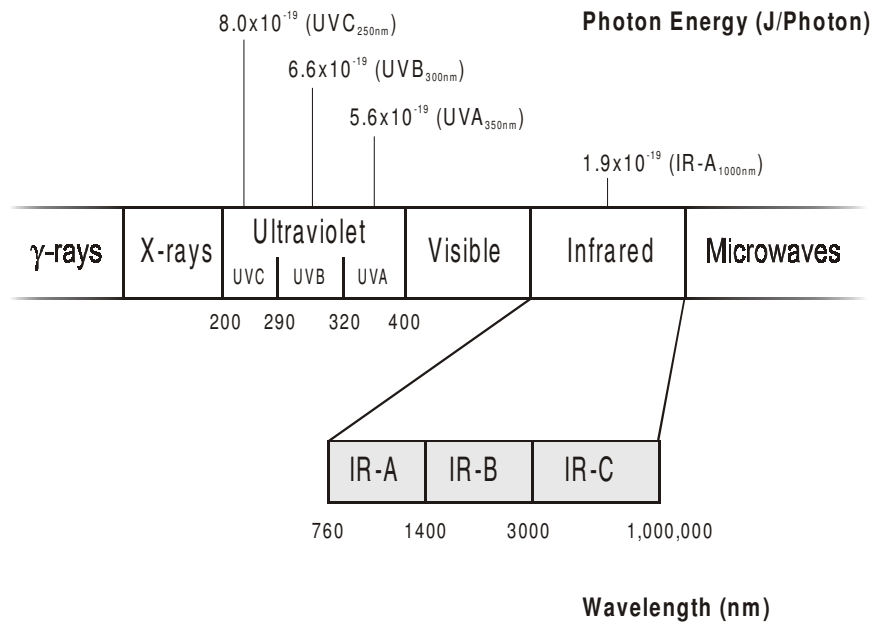


Abb. 1

und histologisch denjenigen entsprechen, die sich nach einer durch UV-Strahlung hervorgerufenen Elastose beobachten lassen.

Lange Zeit war die molekulare Grundlage dieser durch Infrarotstrahlung hervorgerufenen Hautalterung nicht bekannt. Neueste Untersuchungen von Mitarbeitern des IUF haben nun erstmals gezeigt, dass Infrarotstrahlung in der Lage ist, die Expression von Genen, die ursächlich am Lichtalterungsprozess der menschlichen Haut beteiligt sind, zu induzieren.²¹ So zeigte sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, dass eine Bestrahlung kultivierter humaner Fibroblasten bzw. menschlicher Haut mit sehr niedrigen, physiologisch relevanten Dosen von Infrarot-A-Strahlung (760 bis 1.400 nm) zu einer signifikanten Induktion der Matrixmetalloproteinase-Expression auf mRNA- und Proteinebene kommt. Die weitere Analyse der zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen dieser Genexpression ergab sodann, dass Infrarotstrahlung ein potenter Aktivator des MAP-Kinasen-Signalwegs ist.²² So führt eine Infrarotbestrahlung in humanen dermalen Fibroblasten zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK 1/2 und p38. Diese Aktivierung ist von funktioneller Bedeutung, denn eine Hemmung der ERK 1/2-Aktivierung mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors verhinderte die durch Infrarotstrahlung induzierte Expression der Matrixmetalloproteinase-1.²³ Diese Untersuchungen zeigen, dass Infrarotstrahlung, ähnlich wie UV-Strahlung, in der Lage ist, molekulare Veränderungen in der menschlichen Haut hervorzurufen, die ursächlich zum beschleunigten Alterungsprozess beitragen können.

Ozon und andere Umwelttoxene

Da viele der in der Umwelt vorkommenden Noxen in der Lage sind, oxidativen Stress zu induzieren, ist es nahe liegend, dass neben UV-Strahlung, Tabakrauch und Infrarotstrahlung auch weitere Umweltfaktoren zum vorzeitigen Alterungsprozess der menschlichen

²¹ Vgl. Schieke *et al.* (2002).

²² Vgl. Schieke *et al.* (2002).

²³ Vgl. Schieke *et al.* (2002).

Haut beitragen. Ein Beispiel hierfür ist Ozon, das einer der Hauptbestandteile von Smog ist, wie er in stark verkehrsbelasteten Regionen während der sonnenreichen Jahreszeit auftritt. Ozon ist ein potentes Oxidans. Daher wurde eine Reihe von Untersuchungen durchgeführt, um die biologische Wirkung von Ozon auf die menschliche Haut zu erfassen.²⁴ Untersuchungen an der Maushaut ergaben beispielsweise, dass eine Exposition mit Ozon zu einer Verminderung des Gehalts an Antioxidantien führt, die sich im *stratum corneum* nachweisen lassen.²⁵ Besonders empfindlich gegenüber einer Ozonexposition zeigte sich hier das im *stratum corneum* vorhandene Vitamin E. Interessanterweise wurden ähnliche Effekte auch nach einer UV-Bestrahlung beobachtet. Die Kombination aus UV und Ozon, die physiologisch hoch relevant ist, da es gerade in der sonnenreichen Jahreszeit zu einer vermehrten Ozonbildung in Gebieten mit einer hohen Verkehrsdichte kommt, zeigte eine weitere Potenzierung dieses Effektes. Neben den Wirkungen auf das Stratum corneum und die dort vorhandenen antioxidativen Systeme scheint Ozon aber auch Wirkungen auf tiefere Schichten der Haut ausüben zu können. Nach einer Ozonexposition von haarlosen Mäusen konnte in der Haut dieser Tiere eine 20fache Aufregulation des Hitzeschockproteins 27 sowie eine verzögerte Induktion des Hitzeschockproteins 70 und der Hämoxigenase-1 beobachtet werden. Zudem zeigte sich eine deutliche Aufregulation der Expression der Matrixmetalloproteinase-9, und zwar sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene.²⁶ Obwohl diese Untersuchungen noch keinen direkten Zusammenhang mit einem vorzeitigen Alterungsprozess der menschlichen Haut aufzeigen, legen sie doch nahe, dass Ozon in der Lage ist, das antioxidative Potential der menschlichen Haut zu beeinflussen und auch in ihren tieferen Schichten Stressantworten hervorzurufen, die letztlich zu einem vorzeitigen Alterungsprozess beitragen können.

Ein weiterer Umweltfaktor, der von immer größer werdender Relevanz für die menschliche Gesundheit ist, sind Stäube. Obwohl zurzeit allgemein davon ausgegangen wird, dass feine und insbesondere ultrafeine Partikel nicht in die menschliche Haut eindringen können, weisen neuere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe darauf hin, dass zumindest eine follikuläre Penetration möglich ist. Die pathogenetische Bedeutung des Eindringens von feinen und ultrafeinen Partikeln in die Haarfollikel ist zurzeit noch unbekannt. In diesem Zusammenhang ist auch wichtig, dass diese hautphysiologischen Untersuchungen bisher ausschließlich an Menschen mit intakter Hautbarriere durchgeführt worden sind. Es ist gut vorstellbar, dass im Falle einer geschädigten Barriere, wie sie sich z. B. bei Personen mit atopischer Diathese findet, eine Partikelpenetration stattfindet, die über die ausschließlich follikuläre Route hinausgeht. Da feine und insbesondere ultrafeine Partikel auf Grund ihrer großen Oberfläche sehr gut in der Lage sind, oxidative Prozesse zu induzieren, ist es zumindest theoretisch vorstellbar, dass sie ebenfalls zu einem vorzeitigen Alterungsprozess der menschlichen Haut beitragen können. Diese Hypothese wird zurzeit in aktuellen Untersuchungen überprüft.

Abschließende Bemerkungen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in den letzten Jahren enorme Fortschritte erzielt worden sind bei der Aufklärung der molekularen Mechanismen, durch die Umweltfakto-

²⁴ Vgl. Weber *et al.* (2001).

²⁵ Vgl. Weber *et al.* (2001).

²⁶ Vgl. Weber *et al.* (2001).

ren die menschliche Haut vorzeitig altern lassen. Die hierbei am Modellorgan Haut gewonnenen Erkenntnisse sind in mehrfacher Hinsicht für andere Organsysteme von Bedeutung und haben zu einem besseren generellen Verständnis grundlegender molekularer Alterungsprozesse beigetragen. Eine wesentliche Aufgabe der Forschung der nächsten Jahre wird es sein, die bislang gemachten Beobachtungen zu einem Gesamtkonzept zusammenzufügen, das es erlaubt, Epiphänomene von kausal bedeutenden Veränderungen zu unterscheiden. Dies wiederum wird es ermöglichen, die Bemühungen um die Entwicklung effektiver protektiver und vielleicht auch verjüngend wirkender Maßnahmen auf eine wissenschaftlich fundierte, rationale Basis zu stellen.

Bibliographie

- BERNEBURG, M., H. PLETTENBERG und J. KRUTMANN. „Photoaging of human skin“, *Photodermatology, Photoimmunology, Photomedicine* 16 (2000), 239-244.
- BERNEBURG, M., N. GATTERMANN, H. STEGE, M. GREWE, K. VOGELSANG, T. RUZICKA und J. KRUTMANN. „Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system“, *Photochemistry and Photobiology* 66 (1997), 271-275.
- BERNEBURG, M., S. GREYER-BECK, V. KÜRTEIN, T. RUZICKA, K. BRIVIBA, H. SIES und J. KRUTMANN. „Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion“, *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), 15345-15349.
- FISHER, G. J., Z. Q. WANG, S. C. DATTA, J. VARANI, S. KANG und J. J. VORHEES. „Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light“, *New England Journal of Medicine* 337 (1997), 1419-1428.
- LEVINE, R. L. und E. R. STADTMAN. „Oxidative modification of protein during ageing“, *Experimental Gerontology* 36 (2001), 1495-1502.
- MERKER, K., O. ULLRICH, N. SITTE und T. GRUNE. „Stability of the nuclear protein turnover during cellular senescence of human fibroblasts“, *FASEB Journal* (demnächst).
- SCHIEKE, S., H. STEGE, V. KÜRTEIN, S. GREYER-BECK, H. SIES und J. KRUTMANN. „Infrared A radiation-induced matrix metalloproteinase-1 expression is mediated through ERK1/2 activation in human dermal fibroblasts“, *Journal of Investigative Dermatology* 119 (2002), 1323-1329.
- WEBER, S. U., N. HAN und L. PACKER. „Ozone: An emerging oxidative stressor to skin“, *Current Problems in Dermatology-US* 29 (2001), 52-61.
- YANO, K., H. OURA und M. DETMAR. „Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo-damage“, *Journal of Investigative Dermatology* 118 (2002), 800-805.
- YIN, L., A. MORITA und T. TSUJI. „Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract“, *Archives of Dermatological Research* 292 (2000), 188-194.