

Grant TD CNCSIS 166/2002-2004

MECANISME CELULARE ȘI MOLECULARE ALE PROCESULUI DE FOTOÎMBĂTRÂNIRE EVIDENȚIATE LA NIVELUL FIBROBLASTELOR ȘI KERATINOCITELOR DIN PIELE

Termenul de fotoîmbătrânire (« *photoaging* »), abreviat aici **PA**, descrie caracteristicile clinice, histologice și funcționale ale pielii expuse cronic la soare. Pielea îmbătrânită normal, neexpusă cronic luminii solare, este caracterizată prin ridare, uscare, subțiere și keratoză seboreică. În cazul PA, pe lângă modificări similare, dar care apar timpuriu, se observă tăbăcirea pielii, ridare excesivă, elasticitate redusă, fragilitate crescută, pierderea tonusului pielii, capacitate de vindecare scăzută, etc. Majoritatea acestor caracteristici sunt datorate unor modificări la nivelul dermei. Cele mai profunde modificări epidermice au ca rezultat o hiperpigmentare difuză [Berneburg și colab., 2000].

Spectrul solar ce ajunge pe pământ conține radiații UV [UVR] cu lungimi de undă scurte UVC (<280 nm), intermediare UVB (280-320 nm) și lungi UVA (320-400 nm). În condiții fiziologice, celulele pielii sunt expuse exclusiv la radiații UVB și UVA, deoarece stratul de ozon din atmosferă absoarbe complet lungimile de undă < 290 nm. Nivelul radiației UVA care atinge suprafața pământului este de aproximativ 20 ori mai mare decât cel al radiației UVB, astfel că radiația UVA solară contribuie în cea mai mare măsură la procesele de PA și de foto-carcinogeneză [Krutman, 2000].

Lumina UV penetrează pielea, în funcție de lungimea ei de undă, interacționând cu diferite celule ce au localizări diferite. Radiațiile UVB sunt majoritar absorbite în epidermă afectând keratinocitele [KC], în timp ce UVA penetrează mai adânc și pot interacționa atât cu KC epidermice cât și cu fibroblastele [FB] dermice. Pigmenții melaninici din piele absorb lumina UV protejând celulele pielii contra efectelor nocive ale expunerii UV.

UVB și UVA generează la nivelul celulelor pielii un stres oxidativ sever prin interacția cu cromofori și fotosensibilizatori intracelulari, producând leziuni genetice, tranzitorii și permanente, activarea unor căi citoplasmice de transmitere a semnalelor ce controlează creșterea, diferențierea, degradarea și senescența țesutului conjunctiv.

Alterări epidermice

Histologic, foto-leziunile epidermice cronice sunt caracterizate prin suprafețe cu atrofie și hiperplazie severă, cu KC caracterizate printr-un grad de atipie nucleară. Aceste modificări reflectă disfuncții în reglarea creșterii KC expuse la UVR, a căror cauză nu este încă elucidată, dar se consideră că citokinele derivate din KC sunt, cel puțin parțial, implicate în acest proces [Kondo, 2000]. Anomaliile în pigmentație pot fi mediate de citokinele care reglează creșterea, diferențierea și sinteza pigmentilor melaninici din melanocite [MC]. Datorită localizării lor în piele, MC sunt afectate de citokinele derivate nu numai din KC dar și din celulele dermice, incluzând FB și celulele inflamatoare. În cazul celulelor Langerhans [LC] din pielea foto-îmbătrânită se observă o scădere a numărului lor precum și modificări morfologice [Toyoda și Bhawan, 1997].

Alterări dermice

Majoritatea modificărilor în pielea foto-îmbătrânită sunt observate în dermă. La nivel histologic, se observă atrofia ME cu dezintegrarea fibrelor de elastină și scăderea nivelului colagenului maturat. Conținutul în colagen de tip VII ce contribuie la stabilizarea joncțiunii epidermă-dermă este sever redus în PA. Se observă o creștere în depunerea glicozaminoglicanilor și a unui material elastotic distrofic în profunzimea dermei și severa dezorganizare a tropoelastinei și fibrilinei. Fibrele elastice, ce constituie elemente structurale ale țesutului conjunctiv, conțin un miez, amorf și hidrofob, format din molecule de elastină, care este înconjurat de miofibrile bogate în fibrilină. Deoarece această rețea de fibre elastice se extinde de la joncțiunea dermă-epidermă spre profunzimea dermei, modificările observate conduc la pierderea elasticității pielii. În afara de modificările observate în organizarea componentelor structurale ale țesutului conjunctiv, fibroblastele în PA adoptă un fenotip stelat, cu un reticul endoplasmatic rugos activat

indicând o activitate biosintetică crescută [Scharffetter-Kochanek și colab., 2000].

Caracteristicile biochimice ale PA

Utilizând o linie transgenică de șoarece s-a demonstrat că activitatea genei *CAT* reporter din promotorul elastinei este crescută în urma iradierii UV. Studii de hibridizare *in situ* au demonstrat scăderea nivelului mRNA fibrilinei-1 și menținerea mRNA fibrilinei-2 în biopsii de piele foto-lezată în comparație cu situsurile dermice foto-protejate. Această observație corelată cu scăderea nivelului fibrilinei din joncțiunea dermă-epidermă sugerează un proces de remodelare a pielii foto-îmbătrânite. Utilizând tehnici de dozare HPLC a hidroxi-prolinei, analize Northern Blot și imuno-detectare cu anticorpi contra amino propeptidei din procolagenul nou sintetizat, s-a evidențiat că nivelul colagenului tip I, componentul structural major al țesutului conjunctiv din dermă ce-i conferă rezistența mecanică, este mult scăzut în pielea foto-îmbătrânită [Scharffetter-Kochanek și colab., 2000].

În afara modificărilor post-tranzlaționale ale moleculelor de colagen nou sintetizate, UVR afectează o serie de metaloproteinaze matriceale (MMP), serin proteinaze și alte proteinaze, responsabile pentru scindarea diferitelor componente ale țesutului conjunctiv. Aceste enzime care se găsesc în FB dermice și în celulele inflamatorii au o activitate crescută, explicând degradarea ME în PA.

Metaloproteinazele matriceale (MMP) sunt enzime care mediază hidroliza moleculelor structurale din matricea extracelulară (ME) - colageni, proteoglicani și glicoproteine - atât *in vivo* cât și *in vitro*. Ele sunt secretate în forme latente (*proMMP*) care sunt activate în spațiul extracelular prin scindarea unei propeptide N-terminale. Familia MMPs este reprezentată de cel puțin 19 produși genici diferiți repartizați în 5 subfamilii în funcție de proprietățile lor structurale și enzimatic: colagenazele interstițiale (MMP-1, MMP-8, MMP-13, și MMP-18); colagenaze tip IV / gelatinaze (MMP-2 și MMP-9); stromelazine (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11 și MMP-12); metaloproteinaze matriceale de tip membranar (MMP-14, MMP-15, MMP-16 și MMP-17) și altele (MMP-19 și MMP-20). În timp ce MMP-1 scindează numai colagenul tip I, MMP-2 degradează elastina și compușii membranei bazale incluzând colagenul tip IV și tip VII. MMP-3 relevă cea mai largă specificitate de substrat scindând colagenul tip IV, proteoglicani, fibronectina și laminina. Recent, s-a dovedit că fibrilina este ținta atacului proteolitic a unor MMP și serin-proteinaze ca elastaza din neutrofile [Scharffetter-Kochanek și colab., 2000].

Unele MMPs nu sunt exprimate constitutiv în țesuturile normale dar pot fi induse de către unii factori: citokine, factori de creștere. Aceste enzime au un rol major în remodelarea matriceală de la nivelul pielii supuse unui proces inflamator de lungă durată [Kahari și Saarialho-Kere, 1997].

Reglarea ME implică un echilibru între sinteza componentelor sale structurale și degradarea lor sub acțiunea catalitică a MMP - a căror funcție biologică este modulată de inhibitori tisulari specifici TIMP.

În PA sunt implicate cel puțin trei membri ai familiei MMP [Fisher și Voorhees, 1998]:

- colagenaza care scindează colagenul tip I și III fibrilar ;
- gelatinaza de 92 kDa care scindează mai departe produșii acțiunii colagenazei, degradând și colagenul tip IV și elastina;
- stromelina, care degradează colagenul tip IV, elastina și alte molecule ale ME, ca proteoglicanii și lamininele.

Generarea speciilor active de oxigen

Deși este unanim acceptat că nivele scăzute ale speciilor reactive ale oxigenului (SRO) sunt produse continuu *in vivo* și sunt implicate în procese fiziologice - s-au acumulat date experimentale care indică faptul că după iradierea UVA și UVB a pielii se formează concentrații mari de SRO.

Radiațiile UVB (280-320 nm) sunt absorbite direct de acizii nucleici cu formarea unor foto-produși dipirimidinici care pot iniția cancerul pielii prin supresia sistemului imun din piele ce permite creșterea necontrolată a celulelor. Leziunile DNA induse de SRO includ scindări mono- și dicatenare, formarea de situsuri abazice și modificări ale bazelor [Kochanek și colab., 1995; Berneburg și colab., 2000].

În afara absorbției directe a fotonilor UVB de către DNA ce are ca rezultat modificări structurale, generarea ROS ca urmare a UVR necesită absorbția fotonilor de către molecule fotosensibilizator endogene. Recent s-a pus în evidență că acidul *trans*-urocanic este un cromofor epidermic care absoarbe UVA, devine excitat și reacționează cu O₂ generând SRO, incluzând anionul superoxid (O₂⁻) și oxigen singlet (¹O₂) [Scharffetter-Kochanek și colab., 2000]. Cele două specii SRO sunt produse și de neutrofile a căror număr este crescut în pielea foto-lezată și contribuie la instalarea unei stări pro-oxidante. Superoxid dismutaza transformă O₂⁻ în peroxid de hydrogen, care străbate ușor membranele celulare și în prezența Fe(II) generează radicali hidroxil (OH•) extrem de nocivi [reacția Fenton]. Oxigenul singlet și radicalii hidroxil pot iniția peroxidarea membranelor celulare cu generarea de grupări carbonil cu consecințe încă puțin cunoscute.

Acumularea elastinei și degradarea colagenului sunt principalele modificări ale țesutului conjunctiv în PA. S-a demonstrat că SRO cresc nivelul mRNA tropoelastinei [Kawaguchi și colab., 1997] ce joacă un rol esențial în metabolismul colagenului. Astfel SRO distrug direct colagenul interstițial, activează MMP ce degradează ME și inactivează inhibitorii lor TIMP [Scharffetter-Kochanek și colab., 2000]. Studiile pe linii celulare care supraexprimă enzime antioxidante și cu agenți de chelatare care blochează reacția Fenton sugerează faptul că iradierea UVA induce formarea oxigenului singlet și a H₂O₂, care provoacă creșterea conținutului în mRNA și proteine pentru MMP-1, MMP-2 și MMP-3 [Wenk și colab., 1999], în timp ce radicalii hidroxil și intermediari din peroxidarea lipidelor joacă un rol major în inducția UVB a MMP-1 și MMP-3 [Brenneisen și colab., 1998].

Datele accesibile sugerează că oxigenul singlet generat de UVA poate iniția căi de semnalizare implicând JNK (*c-Jun N-terminal kinaza*) și proteina p38 [Klotz și colab., 1999], membri ai superfamiliei MAP kinazelor (*mitogen-activated protein kinases*) și citokinele IL-1 și IL-6 conducând la o expresie crescută a MMP [Scharffetter-Kochanek K., și colab., 1993].

Sisteme de apărare contra SRO

În celulele pielii există enzime antioxidative: Cu/Zn superoxid dismutaza (SOD₁), Mn superoxid dismutaza mitocondrială (SOD₂) catalaza (CAT), glutation reductaza (GR) și glutation peroxidaza (GPx), care constituie un mecanism defensiv important de apărare contra leziunilor UV. Ele acționează ca niște *scavengeri* selectivi pentru SRO produși de UVR ce protejează lipoproteinele membranare contra foto-leziunilor. Altă activitate antioxidantă este prezentată de metalotioneina care acționează ca un scavenger de radicali liberi și joacă un rol important în fotoprotecția contra PA [Miyachi, 1995]. Leccia și colab. [2001] au demonstrat că expunerea pielii la iradiere solară scade inițial nivelurile mRNA și proteice ale enzimelor scavenger, după care se dezvoltă răspunsuri adaptative caracterizate prin creșterea activităților în special a SOD₂.

Mutații în mtDNA induse de UV

Mitocondriile sunt organite intracelulare a căror funcție principală este generarea energiei celulare prin fosforilare oxidativă, realizată de cinci ansambluri proteice codificate atât de DNA nuclear cât și de genomul mitocondrial (*mtDNA*). În cursul fosforilării oxidative se eliberează SRO, care afectează *mtDNA* – o moleculă dublu catenară circulară de 16 559 pb, cu 4-10 copii/celulă. Deoarece mitocondria nu conține toate mecanismele de reparare pentru a îndepărta leziunile de la nivelul DNA, frecvența mutațiilor în *mtDNA* este de 50 ori mai mare decât în DNA nuclear [Richter, 1995]. Mutațiile *mtDNA* stau la baza multor maladii degenerative ca maladia Alzheimer, oftalmoplegia externă progresivă cronică și a sindromului Kearns-Sayre. În afară de maladiile degenerative, mutațiile în *mtDNA* sunt critice în procesul fiziologic de îmbătrânire fiind însoțite de declinul funcției mitocondriale.

Dovezi recente indică faptul că mutațiile din *mtDNA* sunt implicate și în PA, demonstrându-se că expunerea cronică la soare a pielii conduce la o frecvență mai mare a mutațiilor în *mtDNA* decât în pielea protejată de soare [Berneburg și colab., 2000; Stege și colab., 2000]. Cea mai frecventă și bine caracterizată mutație în *mtDNA* este o deleție de 4 977 pb în lungime, numită *deleție comună*, considerată un marker pentru mutațiile genomului mitocondrial. Mecanismul prin care această mutație comună este generată nu se cunoaște, dar Shoffner și colab. [1989] au propus un mecanism care implică anelarea greșită a unor secvențe direct-repetitive, proces mediat de SRO.

S-a demonstrat, de asemenea, o strânsă corelație între existența deleției comune, scăderea funcției mitocondriale (reducere a consumului celular de oxigen și a potențialului membranei mitocondriale ($\Delta\psi$) și expresia unor MMP implicate în fotoîmbătrânire.

Alți cercetători consideră că principala leziune indusă oxidativ apare la nivelul resturilor de guanozină din *mtDNA* când se formează 8-oxo-dG, considerată ca un marker al leziunilor oxidative. Totuși Anson și colab. [2000] demonstrează că această leziune este reparată eficient și a fost supraevaluată datorită unor artefacte tehnice.

Mecanismul molecular al PA

Unul dintre primele efecte ale UV iradierii este activarea receptorilor de suprafață. Conform mecanismului molecular ipotetic, propus de Fisher și Voorhees [1998], considerat de autori un model de lucru, activarea receptorilor factorilor de creștere și ai citokinelor are ca rezultat asamblarea unor complexe citoplasmice cu partea citoplasmică a receptorilor. Aceste complexe transmit semnale de la suprafața celulei în nucleu. Asamblarea complexelor de semnalizare are ca rezultat activarea unor proteine G mici, ca membrii familiei Ras, Rac și Cdc42. Aceste proteine în stare activă (cu GTP legat) stimulează calea de semnalizare a MAP kinazelor. Se pare că Rac activat stimulează direct NADPH oxidaza care generează două SRO: superoxid și H₂O₂, critice pentru calea MAP kinazelor. Mecanismul prin care SRO

participă la transducția semnalelor nu este clarificat.

Receptorii factorilor de creștere inițiază calea de semnalizare: Ras – Raf – MEK – ERK, având ca rezultat activarea ERK [*extracellularly signal regulated kinase*]. Receptorii citokinelor activează două căi alternative: Rac/Cdc 42 – MEKK – MKK4 – JNK care are ca rezultat activarea JNK [*Jun amino-terminal kinase*] și Rac/Cdc 42 – PAK - MKK 3/6 – p38 care are ca rezultat activarea MAP kinazei p38.

Există date care sugerează că, în culturi de celule, activarea MAP kinazelor: ERK, JNK și p38 conduce la expresia crescută a factorului de transcripție c-Jun, care formează cu c-Fos heterodimeri stabili constituind factorul de transcripție AP-1, ce reglează expresia multor gene implicate în creșterea și diferențierea celulară. În pielea omului, *in vivo*, c-Fos este exprimată constitutiv, deci activarea AP-1 este dependentă în principal de inducerea c-Jun.

În plus, analizele western sugerează că c-Jun indusă de UV iradiere este fosforilată la nivelul domeniului său de transactivare N-terminal (Ser-63 și Ser-73) [Fisher și colab., 1998]. Această fosforilare este catalizată de MAP kinazele: JNK și p38, care sunt induse prin UV iradiere și măresc capacitatea c-Jun de a stimula transcripția genică.

În dermă și epidermă, AP-1 induce expresia enzimelor MMP: colagenaza, gelatinaza de 92 KD și stromelisina, care degradează colagenul și alte proteine din ME. Există ipoteza că degradarea dermică este urmată de reparare care, asemenea vindecării rănilor, este imperfectă. Repararea imperfectă conduce la un deficit în integritatea structurală a dermei, așa numita *cicatrice solară*. Degradarea dermică urmată de repararea imperfectă este repetată la fiecare iradiere UV intermitentă conducând la acumularea de cicatrici solare și în final la o PA vizibilă.

În afara inducerii MMP reglate de AP-1, iradierea UV induce biosinteza unui inhibitor endogen TIMP-1 [Fisher și colab., 1997]. În timp ce inducția cu UV a mRNA TIMP-1 crește la 24 ore după UV iradiere și apoi scade, UV inducția proteinei TIMP-1 rămâne crescută la 72 ore după iradiere UV. Această co-inducție a MMP și TIMP-1 acționează pentru a inhiba activitatea MMP și deci pentru a preveni degradarea excesivă a țesutului conjunctiv. Datele prezentate sugerează însă că activitățile MMP UV-induse depășesc capacitatea inhibitorie a TIMP-1 și deci distrugerea ME are loc.

Deci iradierea UV activează fiecare din cele trei module de MAP kinaze, ce are ca rezultat activarea factorului de transcripție AP-1, un inductor al expresiei MMP, ce degradează componente ale ME dermice. Leziunea ME este urmată de o reparare imperfectă ce conduce la o cicatrice în structura dermei. Acumularea de cicatrici la expuneri UV intermitente și repetate are ca rezultat ridarea vizibilă a pielii.

Foto-protecția pielii

Înțelegerea mecanismelor care stau la baza fotoîmbătrânirii permite stabilirea unei strategii de protecție și reparare a acestor leziuni.

Îmbunătățirea pigmentării endogene a organismului și aplicarea unor substanțe protectoare exogene au și o valoare profilactică. Creșterea producției de melanină în piele este una dintre cele mai eficiente căi de protecție contra radiațiilor solare. Gilchrest și Eller [1999] au arătat că dinucleotidele timinice (pTpT) oferă protecție pielii contra soarelui, foto-carcinogenezei și PA.

O nouă strategie protectoare poate fi dezvoltată numai după înțelegerea rolului major al stresului oxidativ în inducerea PA. S-au găsit mulți antioxidanți care prezintă efecte protectoare contra SRO implicate în PA [Lawrence, 2000]

O atenție specială a fost acordată unui derivat al vitaminei A, acidul all-*trans* retinoic (RA), care anulează activarea AP-1 prin inhibiția inducției proteinei c-Jun. Fisher și colab. [1998] consideră că RA acționează cu receptorii săi nucleari, inducând expresia fie a unui inhibitor al tranzlației proteinei c-Jun, fie al unui activator al degradării ei.

Altă strategie de fotoprotecție este repararea foto-leziunii existente. Progresul în acest domeniu poate veni din studiile de foto-carcinogeneză. S-a demonstrat că preparate constituite din enzima de reparare fotoliaza, derivată din alga *Anacystis nidulans*, încapsulată în lipozomi, aplicate pe pielea umană, repară leziunile DNA [Yarosh și colab., 1994]. Mai mult, aplicarea fotoliazeei a restaurat răspunsul imun în piele, datorită eliminării leziunii DNA. Deoarece fotocarcinogeneza și PA au trăsături comune, este tentant a specula că îndepărtarea leziunilor DNA din celulele pielii poate proteja nu numai împotriva PA ci și împotriva cancerelor pielii.

Obiectivele cercetării sunt focalizate pe cele două ținte majore ale radiațiilor UV : componentele matricei extracelulare și mitocondria. În studiul experimental se pornește de la ipoteza că radiațiile UV activează receptorii factorilor de creștere și ai citokinelor de pe keratinocite și celule dermice, conducând la activarea căii MAP kinazelor. Aceste căi de semnalizare converg spre nucleu unde induc c-Jun, care heterodimerizează cu c-Fos exprimată constitutiv, cu formarea complexelor activate ale

factorului de transcripție AP-1.

În dermă și epidermă, AP-1 induce expresia enzimelor MMP care provoacă degradarea proteinelor ME. Proiectul își propune atât studiul MMP cât și a inhibitorilor lor tisulari TIMP, echilibrul dintre nivelurile MMP și TIMP reglând efectiv degradarea ME.

A doua țintă a leziunilor oxidative produse de radiațiile UV solare este mitocondria, care este și generatorul principal al speciilor active ale oxigenului. Proiectul își propune studiul « leziunilor » oxidative care apar la nivelul membranei interne și a DNA mitocondrial în timpul procesului de fotoîmbătrânire. În acest sens se preconizează în special evaluarea nivelului 8-oxoguaninei din mtDNA și a potențialului membranei interne a mitocondriei considerați markeri ai stresului oxidativ. **Ipoteza este verificată într-un experiment paralel** în care celulele sunt incubate cu peroxid de hidrogen.

Obiective științifice:

1. Studiul supraviețuirii fibroblastelor și keratinocitelor din pielea omului, iradiate UV în domeniul 254-365 nm sau tratate cu H₂O₂ și a gradului de recuperare a celulelor în cultură după încetarea tratamentului;

2. Evaluarea activității factorului de transcripție AP-1 și a nivelului peroxidizilor intra- și extracelulari în cazul culturilor de fibroblaste dermice și de keratinocite - UV iradiate sau tratate cu H₂O₂ ;

3. Investigarea degradării matricei extracelulare indusă de radiațiile UV și de tratamentul cu H₂O₂ la nivelul culturilor de fibroblaste dermice și de keratinocite;

4. Studiului funcției mitocondriale și a unor modificări la nivelul mtDNA din fibroblastele dermice și keratinocite UV iradiate sau tratate cu H₂O₂

Originalitatea proiectului de cercetare este asigurată și de **modelul experimental**, existând extrem de puține studii ale procesului de PA la nivelul epidermei, pe culturi de keratinocite.

Bibliografie

Anson, R.M., Hudson, E., Bohr, V.A., Mitochondrial endogenous oxidative damage has been overestimated, *FASEB J*, 14, 355-360, 2000

Berneburg, M., Plettenburg, H., Krutmann, J., Photoaging of human skin, *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 16, 239-244, 2000

Brenneisen, P., Briviba, K., Wenk, J., Wlaschek, M., Scharffetter-Kochanek K., Hydrogen peroxide increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts, *Free Radic. Biol. Med.*, 22, 515-524, 1997

Birch-Machin, MA, Tindall, M., Turner, R., Haldane, F., Rees, JL., Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging, *J. Invest. Dermatol.*, 110, 149-152, 1998

Boyce ST, *Methods in Molecular Medicine: Tissue Engineering Methods and Protocols*, Morgan JR, Yarmush ML (Eds.), vol. 18, Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 365-388, 1997

Fisher, G.J., Voorhees, J.J., Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce AP-1 regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 3, 61-68, 1998

Gilchrist, B.A., Eller, M.S., DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses. *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.*, 4, 35-40, 1999

Hauswirth, W.W., Lim, L.O., Dujon, B., Turner, G., *Methods for studying the genetics of mitochondria*, în *Mitochondria, a practical approach*, ed. VM Darley-Usmar, D. Rickwood, M.T., Wilson, IRL Press, Oxford, 1987

Jones, E.G, Wise, J. C, Establishment, maintenance and cloning of human dermal fibroblasts. In "Methods in Molecular Biology, vol. 75: Basic Cell Culture Protocols", Pollard W.J., Walker, M.G. (Eds), Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 13- 22, 1997

Kawaguchi, Y., Tanaka, H., Okada, T, Konishi, H., Takahashi, M., Ito, M., Asai, M., Effect of reactive oxygen species on the elastin mRNA expression in cultured human dermal fibroblasts, *Free Radic Biol Med.*, 23, 162-165, 1997

Kahari VM, Saarialho-Kere U., *Matrix metalloproteinases in skin*, *Exp Dermatol*, 6, 199-213, 1997

Klotz, L.O., Pelliouse, C., Briviba, K., Pierot, C., Aubry, J.M., Sies, H., Mitogen-activated protein kinase (p38, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA, *Eur. J. Biochem.*, 260, 917-922, 1999

Kochevar, I.E., Molecular and cellular effects of UV radiation relevant to chronic photodamage. In Gilchrest B.A., ed. Photodamage. Cambridge, MA: Blackwell Science, Inc., 1995, p. 51-67

Kondo, S., The role of cytokines in photoaging, *J. Dermatol. Sci.*, 23, suppl. 1, S30-S36, 2000

Krutman, J., Ultraviolet A radiation-induced biological effects in human skin: relevance for photoaging and photodermatosis, *J. Dermatol. Sci.*, 23, suppl. 1, S22-S26, 2000

Lawrence, N., New and emerging treatment for photoaging, *Dermatol.Clin.*, 18, 99-112, 2000

Leccia, M.T., Yaar, M., Allen, N., Gleason, M., Gilchrest, B.A., Solar stimulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts, *Exp. Dermatol.*, 10, 272-279, 2001

Manicourt, D.H., Lefebvre, V. An assay for matrix metalloproteinases and other proteases acting on proteoglycan, casein or gelatin, *Anal Biochem.*, 215, 171-179, 1993

Masaki, H., Atsumi, T., Sakurai, H., Detection of hydrogen peroxide and hydroxyl radicals in murine skin fibroblasts under UVB irradiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206, 474-479, 1995

Miyachi, Y., Photoaging from an oxidative standpoint, *J. Dermatol. Sci.*, 9, 79-86, 1995

Morliere, P., Moysan A, Santus, R., Huppe, G., Maziere, J.C., Dubertret L., UVA-induced lipid peroxidation in cultured human skin fibroblasts, *BBA*, 1084, 261-268, 1991

Perez, S., Sergent, O., Morel, P, Kinetics of lipid peroxidation induced by UVB rays in human keratinocyte and fibroblast cultures, *C.R. Sci. Soc. Biol. Fil.*, 189, 453-465, 1995

Richter, C., Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem. Cell Biol.*, 27, 647-653, 1995

Rickwood, D., Wilson, M.T., Darley-Usmar, V.M., Isolation and characteristics of intact mitochondria, in *Mitochondria, a practical approach*, ed. VM Darley-Usmar, D. Rickwood, M.T., Wilson, IRL Press, Oxford, 1987

Scharffetter-Kochanek K., Wlaschek, M., Briviba, K., Sies, H., Singlet oxygen induces collagen expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett* 331, 304-306, 1993

Scharffetter-Kochanek K., Brenneisen, P., Wenk, J., Hermann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C., Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms, *Experimental Gerontology*, 35, 307-316, 2000

Shoffner, J.M., Lott, M.T., Voljavec, A.S., Soueidan, S.A., Costigan, D.A., Wallace, D.C., Spontaneous Kearns-Sayre/chronic external ophthalmoplegia plus syndrome associated with a mitochondrial DNA deletion: a slip replication model and metabolic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86, 7952-7956, 1989

Stege, H., Roza, L., Vink, A.A., Grewe, M., Ruzicka, T., Grether-Beck, S., Krutmann, J., Enzyme plus light therapy to repair DNA damage in UVB-irradiated human skin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1790-1795, 2000

Tanaka, H., Alteration of extracellular matrix metabolism and wrinkle formation observed in photoaging skin, *Nagoya Med J.*, 43, 159-164, 2000

Toyoda, M., Bhawan, J., Ultrastructural evidence for the participation of Langerhans cells in cutaneous photoaging process: a quantitative comparative study. *J. Dermatol. Sci.*, 14, 87-100, 1997

Yakes, F.M., Van Houten, B., Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 514-519, 1997

Yang, J-H., Lee, H-C., Wei, Y-H., Photoageing-associated mitochondrial DNA length mutations in human skin, *Arch Dermatol res.*, 287, 641-648, 1995

Yarosh, D., Bucana, C., Cox, P., Alas, L., Kibitel, J., Kripke, M. Localization of liposomes containing a DNA repair enzyme in murine skin. *J. Invest. Dermatol.*, 103, 461-468, 1994

Wenk, J., Brenneisen, P., Wlaschek, M., Poswig, A, Briviba, K., Oberley, T.D., Scharffetter-Kochanek K., Stable overexpression of Mn SOD in mitochondria identified hydrogen peroxide as a major oxidant in the AP-1-mediated induction of matrix-degradating metalloproteinase-1., *J. Biol. Chem.*, 274, 25869-25876, 1999

