

# **Funktionelle Auswirkungen von mitochondrialen DNA- Deletionen auf die Hautalterung**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
**Bianca-Angela Schürmann**  
aus Wuppertal

Düsseldorf 2010

Aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF)  
an der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf gGmbH  
(Direktor: Prof. Dr. med. Jean Krutmann)

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-  
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Jean Krutmann

Koreferent: Prof. Dr. William Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2010

# Danksagung

Ich möchte meinen Dank aussprechen

Prof. Dr. med. Jean Krutmann für die Vergabe dieser Arbeit, für seine positiven Impulse, die konstruktiven Diskussionen meiner Ergebnisse und für seine Fähigkeit, mich stets zu motivieren,

Prof. Dr. William Martin für die Übernahme des Koreferats,

Dr. Peter „Peet“ Schröder für die Aufnahme in sein Team, die von ihm gewährten Einblicke in die Statistik, die Feinheiten der oxidativen Phosphorylierung und Realtime-PCR sowie für sein Vorbild in Sachen Fitness und Gewichtsreduktion,

Dr. Marc Majora für seine geniale wissenschaftliche Betreuung, sein offenes Ohr in allen Belangen, seine fachliche Kompetenz und nicht zuletzt für seine Freundschaft und Fairness,

Susanne Franke und Maren Schneider für ihre enorme Unterstützung im Labor,

Tanja Wittkampf (Maresch) für ihre umfangreichen Vorarbeiten,

der AG Grether-Beck für die Mithilfe bei der Erstellung des epidermalen Genexpressionsprofils,

Tereza Benesova und Fillipina Macaluso für den „Spirit“ unserer AG,

Kerstin Kunze für ihr Lachen und ihre Herzlichkeit,

Tine für die nette Begleitung nach Spetses,

der gesamten „Frühstücksrunde“ für die angeregte Diskussionen,

den AGs Haendeler/Altschmied und Schröder für die angenehme und niemals langweilige Arbeitsatmosphäre,

dem Graduiertenkolleg 1033 für die finanzielle Unterstützung und der Mentoring-Gruppe für die Weiterbildungsmöglichkeiten und ein erfolgreiches Networking,

der IUF-Fußballtruppe für die netten Kicks.

Ein besonderer Dank geht an Thomas Rosanski für seine uneingeschränkte Unterstützung in den letzten drei Jahren, für seine Ruhe und Geduld und dafür, dass er mir die Perspektive für eine gemeinsame Zukunft gegeben hat.

Meiner Mutter danke ich, dass sie mich so auf das Leben vorbereitet hat, dass ich ihre Stärke und ihren Mut auch lange nach ihrem Tod noch in mir spüren kann.

*Nicht weil die Dinge schwierig sind, wagen wir sie nicht,  
sondern weil wir sie nicht wagen, sind sie schwierig.*

*Die Zeit wird kommen, wo unsere Nachkommen sich wundern, dass wir so offenbare  
Dinge nicht gewusst haben.*

Lucius Annaeus Seneca

*Für meine Oma Helga  
und Tante Martina*

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASMase	acide Sphingomyelinase
ATP	Adenosintriphosphat
BD	β-Defensin
bp	Basenpaare
BPE	Bovine pituitary extract
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAT	Katalase
CCD	charge-coupled device
CE	Cornified envelope
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DE	Dermales Äquivalent (dermal equivalent)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHR	Dihydrorhodamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazin
dNTP	Desoxyribonukleintriphosphat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal growth factor)
FLG	Filaggrin
fw	forward
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GPX	Glutathionperoxidase
h	Stunde (hour)
HDAC	Histondeacetylase
IL-8	Interleukin-8 (CXCL8)
IR	infrarot
kDa	Kilodalton
KGF	Keratinocyte Growth Factor, FGF7
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LL-37	Cathelicidin
LOX	Lysyloxidase
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinasen
min	Minute
MMP	Matrixmetalloproteinase
mt	mitochondrial
NAC	N-Acetylcystein
NHF	Normale humane Fibroblasten
NMF	Natural moisturizing factor
PBN	Phenyl-α-tert-butyl-nitron
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rv	revers
SEM	Standard error of the mean

SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SPR	small proline-rich protein
SPT	Serin-Palmitoyl-Transferase
$\beta$ -GlcCer	$\beta$ -Glucocerabrosidase
TBS	TRIS-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TRX	Thioredoxinperoxidase
TSA	Trichostatin A
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor)
WNT	Wingless int-1-Gen

# Inhalt

<b>Danksagung</b> .....	III
<b>Abkürzungen</b> .....	V
<b>Inhalt</b> .....	VII
<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>1.1 Aufbau und Funktion der Haut</b> .....	1
1.1.1 Allgemeines .....	1
1.1.2 Dermis .....	2
1.1.3 Dermales Kollagen .....	2
1.1.4 Matrixmetalloproteinasen (MMP) .....	3
1.1.5 Epidermis .....	3
1.1.6 Epidermale Barriere .....	4
1.1.7 <i>In vitro</i> -Hautmodelle in der dermatologischen Forschung .....	5
<b>1.2 Hautalterung</b> .....	6
1.2.1 Kennzeichen der Hautalterung .....	6
1.2.2 Die mitochondriale Theorie des Alterns und die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies für die Hautalterung .....	8
1.2.3 Protektive Strategien zur Verminderung von Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies .....	9
<b>1.3 Mitochondriale Funktion und mtDNA-assoziierte Defekte</b> .....	11
1.3.1 Das Mitochondrium als Ort der oxidativen Phosphorylierung .....	11
1.3.2 Eigenschaften mitochondrialer DNA und das Auftreten von mtDNA-Mutationen .....	13
1.3.3 Zusammenhang von mtDNA-Mutationen und Alterung .....	15
1.3.4 Kearns-Sayre-Syndrom, chronisch progressive externe Ophthalmoplegie und Pearson-Syndrom als Beispiele für mitochondriale Erkrankungen .....	15
<b>1.4 Experimenteller Ansatz und Fragestellung der Arbeit</b> .....	17
<b>2 Material und Methoden</b> .....	19
<b>2.1 Material</b> .....	19
2.1.1 Primäre humane Zellen .....	19
2.1.2 Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur .....	19
2.1.3 Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	20
2.1.4 Laborchemikalien .....	21
2.1.5 Antikörper und Färbelösungen .....	22
2.1.6 Zubehör für Zellkultur und Labor .....	22
2.1.7 Geräte für Zellkultur und Labor .....	23
2.1.8 Computersoftware .....	23
<b>2.2 Zellkultivierung (Monolayer)</b> .....	24
2.2.1 Isolation von epidermalen primären Keratinozyten .....	24
2.2.2 Isolation von primären dermalen Fibroblasten .....	24
2.2.3 Kultivierung von Keratinozyten .....	25
2.2.4 Kultivierung von Fibroblasten .....	25

<b>2.3</b>	<b>Herstellung und Kultivierung dermalen Äquivalente</b> .....	25
2.3.1	Synthese von dermalen Äquivalenten .....	25
2.3.2	Kultivierung von dermalen Äquivalenten .....	26
2.3.3	Isolation von Fibroblasten aus dermalen Äquivalenten .....	26
<b>2.4</b>	<b>Herstellung und Kultivierung von Vollhautmodellen</b> .....	26
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	27
2.5.1	Isolation von DNA aus dermalen Äquivalenten .....	27
2.5.2	Isolation von RNA aus dermalen Äquivalenten .....	27
2.5.3	Isolation von RNA aus der epidermalen Schicht von Vollhautäquivalenten .....	28
2.5.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA .....	28
2.5.5	Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) .....	28
2.5.6	Bestimmung der mitochondrialen Common Deletion mittels quantitativer Realtime-PCR .....	29
2.5.7	Bestimmung der Genexpression mittels semi-quantitativer Realtime-PCR .....	29
<b>2.6</b>	<b>Biochemische Methoden</b> .....	31
2.6.1	Western Blot Analyse von MMP-1 .....	31
2.6.2	Bestimmung von Proteincarbonylen mittels Oxyblot .....	32
2.6.3	Gelzymographie zur Bestimmung der MMP-Aktivität .....	32
<b>2.7</b>	<b>Histochemische Methoden</b> .....	32
2.7.1	Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies am dermalen Äquivalent .....	32
2.7.2	Immunhistochemischer Nachweis von MMP-1 .....	32
2.7.3	Kollagenfärbung mit Picosirius Red .....	33
2.7.4	<i>In situ</i> -Zymographie zur Bestimmung der MMP-Aktivität .....	33
2.7.5	Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Paraffinschnitten .....	33
2.7.6	Immunhistologischer Nachweis des BrdU-Einbaus in proliferierenden Keratinozyten .....	34
<b>2.8</b>	<b>GC-MS/MS-Analyse der Kollagenfragmentation über die Quantifizierung von Hydroxyprolin</b> .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	35
<b>3.1</b>	<b>Auswirkungen von mtDNA-Deletionen auf die Struktur und Funktion der Dermis</b> .....	35
3.1.1	Konstant erhöhter Anteil an Common Deletion in dermalen Äquivalenten mit KSS-Fibroblasten in Langzeitkultur .....	35
3.1.2	Erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in KSS DE .....	36
3.1.3	KSS-Fibroblasten in DE exprimieren deutlich mehr Matrixmetalloproteinase-1 als NHF .....	36
3.1.4	KSS-Fibroblasten in DE exprimieren nicht genügend TIMP-1 zur Kompensation der erhöhten MMP-1-Expression .....	37
3.1.5	Verstärkte MMP-Aktivität in KSS DE .....	38
3.1.6	Schädigung der Kollagenmatrix in KSS DE .....	40
3.1.7	Erniedrigung der hohen MMP-1-Expression in KSS DE durch den Einsatz von Antioxidantien .....	41
3.1.8	Erniedrigung der hohen MMP-1-Expression in KSS DE durch den Einsatz von Retinylacetat .....	42
3.1.9	Vermehrte Proteinoxidation in KSS-Fibroblasten .....	42
3.1.10	Veränderte Expression weiterer hautalterungsrelevanter Gene in KSS DE .....	43

---

<b>3.2</b>	<b>Auswirkungen von mtDNA-Deletionen in Fibroblasten auf die Epidermis</b> .....	<b>44</b>
3.2.1	Generierung eines Vollhautmodells auf Basis des KSS dermalen Äquivalents .....	44
3.2.2	Probleme bei der Kultivierung von Vollhautäquivalenten .....	46
3.2.3	Atrophie der epidermalen Schicht im KSS-Vollhautmodell .....	47
3.2.4	Verringerte Proliferation von Keratinozyten in KSS-Vollhautäquivalenten .....	49
3.2.5	Genexpressionprofil von Keratinozyten in Vollhautäquivalenten .....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>51</b>
4.1	<b>MMP-vermittelte Schädigung der Dermis durch Fibroblasten mit mtDNA-Deletionen: KSS DE als Modell für lichtgealterte Haut</b> .....	<b>51</b>
4.2	<b>Gestörte epidermale Homöostase in Vollhautäquivalenten mit KSS-Fibroblasten</b> .....	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>60</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>64</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>79</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>79</b>



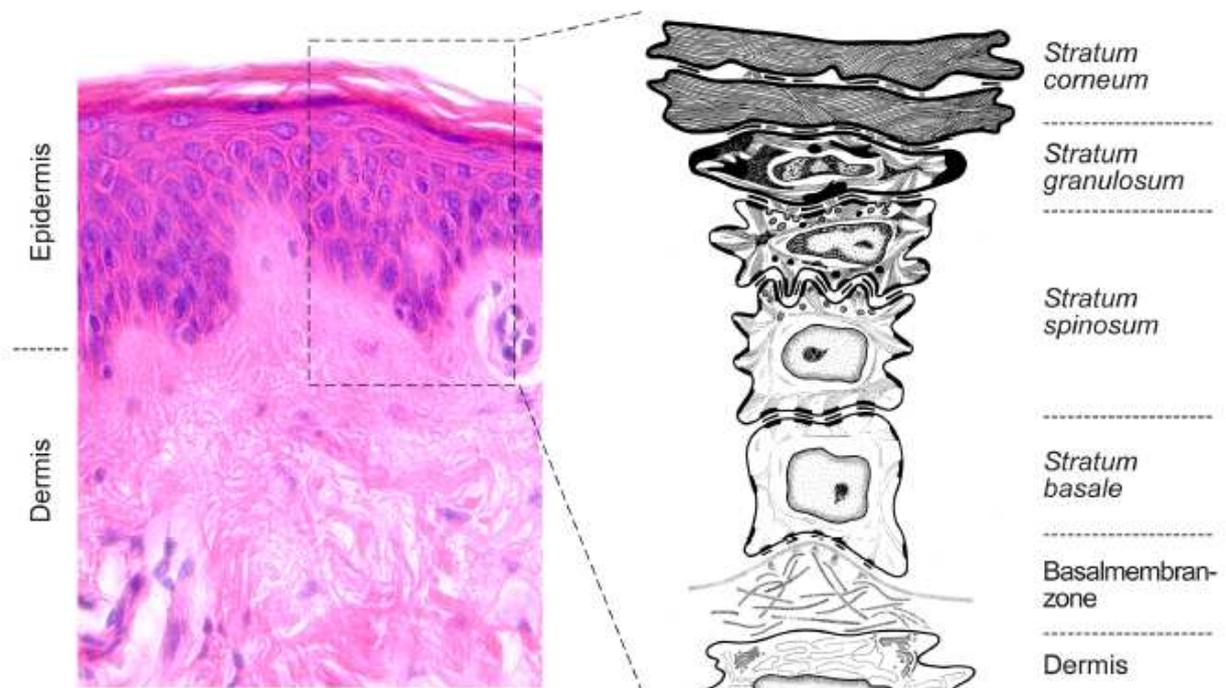
# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion der Haut

### 1.1.1 Allgemeines

Die Haut bedeckt die äußere Körperoberfläche und nimmt beim Menschen durchschnittlich 2 m<sup>2</sup> Fläche ein. Dabei wiegt sie inklusive des Unterhautfettgewebes bis zu 20 kg, womit sie das schwerste Organ des Menschen ist. Ihre Dicke beträgt dabei nur zwischen 1,5 und 4 mm. Die Haut bildet eine Barriere, die sowohl das Austrocknen des Körpers, als auch das Eindringen von Wasser verhindert. Sie gewährleistet Schutz vor chemischen, biologischen und physikalischen Einwirkungen. Weiterhin fungiert die Haut als Regulationssystem für den Temperatur-, Elektrolyt- und Wasserhaushalt und mit ihren Anhangsgebilden als Immun- und Sinnesorgan. In der Haut eingebettete Merkel- und Nervenzellen nehmen Druck, Temperatur und Schmerz wahr. Langerhanszellen, Mastzellen und Makrophagen stellen die Verbindung zum Immunsystem des Gesamtorganismus dar (Fritsch, 1998).

Die Haut gliedert sich in drei Schichten: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Lederhaut) und Subkutis (Fettgewebspolster der Haut) (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Aufbau der menschlichen Haut.** Die histologische Aufnahme (links) zeigt im unteren Teil die Dermis, bestehend aus dicht gebündelten Kollagenfasern und bevölkert von Fibroblasten. Mit ihr verzahnt ist die darüber liegende Epidermis. Die einzelnen Schichten der Epidermis sind auf der rechten Bildhälfte noch einmal schematisch dargestellt (entnommen aus Boehnke, 2009).

### 1.1.2 Dermis

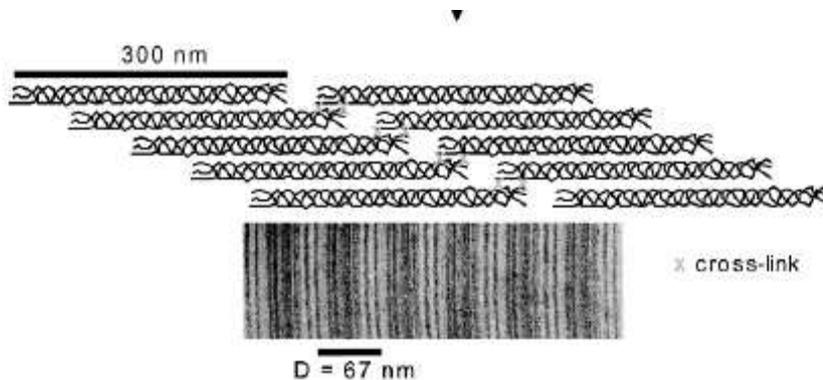
Als Dermis bezeichnet man das oberhalb der Subkutis gelegene Bindegewebe. Sie ist von hoher Reißfestigkeit und Elastizität zugleich und beherbergt die zur Versorgung der Haut benötigten Gefäße sowie Nerven (Fritsch, 1998). Eingebettet in die Dermis, die zu etwa 75% aus Kollagen besteht, sind hauptsächlich Fibroblasten, vom Mesenchym abstammende spindelförmige Zellen mit langen Fortsätzen, die miteinander und der Matrixumgebung über membranständige Rezeptoren, den sogenannten Integritinen, in Kontakt stehen (Heckmann, 1999) und in der Lage sind durch das dermale Gewebe zu migrieren (Chu, 2003). Fibroblasten zeichnen eine hohe Synthesekapazität aus, denn sie sind maßgeblich für die Neusynthese der dermalen Komponenten verantwortlich (Jung, 1998). Sie synthetisieren sowohl Strukturproteine wie Kollagen, Elastin, Fibronectin und Laminin, als auch extrazelluläre Matrixkomponenten wie Glukosaminoglykane und Proteoglykane (Fritsch, 1998). Der Abbau der extrazellulären Matrix erfolgt durch spezifische Proteasen, für deren Synthese ebenfalls die Fibroblasten verantwortlich sind. Diese Proteasen werden aufgrund ihrer Abhängigkeit von Metall-Ionen auch als Matrixmetalloproteinasen (MMP) bezeichnet (Heckmann, 1999). Zur Regulierung von Produktion, Organisation und Degradation der extrazellulären Matrix kommunizieren die Fibroblasten sowohl untereinander, als auch mit anderen Zelltypen der Haut (z. Bsp. mit Keratinozyten aus der Epidermis). Sie produzieren daher nicht nur unlösliche Bestandteile der sie umgebenden Matrix, sondern auch lösliche Faktoren, die sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Kontakte beeinflussen (Chu, 2003; Jordana *et al.*, 1994). Außer den Fibroblasten bevölkern noch Mastzellen und Makrophagen die Dermis. Mastzellen sind spezialisierte sekretorische Zellen, die für hypersensitive Reaktionen der Haut verantwortlich sind. Dazu produzieren sie sekretorische Granula, welche u. a. Histamin und Heparin enthalten. (Chu, 2003). Makrophagen sind immunologisch aktive Zellen, die abgestorbene Zellen sowie anfallende Abbaustoffe wie Melanin, Fette oder Proteine phagozytieren. Sie speichern auch Antigene, produzieren Interferon und nehmen so an immunologischen Reaktionen teil (Jung, 1998).

### 1.1.3 Dermales Kollagen

Es gibt 28 Kollagentypen im Menschen, von denen acht fibrilläre und netzbildende Kollagene in der Haut vorkommen (Kadler *et al.*, 2007). Die Dermis besteht hauptsächlich aus quervernetzten Kollagenfasern von Kollagen I (80% - 90% vom Gesamtanteil) und Kollagen III (8% - 12%), welche unter dem Elektronenmikroskop eine typische Querstreifung mit einer Periode von etwa 70 nm aufweisen (Abb. 1.2) (Hulmes, 2008). Im geringeren Anteil von bis zu 5% ist außerdem noch Kollagen V in der Dermis zu finden, ebenso wie das perlenschnurartige Kollagen VI, welches mit den Fibrillen assoziiert ist (Chu, 2003). In der Basalmembran dienen Kollagen IV und VII der Verankerung von Dermis und Epidermis (Hulmes, 2008).

Kollagen besteht aus jeweils drei linksgängigen Polypeptidketten, den sogenannten  $\alpha$ -Ketten, bei denen ein regelmäßiges Aminosäuremuster Glycin-X-Y auftritt (oft X=Prolin, Y=Hydroxyprolin) und die über Wasserstoffbrücken zu einer rechtsgängigen Tripelhelix verwoben sind. Es gibt Kollagene, die aus drei identischen Peptidketten zusammengesetzt sind, ebenso wie Heterotrimere. Kollagen I besteht z. Bsp. aus zwei identischen  $\alpha 1$ - und einer  $\alpha 2$ -Helix (Hulmes, 2008). Die Synthese bis hin zum löslichen Prokollagen, welches bereits die Tripelhelixstruktur aufweist, erfolgt in den Fibroblasten. Im Extrazellularraum entsteht

nach Abspaltung terminaler Peptide das Kollagen, welches durch das Enzym Lysyloxidase (LOX) quervernetzt wird und zu Fibrillen aggregiert, die wiederum zu Fasern gebündelt vorliegen (Hulmes, 2008). Entfaltetes oder denaturiertes Kollagen bezeichnet man als Gelatine.



**Abb. 1.2: Struktur von Kollagenfasern.** Spontane Anordnung einzelner trihelikaler Kollagenmoleküle zur Faser. Anschließende Quervernetzung (cross-link) bringt Stabilität. Durch die Verschiebung der einzelnen Moleküle um eine Periode von 67 nm entsteht eine charakteristische Streifenstruktur (entnommen aus Hulmes, 2008).

#### 1.1.4 Matrixmetalloproteinasen (MMP)

In der Haut findet neben der Synthese zahlreicher Matrixproteine auch deren Abbau statt. Aus der Gruppe der  $Zn^{2+}$ -abhängigen Matrixmetalloproteinasen sind hier Kollagenasen wie MMP-1, MMP-8 und MMP-13 und Gelatinasen wie MMP-2 und MMP-9 hervorzuheben. Die genannten Kollagenasen sind in der Lage, Kollagen I, II und III an einer spezifischen Stelle, die etwa zwischen  $\frac{3}{4}$  und  $\frac{1}{4}$  der Molekülkette liegt, zu spalten, was einen weiteren Abbau ermöglicht (Fritsch, 1998). MMP bestehen grundsätzlich aus einem Propeptid, welches bei der Aktivierung abgespalten wird, einer zinkbindenden katalytischen Einheit und einer C-terminalen Hemopexindomäne. Es gibt vier spezifische Inhibitoren (Tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMP-1 bis TIMP-4) der MMP, die in einer 1:1 Stöchiometrie binden (Visse und Nagase, 2003). Die Expression von MMP und TIMP werden über mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK)-Signalwege reguliert. Aktivierte MAPK wandern dabei zum Nukleus, wo sie Transkriptionsfaktoren wie c-Jun aktivieren, was zur Bildung und Aktivierung von AP-1 führt. AP-1 bindet an den entsprechenden Promotorregionen und führt somit zur Expression der Gene (Schieke *et al.*, 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass Schädigungen der extrazellulären Matrix in menschlicher Haut durch UV-Strahlung hauptsächlich MMP-1-vermittelt sind (Brennan *et al.*, 2003; Fisher *et al.*, 1998). Kollagenabbau bedingt somit die lichtinduzierte Faltenbildung (Krutmann und Gilchrist, 2006). Desweiteren konnte ein Zusammenhang zwischen Kollagenfragmentation, oxidativem Stress und erhöhter MMP-1-Expression in gealterter Haut festgestellt werden (Fisher *et al.*, 2009).

#### 1.1.5 Epidermis

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes und keratinisiertes Plattenepithel ektodermaler Herkunft, welches oberhalb der Dermis angesiedelt ist. Die Keratinozyten bilden mit nahezu 90% die Hauptpopulation der Epidermiszellen und unterliegen einem Differenzierungsprozess (Keratinisierung), der sich innerhalb von

vier Wochen vollzieht. Nach ihrer Entstehung durch Zellteilung in der Basalschicht (Stratum basale) durchlaufen die Keratinozyten in der Stachelzellschicht (Stratum spinosum) und der Körnerschicht (Stratum granulosum) ansteigende Reifegrade. Im Stratum granulosum sind die Keratinozyten durch verdichtetes Keratohyalin und membranumschlossene lamelläre Granula gekennzeichnet (Fritsch, 1998). Letztendlich werden sie terminal differenziert und bilden in Form von toten Korneozyten ohne Organellen, angefüllt mit Keratin und umgeben von dem sogenannten Cornified Envelope (CE), die äußere Hornschicht des Stratum corneum (Abb. 1.1) (Chu, 2003). Als weitere Zelltypen kommen in der Epidermis die pigmentbildenden Melanozyten, die immunologisch bedeutsamen Langerhans-Zellen und neuroendokrine Merkel-Zellen vor.

Die Keratinozyten des einlagigen Stratum basale sind über Hemidesmosomen mit der Basalmembran und damit mit der Dermis verbunden. Die Verbindung der Keratinozyten miteinander wird durch Desmosomen sichergestellt. Der Zellkontakt mittels „gap junctions“ dient dem interzellulären Stoffaustausch (Fritsch, 1998). Die „Abdichtung“ der Epidermis im Sinne der Barrierefunktion erfolgt über „tight junctions“, welche die Zellen ebenfalls miteinander verbinden (Mitic *et al.*, 2000).

### 1.1.6 Epidermale Barriere

Von besonderer Bedeutung für die Formierung einer funktionalen epidermalen Barriere ist die Generierung des Cornified Envelopes (CE) der Korneozyten, welche bereits im Stratum granulosum vorbereitet wird. Die CE-Entstehung beginnt mit der Expression von Periplakin und Envoplakin, deren Zusammenlagerung mit einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration verbunden ist (Kalinin *et al.*, 2002). Daraufhin werden Involucrin und Transglutaminase 1 exprimiert und lagern sich ebenfalls an die Plasmamembran an. Eine weitere Erhöhung der lokalen Kalziumkonzentration führt zur Vernetzung zwischen Involucrin-Monomeren sowie von Involucrin mit Envoplakin, die von Transglutaminase 1 katalysiert werden (Elias, 2005; Kalinin *et al.*, 2002). Durch die weitreichenden Vernetzungen werden die Zell-Zell-Kontakte zunehmend aufgehoben (Kee und Steinert, 2001). Als nächstes entstehen im Stratum granulosum zytosolische Strukturen, die Lamellar Bodies, welche große Mengen an Ceramiden, die langkettige Fettsäurereste aufweisen, sowie weitere Barriere lipide wie freie Fettsäuren und Cholesterol beinhalten (Kalinin *et al.*, 2002). Mit der Fusion der Plasmamembran entleeren die Lamellar Bodies ihren Inhalt in den interzellulären Raum, wobei die Ceramide in der Membran verbleiben und mittels Transglutaminase 1 und 5 an die CE-Gerüstschicht aus Involucrin, Envoplakin und Periplakin gebunden werden (Candi *et al.*, 2005). Desweiteren werden Proteasen ausgeschüttet, die zur Desquamation beitragen, sowie antimikrobielle Peptide wie das humane  $\beta$ -Defensin-2 (Elias, 2005). Loricrin wird durch Transglutaminase 1 und 3 intrazellulär mit kleinen Prolin-reichen Proteinen (small proline-rich protein, SPR) zu Loricrin-SPR-Oligomeren verknüpft und zur Zellperipherie transportiert (Candi *et al.*, 1999). Dort vollzieht sich dann die Quervernetzung mit dem schon bestehenden CE-Gerüst. Gleichzeitig findet die Bildung des Keratinfilament-Filaggrin-Komplexes statt, der ebenso mit dem CE vernetzt wird und den zytosolischen Hauptteil der Korneozyten darstellt (Dale *et al.*, 1997). Das Filament-aggregierende Protein Filaggrin ist ein charakteristischer Marker für fortgeschrittene Differenzierung verhornter Plattenepithelien. Im Übergang zum Stratum corneum bewirkt eine Dephosphorylierung mit anschließender Kalzium-abhängiger Proteolyse die Spaltung der hochmolekularen Profilaggrin-Moleküle in je 10 bis 12 Filaggrin-Monomere (Dale *et al.*, 1997; Presland *et al.*, 1997). Filaggrin

induziert, ausgelöst durch die ionische Bindung an Keratinfilamente, die Formierung der Makrofibrillen im Zytosol der Keratinozyten. Außerdem ist Filaggrin als Natural Moisturizing Factor (NMF) von Bedeutung (Proksch *et al.*, 2008). Das durch den Differenzierungsprozess gefertigte reife CE besteht aus einer 10 nm dicken Proteinhülle und einer 5 nm dicken Lipidhülle. Gemeinsam sind sie mit den interzellulären Lipidlamellen die entscheidend für die Permeabilitätsbarriere der Haut (Kalinin *et al.*, 2002).

### 1.1.7 *In vitro*-Hautmodelle in der dermatologischen Forschung

Der Einsatz dreidimensionaler organotypischer Kulturen zur Untersuchung gewebsspezifischer Eigenschaften hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen (Schmeichel und Bissell, 2003). Hautäquivalentmodelle waren einige der ersten Beispiele für die Verwendung organotypischer Kulturen (Asselineau und Prunieras, 1984; Bell *et al.*, 1983). Neben einem grundsätzlichen Verständnis der biologischen Funktionen der Haut ermöglichen diese Hautäquivalentmodelle das Testen von Oberflächensubstanzen (Canton *et al.*, 2010) und stellen zusätzlich eine Quelle für Hautersatz dar (Shevchenko *et al.*, 2010). Nicht zuletzt bieten Hautmodelle den großen Vorteil eines humanen Modells, denn *in vivo*-Untersuchungen am Menschen sind ethisch problematisch. Aufgrund des zunehmenden Drucks zur Reduzierung von Tierversuchen seitens der EU in Form der novellierten Kosmetik- und Tierschutzrichtlinie (76/768/EEC bzw. 86/609/EEC), ist absehbar, dass *in vitro*-gefertigte Hautäquivalente zukünftig unerlässlich für pharmakotoxikologische Untersuchungen sein werden. Zusätzlich können humane Hautäquivalente durch die Verwendung genetisch veränderter Zellen oder Zellen mit einem intrinsischen Defekt, wie in dieser Arbeit erfolgt, modifiziert werden, wodurch eine Vielzahl weiterer Untersuchungsmöglichkeiten entsteht (Bernerd *et al.*, 2001; Bernerd *et al.*, 2005; Majora *et al.*, 2009). Geht es um Abläufe in der Dermis und die Interaktion von dermalen Fibroblasten in einer Kollagenmatrix, kann anstelle eines Vollhautäquivalentmodells nur ein rein dermales Modell verwendet werden, das aus den in ein dreidimensionales Kollagengel eingesäten Fibroblasten besteht. Dieses dreidimensionale Kollagengel stellt zwar ein vereinfachtes, aber dennoch gut etabliertes, anerkanntes Modell der extrazellulären Matrix dar und erlaubt die Untersuchung von humanen dermalen Fibroblasten in einer ihrer natürlichen Umgebung ähnlichen Situation (Majora *et al.*, 2009).

Bei der Synthese dermalen Hautäquivalente unterscheidet man zwischen „nicht kontrahierenden“ und „kontrahierenden“ Äquivalenten (Grinnell, 2003). Bei den nicht kontrahierenden dermalen Äquivalenten werden Fibroblasten in eine dreidimensionale Kollagenmatrix eingesät, die an der Zellkulturschale fixiert ist. Der Kontakt zwischen Kollagenfasern und Fibroblasten ändert die dreidimensionale Form der fixierten starren Matrix nicht. Kontrahierende Äquivalente dagegen können den kontrahierenden Kräften nachgeben, da sie frei in der Zellkulturschale schwimmen. Die Kräfte treten beim Umbau und der damit verbundenen Verdichtung der Kollagenfasern durch die eingesäten Fibroblasten auf, der zu einer Verringerung des Durchmessers des Kollagengels führt (Bell *et al.*, 1979). Es konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass die Kontraktion eines dreidimensionalen Kollagengels abhängig von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und einer erhöhten Expression von Lysyloxidase (LOX) ist (Majora *et al.*, 2009). Auch die Matrix-degradierenden MMP sind für den Umbau des dreidimensionalen Kollagengels während der Kontraktion unerlässlich, denn eine Inhibierung von MMP verhindert die Kontraktion des Kollagengels (Scott *et al.*, 1998).

Die Generierung eines Vollhautmodells mit proliferierender und differenzierter Epidermis stellt sich deutlich komplexer dar als die eines dermalen Äquivalents. Zunächst müssen Keratinozyten isoliert und kultiviert werden, welche dann auf das dermale Äquivalent aufgebracht werden müssen. Es gibt grundsätzlich zwei Methoden Keratinozyten zu kultivieren: Entweder im serumhaltigen Medium auf sogenannten Feederlayern aus nicht mehr teilungsfähigen Fibroblasten, oder in serumfreiem Spezialmedium. Ersteres wurde von Rheinwald und Green 1975 entwickelt und später durch Zusätze wie EGF, Insulin und Cholera-toxin optimiert (Rheinwald und Green, 1975; Rheinwald und Green, 1977). Dieses Monolayer-System ist ein geeignetes Modell für die Erforschung grundlegender biologischer Mechanismen der Keratinozyten, ein voll differenziertes Epithel kann so aber nicht generiert werden (Poumay und Coquette, 2007). Dies kann nur erreicht werden, wenn die Keratinozyten auf einer Matrix luftexponiert kultiviert werden, so dass der Differenzierungsprozess eingeleitet wird (Bell *et al.*, 1981; Prunieras *et al.*, 1983). Die zugrundeliegende Matrix kann -wie in dieser Arbeit- eine Kollagenmatrix mit eingesäten Fibroblasten sein, aber auch eine Kollagen-Glycosaminoglykan-Matrix (Boyce *et al.*, 1988), eine Fibrinmatrix mit künstlichen Gerüstfasern (Boehnke *et al.*, 2007), de-epidermisierte Dermis (Ponec *et al.*, 1988; Prunieras *et al.*, 1983) oder bioabbaubare Gerüststrukturen (El-Ghalbzouri *et al.*, 2004; Zacchi *et al.*, 1998). Für die Forschung an alterungsrelevanten Themen ist insbesondere eine lange Kultivierungsdauer von Bedeutung, um chronische Effekte, wie sie bei Alterungsprozessen auftreten, zu simulieren. Bei dermalen Langzeitäquivalenten auf Kollagenbasis erreicht man eine Kultivierungsdauer von mindestens sechs Wochen (Schuermann und Majora, 2010). Vollhautäquivalente auf dermalen Basis haben eine Lebensdauer von zwei bis drei Wochen. Unter Verwendung einer Fibrinmatrix konnten Lebensdauern von bis zu 12 Wochen erreicht werden (Boehnke *et al.*, 2007).

## 1.2 Hautalterung

### 1.2.1 Kennzeichen der Hautalterung

Die Haut ist nicht nur der intrinsischen, sprich der genetisch vorbestimmten, Alterung unterworfen, sondern auch exogenen Faktoren, die auf die Haut als äußere Schutzhülle des Körpers in besonderem Maße einwirken. Ursachen für die resultierende extrinsische, umweltbedingte Hautalterung sind z. Bsp. die Luftverschmutzung wie auch Zigarettenrauch, aber vorrangig die Sonnenstrahlung bzw. die Bestrahlung unter einer Sonnenbank, sei es aus kosmetischen oder therapeutischen Gründen (Egawa *et al.*, 1999; Krutmann und Diepgen, 2003; Vierkotter *et al.*, 2010; Yaar, 2006). Auswirkungen auf die Hautalterung besitzen nachweislich die ultraviolette Strahlung (UV-A: 320-400 nm und UV-B: 280-320 nm) sowie die Infrarot-Strahlung (IR-A: 760-1440 nm) (Berneburg *et al.*, 2004; Schieke *et al.*, 2002; Schroeder *et al.*, 2007; Yaar and Gilchrist, 2003). Man spricht hierbei von Lichtalterung (Photoaging). Die Prozesse der intrinsischen und extrinsischen Hautalterung laufen parallel ab und sind morphologisch eindeutig voneinander zu trennen. Prinzipiell äußert sich intrinsische Hautalterung durch die Bildung von feinen Fältchen an nicht licht-exponierten Stellen, während lichtgealterte Haut tiefe Falten aufweist. Außer der Faltenbildung gibt es eine Reihe weiterer Anzeichen von Hautalterung, wie z. Bsp. die Ausprägung von Altersflecken. Gealterte Haut erscheint dünner und schlaffer als junge Haut und ist leichter verwundbar (Krämer

und Schikowski, 2006). Trockenheit und Rauheit sind weitere charakteristische Merkmale gealterter Haut (Yaar und Gilchrest, 2003). Die sensorische Wahrnehmung nimmt ebenfalls mit dem Alter ab, so dass der Schwellenwert der Schmerzwahrnehmung zunimmt (Khalil *et al.*, 1994). Ein weiteres Merkmal gealterter Haut ist die verminderte Wundheilung. So konnte gezeigt werden, dass es bei älteren Menschen durchschnittlich sechs Tage, bei jungen Erwachsenen nur drei Tage dauert, die Barrierefunktion der Haut nach Tape-Stripping wieder herzustellen (Ghadially *et al.*, 1995). Die Immunfunktion der Haut nimmt ebenfalls mit dem Alter ab, was vor allem auf eine verminderte Anzahl epidermaler Langerhans-Zellen zurückzuführen ist (Yaar und Gilchrest, 2003).

Zusätzlich zu diesen makroskopischen Alterungserscheinungen sind auch verschiedene molekulare Biomarker bekannt, deren Veränderung ein Altern der Haut kennzeichnet. So ist eine Abnahme des Kollagengehalts in der Dermis zu beobachten (Shuster *et al.*, 1975). Die verbleibenden Kollagenfasern erscheinen außerdem weniger strukturiert und kompakter (Bernstein *et al.*, 1996). Auch konnte eine vermehrte Quervernetzung der Kollagenmoleküle im Alter gezeigt werden (Gerstein *et al.*, 1993; Sell *et al.*, 1996). Die Abnahme des Kollagengehalts ist zum einen auf eine verminderte Kollagenneusynthese, zum anderen auf einen verstärkten Kollagenabbau zurückzuführen (Yaar und Gilchrest, 2003). Der verstärkte Kollagenabbau wird durch MMPs verursacht, die für den Abbau der extrazellulären Matrix in der Dermis der Haut verantwortlich sind und eine zentrale Rolle bei der Alterung der Haut spielen. Eine Aufregulation dieser Enzyme im Alterungsprozess verursacht den verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix, was letztendlich zur beschriebenen Faltenbildung führt (Yaar und Gilchrest, 2003). Für die MMP-spezifischen Inhibitoren (TIMP) konnte eine Abregulierung beobachtet werden (Khorramizadeh *et al.*, 1999).

Ein weiteres Kennzeichen der Hautalterung ist eine vermehrte Gefäßbildung (Braverman und Fonferko, 1982), einhergehend mit einer erhöhten Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine durch MMP-degradierte Kollagenmatrix Endothelzellen zur Gefäßbildung anregen kann (Varani *et al.*, 2008).

Altern kann aber auch als eine chronische Entzündung betrachtet werden, dem sogenannten Inflamm-Aging, bei dem eine Reihe von Zytokinen in die Matrix sezerniert werden (Franceschi *et al.*, 2007). Für die Hautalterung von Bedeutung ist insbesondere Interleukin-8 (IL-8, CXCL8), da dieses Zytokin in humanen Keratinozyten vermittelt durch oxidativen Stress nach UV-Bestrahlung ausgeschüttet wird. Das führt außerdem zu einer Transaktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Wu *et al.*, 2008). Darüberhinaus besitzt IL-8 auch pro-angiogenetische Eigenschaften, weil es in der Lage ist, die Migration von Endothelzellen zu beeinflussen (Li *et al.*, 2003).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass lichtgealterte Haut mit vermehrter Proteinoxidation assoziiert ist (Sander *et al.*, 2002). Oxidierte (und aggregierte) Proteine sind außerdem in der Lage, das Proteasom zu inhibieren, was wiederum zu einer Erhöhung der MMP-Expression führen kann (Catalgol *et al.*, 2009).

Als weiterer zellulärer Biomarker im Prozess der Alterung gilt die Integrität des mitochondrialen Genoms. Es ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass gealterte Haut einen höheren Anteil an Mutationen und Deletionen im mitochondrialen Genom aufweist als junge Haut (Yang *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1995) und solche Veränderungen durch repetitive UV-Bestrahlung auch in normaler Haut induziert werden können (Berneburg *et al.*, 1997; Berneburg *et al.*, 2004; Berneburg und Krutmann, 1998). Außerdem wurde ein Zusammenhang zwischen (UV-

induzierbaren) mtDNA-Deletionen und der Expression des Kollagenvernetzlers LOX festgestellt, der sowohl am Mausmodell, als auch in menschlicher Haut nach Bestrahlung vermehrt exprimiert wird und im DE zu einer stärkeren Kontraktion des Kollagengels führt (Majora *et al.*, 2009).

### **1.2.2 Die mitochondriale Theorie des Alterns und die Bedeutung von reaktiven Sauerstoffspezies für die Hautalterung**

Grundlage der mitochondrialen Theorie des Alterns waren die Arbeiten von Harman (Harman, 1956), der die These aufstellte, dass die Ursache des Alterns freie Radikale seien, welche durch ihre Reaktivität zu einer Akkumulation von oxidativen Schäden führen. Später wurde postuliert, dass die Mitochondrien die Hauptquelle (aber auch Hauptangriffspunkt) von sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind, welche bei der oxidativen Phosphorylierung entstehen (Kowaltowski *et al.*, 2009). Dabei gelten die Komplexe I und III als Hauptorte der Elektronenfreisetzung (St-Pierre *et al.*, 2002). Diese Elektronen können mit molekularem Sauerstoff zu hochreaktiven Superoxidradikalanionen reagieren, die im Organismus in weitere reaktive Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (durch Superoxiddismutasen) oder Hydroxylradikale (Fenton-Reaktion) umgesetzt werden können (Chance *et al.*, 1979).

Neben den Mitochondrien gibt es jedoch noch weitere Quellen für die Entstehung von ROS (Beckman und Ames, 1998). So entsteht z. Bsp. bei der  $\beta$ -Oxidation der Fettsäuren in den Peroxisomen als Nebenprodukt  $H_2O_2$  (Ockner *et al.*, 1993). Zytosolische Cytochrom-P450-Enzyme, deren Aufgabe es ist, durch Reduktion oder Oxidation körperfremde Substanzen abzubauen, sind ebenfalls in der Lage, molekularen Sauerstoff zum  $O_2^-$ -Radikal zu reduzieren (Koop, 1992).  $H_2O_2$  entsteht durch die Oxidation von Lysinseitenketten durch das Enzym Lysyloxidase (LOX), welches Quervernetzung von Kollagen- und Elastinfasern in der extrazellulären Matrix katalysiert (Lucero und Kagan, 2006). Mitochondriale Monoamino-Oxidasen bauen Monoamine durch Desaminierung mit Hilfe von  $H_2O$  und  $O_2$  zu den entsprechenden Aldehyden, Ammoniak und unter Freisetzung von  $H_2O_2$  ab. Außerdem können ROS in der Fettsäuresynthese durch Acyl-CoA Oxidase entstehen, die Elektronen direkt auf Sauerstoff transferiert, wobei ebenfalls  $H_2O_2$  entsteht (Keller *et al.*, 1993).

ROS wirken in der Zelle auf unterschiedliche Weise. Zum einen erfüllen sie physiologische Aufgaben, indem sie als Signalmoleküle eine Vielzahl zellulärer Funktionen beeinflussen (Allen and Tresini, 2000). Außerdem regulieren und beeinflussen sie das zelluläre Redox-Gleichgewicht und lösen so ggf. protektive Maßnahmen der Zelle aus (Abschnitt 1.2.3). Zum anderen besitzen ROS als hochreaktive Moleküle ein großes Potential zur Schädigung der Zelle. So verursachen sie verschiedene oxidative Modifikationen zellulärer Bestandteile. Sowohl Proteine und Lipide als auch Nukleinsäuren können geschädigt werden, was wiederum zu vielfältigen Störungen zellulärer Funktionen führen kann. Es kommt z.B. zur Peroxidation von Lipiden zellulärer Membranen, zu DNA-Strangbrüchen, zu DNA-Protein-Addukten oder zur direkten Oxidation von redoxempfindlichen Aminosäureresten in Proteinen (Yaar und Gilchrest, 2003).

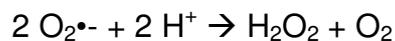
Schäden treten im besonderen Maße am Ort der ROS-Entstehung, dem Mitochondrium selbst auf. Histologisch äußert sich das in Vergrößerung der geschädigten (gealterten) Mitochondrien, größeren Vakuolen und verkürzten Cristae (Shigenaga *et al.*, 1994). Auf molekularer Ebene bedingt eine UV-induzierte Generierung von Singulett-Sauerstoff die Bildung von mtDNA-Mutationen (Berneburg

*et al.*, 1999). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass allein das Vorhandensein von mtDNA-Deletionen in Fibroblasten mit einem erhöhten ROS-Gehalt einhergeht (Majora *et al.*, 2009). Ebenso wurde in Cybriden mit mutierter mtDNA eine erhöhte ROS-Produktion im Vergleich zu Cybriden mit intakter mtDNA festgestellt (Jou *et al.*, 2005; Vives-Bauza *et al.*, 2006).

Durch Mutationen der mtDNA, insbesondere durch Deletionen, gehen Informationen für die Expression von Proteinen der Atmungskettenkomplexe verloren. Die Folge kann eine defekte Atmungskette sein, die zu einer vermehrten Freisetzung von ROS führt. Es wird postuliert, dass diese ROS wiederum Schäden an der mtDNA verursachen und dies schließlich in einem sich selbst verstärkenden „Teufelskreis“ mündet (Berneburg *et al.*, 1999).

### 1.2.3 Protektive Strategien zur Verminderung von Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies

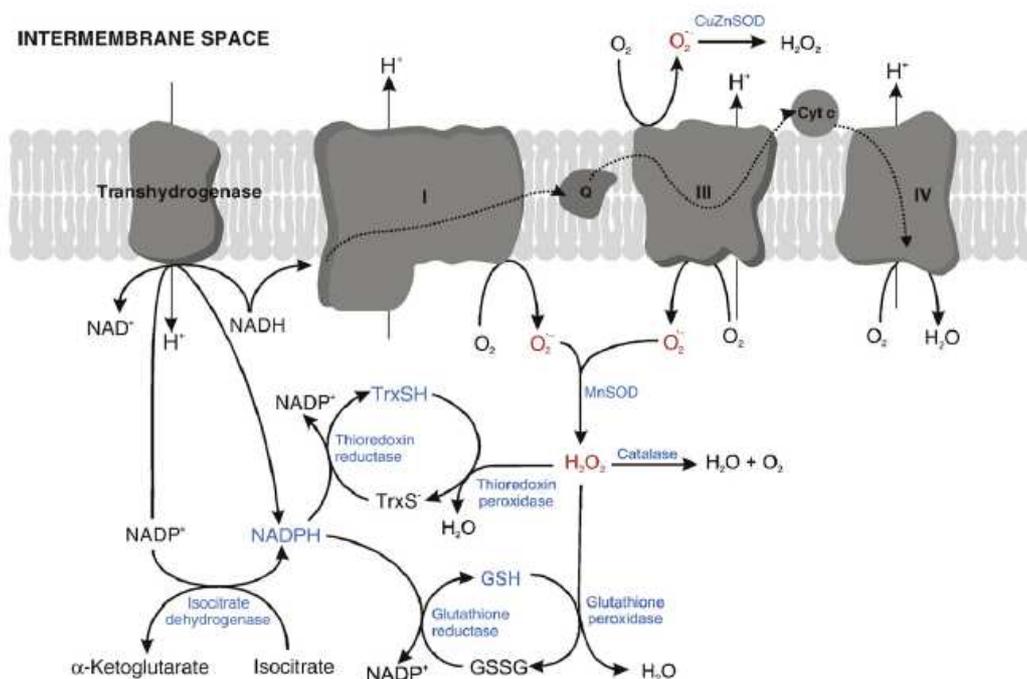
Ein Beleg für die Gültigkeit der Theorie der freien Radikale ist das Vorhandensein von protektiven Systemen in der Zelle, die für die Regulation des Redox-Gleichgewichts der Zelle unerlässlich sind. Unter oxidativen Stress versteht man die Störung dieses Gleichgewichts zwischen oxidativem und antioxidativen Prozessen, welches sowohl von endogenen als auch von exogenen Einflüssen gestört werden kann (Sies, 1997). In der Zelle gibt es sowohl enzymatische, als auch nicht-enzymatische Systeme, um mit oxidativem Stress umzugehen. Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) beispielsweise katalysiert die Disproportionierung von Superoxid (McCord und Fridovich, 1969):



Innerhalb des Mitochondriums findet sich die Mangan-SOD (MnSOD), im Cytosol die Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD). Das bei dieser Reaktion entstehende  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird von der Katalase (CAT) und der Glutathionperoxidase (GPX) weiter detoxifiziert. Die Katalase katalysiert die Disproportionierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$ :



Wie Abb. 1.3 zeigt, bildet die Glutathionperoxidase zusammen mit der Glutathion-Reduktase (GR) den sogenannten Glutathion-Redoxzyklus der Zelle. Die Glutathion-Reduktase reduziert dabei das oxidierte Glutathion (GSSG) und sorgt dafür, dass ein hoher GSH/GSSG-Quotient in der Zelle aufrechterhalten wird. Ein anderes System zur Umwandlung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist der Thioredoxinkreislauf, bei dem die Thioredoxinperoxidase Thioredoxin in der reduzierten Form (Trx-SH) oxidiert, während  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert wird. Das entstehende Trx-S<sup>•</sup> wird dann mit Hilfe der Thioredoxinreduktase unter Verbrauch eines Reduktionsäquivalents wieder reduziert (Kowaltowski *et al.*, 2009). Die Lebenserwartung von Mäusen, die eine in die Mitochondrien gerichtete Katalase überexprimierten, verlängert sich (Schriner *et al.*, 2005). Mäuse, die eine SOD- oder Glutathionperoxidase-Defizienz aufweisen, haben zwar mehr oxidative Schäden, jedoch keine verkürzte Lebensdauer (Zhang *et al.*, 2009).

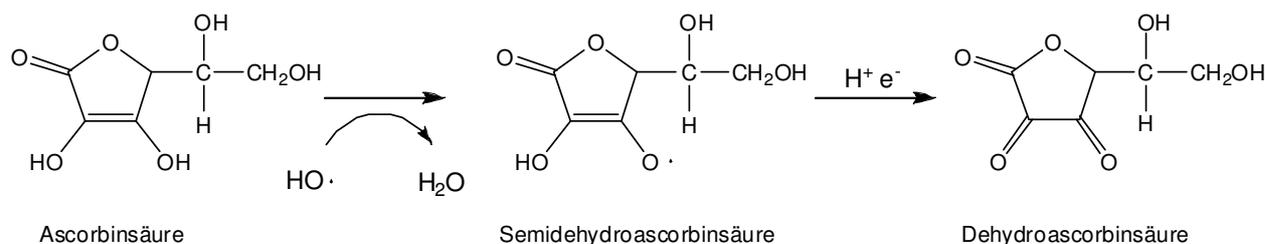


**Abb. 1.3: Mitochondrialer ROS-Metabolismus.** Zentraler Metabolit ist H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, das durch Disproportionierung von Superoxidanionen, generiert von Komplex I und III der Atmungskette, gebildet wird. Durch Katalase erfolgt die Umsetzung zu O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann aber auch durch das Thioredoxin- oder Glutathionsystem entgiftet werden. Das zur Regeneration der reduktiven Kapazität benötigte NADPH kann entweder durch die NAD<sup>+</sup>/NADH-Transhydrogenase oder durch Umsetzung von Isocitrat zu α-Ketoglutarat bereitgestellt werden (entnommen aus Kowaltowski 2009).

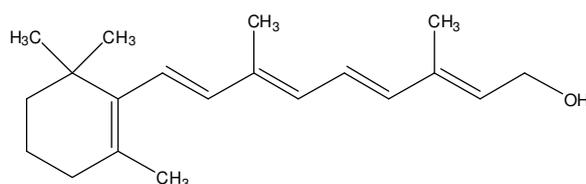
Als nicht enzymatische Schutzsysteme in der Zelle fungieren antioxidative Substanzen wie z. Bsp. Vitamin C oder E. Dabei ist zu beachten, dass auch ein Antioxidans pro-oxidative Wirkung haben kann, wenn es in zu hoher Konzentration auftritt. Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein wasserlöslicher Radikalfänger, der OH<sup>•</sup> und andere Radikale detoxifizieren kann (Abb. 1.4) (Stahl *et al.*, 2006). Vitamin E (α-Tocopherol) hingegen ist ein lipidlösliches Antioxidans, das in der Lage ist, mehrfach ungesättigte Fettsäuren in Membranlipiden, Lipoproteinen und Depotfett vor einer Zerstörung durch Oxidation (Lipidperoxidation) zu schützen. Tocopherol wirkt als Radikalfänger, indem es selbst durch Mesomeriestabilisierung zu einem reaktionsträgen Radikal wird. Das Tocopherol-Radikal wird dann unter Bildung eines Ascorbatradikals reduziert, welches wiederum mit Hilfe von GSH regeneriert werden kann (Wikipedia, 2010).

Weitere fettlösliche Substanzen mit antioxidativem Potential sind Retinol (Vitamin A) und seine Derivate aufgrund der Struktur von konjugierten Doppelbindungen (Abb. 1.5). Es kann physiologisch durch symmetrische Spaltung von β-Carotin (Provitamin A) gebildet werden (Mortimer, 1996).

In der Dermatologie werden die Vitamine C und A, ebenso wie das Antioxidans N-Acetylcystein (NAC), auch zur Therapie von Hautalterungsphänomenen eingesetzt (Farris, 2005; Kang *et al.*, 2003; Rittie *et al.*, 2006; Varani *et al.*, 2000). Retinoide inhibieren z. Bsp. die Aktivität des für die MMP-1-Expression verantwortlichen Transkriptionsfaktors AP-1. Der genaue Mechanismus ist jedoch bisher nicht geklärt (Rittie *et al.*, 2006).



**Abb. 1.4: Ascorbinsäure als Radikalfänger.** Unter Bildung eines Semihydroascorbinsäure-Radikals wird das hoch reaktive Hydroxylradikal zu  $\text{H}_2\text{O}$  umgesetzt. Es folgt die Reaktion zur Dehydroascorbinsäure, welche instabil ist und durch Ringöffnung irreversibel zur Diketogulonsäure zerfällt.



**Abb. 1.5: Struktur von Retinol (Vitamin A).** Die konjugierten Doppelbindungen sind gut zur Mesomeriestabilisierung von negativen Ladungen geeignet. Zur Stoffgruppe der Retinoide gehören die oxidierten Formen (Retinal und Retinsäure) sowie Ester des Retinols wie z. Bsp. Retinylacetat (wasserlöslich) und Retinylpalmitat (fettlöslich).

## 1.3 Mitochondriale Funktion und mtDNA-assoziierte Defekte

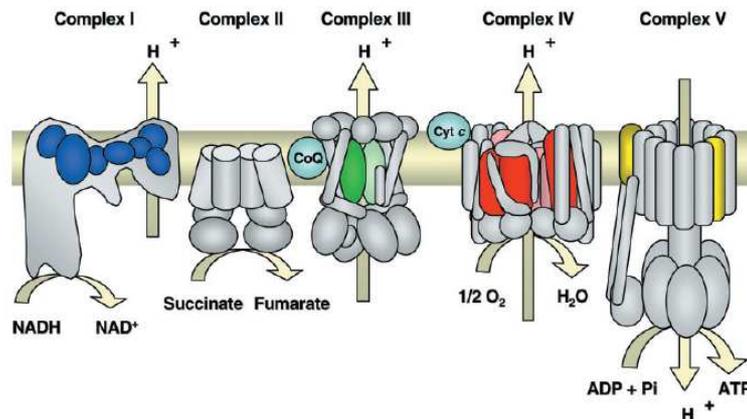
### 1.3.1 Das Mitochondrium als Ort der oxidativen Phosphorylierung

Mitochondrien sind zytoplasmatische Organellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen (Zeviani und Di Donato, 2004). Nach der Endosymbiontentheorie geht man davon aus, dass die Mitochondrien aus einer Symbiose von aeroben Bakterien mit den Vorläufern der heutigen Eukaryonten hervorgegangen sind. Eine alternative Theorie beschreibt die Aufnahme eines fakultativen anaeroben Bakteriums durch ein methanogenes Archaeon (Martin and Russell, 2003). Beleg für die Endosymbiontentheorie ist u. a. das Vorhandensein einer eigenen mitochondrialen DNA (siehe Abschnitt 1.3.2) sowie einer eigenen Proteinsynthese.

Anzahl und Gestalt der Mitochondrien variiert je nach Zelltyp und Funktionszustand (Bereiter-Hahn und Voth, 1994). Als extrem dynamische Organellen können sie sich innerhalb einer Zelle kontinuierlich teilen und wieder miteinander verschmelzen, so dass ein hoch dynamisches, kontinuierliches Netzwerk entsteht (Yaffe, 1999). Charakteristikum von Mitochondrien ist ihre Doppelmembran, bei der die äußere Membran über Porine zum Transport kleiner Moleküle bis zu etwa 10 kDa verfügt (Voet und Voet, 1994). Die innere Membran, an der die Enzyme der Atmungskette lokalisiert sind, grenzt den Intermembranraum von der mitochondrialen Matrix ab und besitzt zur Oberflächenvergrößerung zahlreiche Ausstülpungen, die sogenannten Cristae. Da diese Membran auch für kleinere Moleküle undurchlässig ist, sorgen zahlreiche Transporter für den Import und Export wichtiger Metabolite (Herrmann und Hell, 2005).

Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien ist die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP), einem Molekül, das in universeller Form schnell verfügbare Energie in jeder Zelle bereitstellt und gleichzeitig ein wichtiger Regulator energieliefernder Prozesse

ist. Die ATP-Synthase ist an den Prozess der oxidativen Phosphorylierung durch die Atmungskette gekoppelt. Sie besteht aus vier Multienzymkomplexen (Komplex I – Komplex IV), zwei hydrophoben, mobilen Elektronenüberträgern (Coenzym Q und Cytochrom c) und der ATP-Synthase, auch Komplex V genannt (Abb. 1.6). Die Komplexe I bis IV bilden als Redox-Moleküle eine Elektronentransportkette, entlang der die bei den oxidativen Stoffwechselreaktionen auf NADH, FMN<sub>2</sub> und FADH<sub>2</sub> übertragenen Elektronen weitergereicht werden. Parallel dazu bauen die Komplexe I, III und IV einen elektrochemischen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran auf. Das entstandene Membranpotential nutzt die ATP-Synthase zur Synthese des energiereichen Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>) (Saraste, 1999). Bis auf Komplex II der mitochondrialen Atmungskette, der ausschließlich kernkodiert ist, beinhalten alle Komplexe sowohl kern- als auch mitochondrial kodierte Untereinheiten. Die Biosynthese der mitochondrialen Atmungskette erfordert daher eine Kooperation von nukleärem und mitochondrialem Genom zur Generierung einer funktionierenden Atmungskette. Komplex I der Elektronentransportkette ist die NADH-Dehydrogenase, ein 940 kDa großer Enzymkomplex aus sieben mitochondrial kodierten Untereinheiten (ND1-ND6 und ND4L) und mindestens 39 nukleär kodierten Untereinheiten. Während der Reduktion des mobilen Elektronenüberträgers Ubichinon (Coenzym Q) zu Ubichinol mittels NADH transportiert dieser Komplex zusätzlich Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum (Carroll *et al.*, 2003). Die Succinat-Dehydrogenase aus dem Zitratzyklus, der Komplex II der Atmungskette, katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Die Elektronen des dabei entstandenen FADH<sub>2</sub> werden von der Succinat-Dehydrogenase weiter auf Ubichinon übertragen, so dass wiederum das reduzierte Ubichinol entsteht. Der ausschließlich nukleär kodierte Komplex II der Atmungskette ist mit nur vier Untereinheiten der kleinste Komplex der Atmungskette. Komplex III der Redox-Transportkette, die Cytochrom-c-Reduktase, besteht aus einer mitochondrial kodierten Untereinheit (Cytochrom b) und 10 nukleär kodierten Untereinheiten. Die Cytochrom-c-Reduktase oxidiert den mobilen Elektronenüberträger Ubichinol wieder und reduziert gleichzeitig das kernkodierte Cytochrom c, wobei weitere Protonen in den Intermembranraum gepumpt werden. Die Cytochrom-c-Oxidase (COX) bildet den Komplex IV der Atmungskette und setzt sich aus drei mitochondrial kodierten Untereinheiten (COX1-3) und zehn nukleär kodierten Untereinheiten zusammen. Hier wird der mobile Elektronenüberträger Cytochrom c wieder oxidiert und Sauerstoff zu Wasser reduziert. Die Protonen dieser Reaktion stammen aus der Matrix der Mitochondrien, so dass der Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran weiter verstärkt wird. Die teilweise auch als Komplex V bezeichnete ATP-Synthase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase) setzt sich aus zwei mitochondrial kodierten Untereinheiten (ATPase6 und ATPase8) und mind. 13 kernkodierten Untereinheiten zusammen. Ein Teil der ATP-Synthase (F<sub>0</sub>-ATPase) bildet einen Protonenkanal durch die innere Mitochondrienmembran, durch den Protonen entlang des aufgebauten Protonengradienten aus dem Intermembranraum zurück in die Mitochondrienmatrix fließen können. Die dabei freigesetzte Energie ist mit der Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>) gekoppelt (Di Donato, 2000; Saraste, 1999). Während der oxidativen Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran entweicht auch unter physiologischen Bedingungen ein Teil der Elektronen aus der Elektronentransportkette und ist so an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt (Chance *et al.*, 1979).



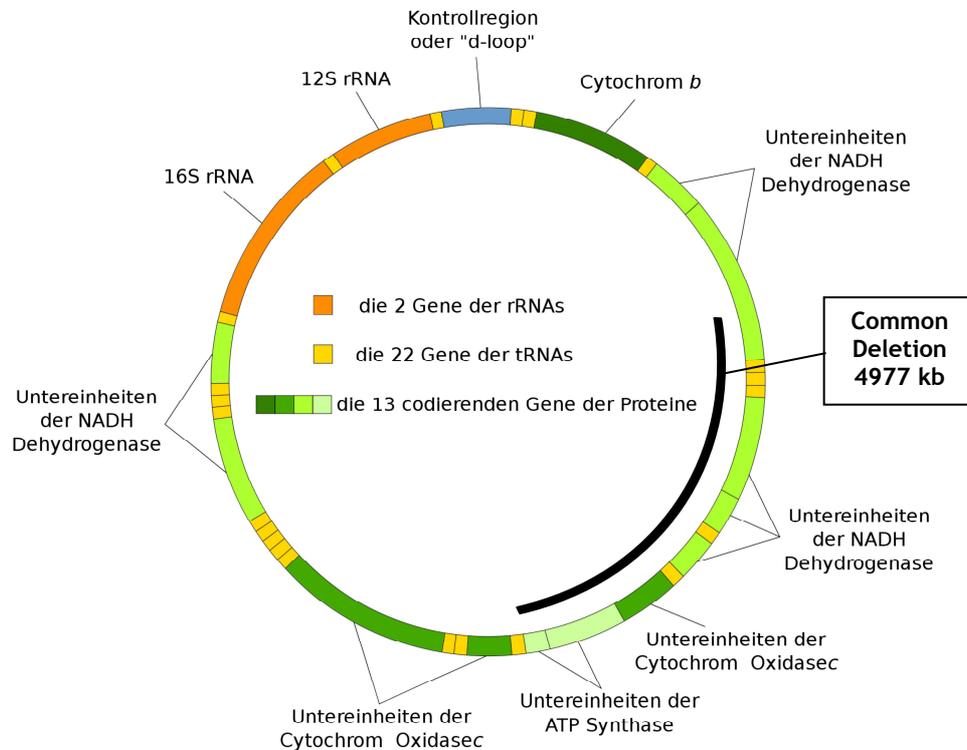
**Abb. 1.6: Die mitochondriale Atmungskette.** Mitochondrial kodierte Untereinheiten der Komplexe I bis V sind farblich dargestellt. Komplex II ist als einziger Komplex ausschließlich nukleär kodiert. Die Komplexe I, III und IV bauen den Protonengradienten im Intermembranraum auf. Komplex V, die ATP-Synthase, nutzt den Gradienten zur Bildung von ATP in der mitochondrialen Matrix (entnommen aus Zeviani und Carelli, 2003).

### 1.3.2 Eigenschaften mitochondrialer DNA und das Auftreten von mtDNA-Mutationen

Mitochondrien besitzen eine eigene DNA (NASS and NASS, 1963), die in der mitochondrialen Matrix in mehreren Kopien vorliegt. Die humane mtDNA ist ein 16.569 bp großes, zirkuläres Molekül, das aus zwei komplementären Strängen besteht (guaninreicher „Heavy“- und cytosinreicher „Light“-Strang). Sie liegt keineswegs „nackt“ in der Matrix, sondern ist an einen Proteinkomplex, lokalisiert an der inneren Mitochondrienmembran, gebunden, der Nukleoid genannt wird (Holt *et al.*, 2007; Wang und Bogenhagen, 2006). Die Sequenz der humanen mtDNA wurde bereits 1981 ermittelt (Anderson *et al.*, 1981). Sie enthält keine Introns. Einzige Ausnahme nicht kodierender Sequenz ist der sogenannte D-Loop (displacement loop), der transkriptionelle Promotoren und einen putativen Replikationsursprung enthält (Abb. 1.7). Die Vererbung der genetischen Information erfolgt ausschließlich maternal (Giles *et al.*, 1980), wobei die mtDNA insgesamt 37 Gene kodiert (13 Proteine der Atmungskette, 22 tRNAs und 2 rRNAs) (Holt *et al.*, 1988; Wallace *et al.*, 1988; Wallace, 1992). Da sich der Code der mtDNA vom nukleären Code unterscheidet, findet die Transkription wie auch die Translation dieser Gene in der Matrix der Mitochondrien mit Hilfe der mitochondrial kodierten tRNAs und rRNAs sowie weiterer nukleär kodierter Transkriptions- und Translationsfaktoren, wie z. Bsp. dem mitochondrialen Transkriptionsfaktor TFAM (Kaufman *et al.*, 2007), statt. Die Replikation der mitochondrialen DNA ist nicht an die der nukleären DNA in der S-Phase gekoppelt (Scheffler, 2001). Auch in post-mitotischen Zellen, wie z.B. Haut-, Nerven- oder Muskelzellen, kann die mtDNA-Replikation weiterhin aktiv sein. In Mitochondrien gibt es eine spezielle Polymerase, die DNA-Polymerase  $\gamma$ . Sie besteht aus zwei Untereinheiten: einer Polymeraseeinheit mit hoher Prozessivität und Selektivität und einer intrinsischen 5'→3'-Exonuklease für simultanes Proofreading (Kaguni, 2004).

Die mitochondriale DNA weist eine mehr als zehnfach höhere Mutationsrate im Vergleich zur nukleären DNA auf (Wallace, 1995). Schützende Histone wie im Nukleus sind an der mitochondrialen DNA nicht vorhanden (Shigenaga *et al.*, 1994). Außerdem können in der mtDNA entstandene Schäden nur durch ein

eingeschränktes Reparatursystem repariert werden. Sie verfügen zwar über Mechanismen zur Reparatur einzelner Basen (Base excision repair, BER), nicht jedoch zur Reparatur von Nukleotiden (Nucleotid excision repair, NER) (Gredilla *et al.*, 2010).



**Abb. 1.7: Die humane mitochondriale DNA.** Das 16.569 bp große, ringförmige Molekül weist außer der „d-loop“-Kontrollregion (blau) keine nicht-kodierenden Bereiche auf. Durch die Common Deletion (schwarz) gehen Informationen für ATP-Synthase, Cytochrom-Oxidase, NADH-Dehydrogenase und tRNAs verloren (modifiziert nach Wikipedia 2010, GNU-Lizenz für freie Dokumentation).

Die meisten Mutationen sind neutral und können z. Bsp. zur Nachverfolgung von Völkerwanderungen in der Menschheitsgeschichte genutzt werden (Ingman *et al.*, 2000), viele spielen aber eine große Rolle in Alterung und Krankheit.

Die mit mitochondrialen Erkrankungen assoziierten Mutationen der mtDNA können in „large scale rearrangements“ und Punktmutationen unterteilt werden. Während die „large scale rearrangements“ meistens sporadisch auftreten und vermutlich auf somatische Mutationen in einem frühen Entwicklungsstadium zurückzuführen sind, werden die meisten Punktmutationen maternal vererbt (Puoti *et al.*, 2003). Dabei ist zu bedenken, dass in einer Zelle durchaus mutierte und nicht-mutierte mtDNA-Moleküle nebeneinander existieren können. Man spricht dann von Heteroplasmie. Ob die Mutation eine funktionelle Auswirkung auf das Mitochondrium hat, bestimmt wahrscheinlich ein kritischer Schwellenwert, der für jede Mutation anders ausfallen kann und der nicht zwingend in direkter Korrelation zu einer Krankheitsausprägung stehen muss (Wong, 2007). In einzelnen Zellen oder Gewebeteilen kann es durch die zufällige Verteilung von mtDNA-Molekülen bei der Teilung von Mitochondrien einen Überhang von geschädigter mtDNA geben, der dann funktionelle Konsequenzen hat, allerdings können dadurch auch Mutationen verschwinden (Rahman *et al.*, 2001). Man geht heute davon aus, dass die Vermehrung der Mutationen durch klonale Expansion geschieht, wobei postuliert wird, das

insbesondere deletierte und damit verkürzte mtDNA einen Vorsprung in der Replikationsgeschwindigkeit hat (Larsson *et al.*, 1990; Weber *et al.*, 1997). Deletionen entstehen vornehmlich an kurzen, gleichgerichteten Wiederholungen in der Sequenz (direct repeats). Ob dies bei der Replikation des mitochondrialen Genoms oder bei der Reparatur beschädigter mtDNA stattfindet, ist nicht geklärt (Krishnan *et al.*, 2008; Shoffner *et al.*, 1989).

### 1.3.3 Zusammenhang von mtDNA-Mutationen und Alterung

Die von der mitochondrialen Theorie des Alterns postulierte Bedeutung von mtDNA-Mutationen im Alterungsprozess wird durch zahlreiche Befunde unterstützt. So ist bekannt, dass gerade mtDNA-Deletionen in gealtertem Gewebe angereichert sind (Bua *et al.*, 2006; Cortopassi und Arnheim, 1990; Kraysberg *et al.*, 2006; Simonetti *et al.*, 1992). Desweiteren ist es möglich, mtDNA-Deletionen durch repetitive UV-Bestrahlung sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* zu induzieren (Berneburg *et al.*, 1997; Berneburg *et al.*, 1999; Berneburg *et al.*, 2004).

Der maximale Gehalt mutierter mtDNA-Moleküle in gealtertem Gewebe beträgt in der Regel unter 1%, kann im Gehirn aber sogar zwischen 10% bis 14% erreichen (Corral-Debrinski *et al.*, 1992; Cortopassi *et al.*, 1992). Ein Zusammenhang zwischen mtDNA-Mutagenese und Alterungsprozessen konnte auch anhand von Mausmodellen bestätigt werden (Kujoth *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004). Mäuse, die eine proof-reading-defiziente mtDNA-Polymerase  $\gamma$  exprimierten, besaßen mehr mtDNA-Mutationen und eine verkürzte Lebensspanne. Auch konnten bei diesen Mäusen frühzeitig Alterungsphänomene beobachtet werden wie z. Bsp. Gewichtsverlust, Haarausfall, Osteoporose oder Herzvergrößerungen. Seitdem wird eine intensive Debatte darüber geführt, ob mtDNA-Punktmutationen oder mtDNA-Deletionen die Auslöser des Alterungsphänotyps seien.

Nicht zuletzt wird die von der mitochondrialen Theorie des Alterns postulierte Bedeutung von mtDNA-Mutationen auch durch sogenannte mitochondriale Erkrankungen gestützt. Diese Krankheitsbilder sind auf Mutationen der mtDNA zurückzuführen und zeigen phänotypisch unter anderem verschiedene mit dem Altern assoziierte Symptome wie Muskelschwäche, neurologische Probleme, Demenz, Herzprobleme oder sensineurale Probleme wie Taub- oder Blindheit (Zeviani und Di Donato, 2004).

### 1.3.4 Kearns-Sayre-Syndrom, chronisch progressive externe Ophthalmoplegie und Pearson-Syndrom als Beispiele für mitochondriale Erkrankungen

Mitochondriale Erkrankungen sind gekennzeichnet durch Störungen der oxidativen Phosphorylierung, welche durch Mutationen der mtDNA (Punktmutationen und/oder Deletionen) verursacht werden (Tuppen *et al.*, 2010). Da die Proteine der Atmungskette aber nicht nur mitochondrial, sondern auch nukleär kodiert sind, können neben Mutationen im mitochondrialen Genom auch Mutationen im nukleären Genom zu Störungen der oxidativen Phosphorylierung führen (Di Mauro und Schon, 2003; Zeviani und Carelli, 2003).

Weil die meisten Gewebe oxidative Phosphorylierung betreiben, sind die Symptome von mitochondrialen Erkrankungen sehr heterogen und mitunter schwer zu diagnostizieren. Besonders stark ausgeprägt sind Beeinträchtigungen natürlich in Muskeln und Nerven, welche einen hohen Energiebedarf aufweisen (Munnich *et al.*, 1992). In Muskelfasern können histologische Merkmale zur Diagnose von mtDNA-Deletionen verwendet werden, nämlich eine COX-Defizienz und das Auftreten

sogenannter „ragged red fibers“ nach Gomori Trichom-Färbung (Mita *et al.*, 1989). Allgemein ist es jedoch schwer, direkte Zusammenhänge zwischen den auftretenden, mitunter sehr vielfältigen Symptomen und Art und Ausprägung einer mtDNA-Mutation zu erkennen. Man geht jedoch davon aus, dass bei Deletionen der mtDNA die Anzahl deletierter Moleküle einen wesentlich größeren Einfluss auf die klinischen Symptome hat als die Größe oder Position der Deletion (Zeviani *et al.*, 1988).

Eine besonders häufig auftretende mtDNA-Deletion, die auch als repräsentativer Biomarker für die Integrität des mitochondrialen Genoms gilt, ist die in Abb. 1.7 dargestellte Common Deletion (Porteous *et al.*, 1998; Schon *et al.*, 1989; Shoffner *et al.*, 1989), die mittels Realtime-PCR quantifizierbar ist (Koch *et al.*, 2001). Diese 4977 bp große Deletion entsteht zwischen zwei „direct repeats“ von bp 8469 bis bp 13447. Es kommt zu einem Verlust von mehreren Genen, die für Proteine der Atmungskette und mitochondriale tRNAs kodieren (vier Proteine des Komplex I, ein Protein des Komplex IV, zwei Proteine des Komplex V und fünf tRNAs).

Die mit solchen Deletionen bzw. anderen „large scale rearrangements“ assoziierten mitochondrialen Erkrankungen werden phänotypisch in hauptsächlich drei Krankheitsbilder unterteilt (Holt *et al.*, 1988; Moraes *et al.*, 1989; Rotig *et al.*, 1990). Diese sind das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS), die chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO) und das Pearson-Syndrom (PS).

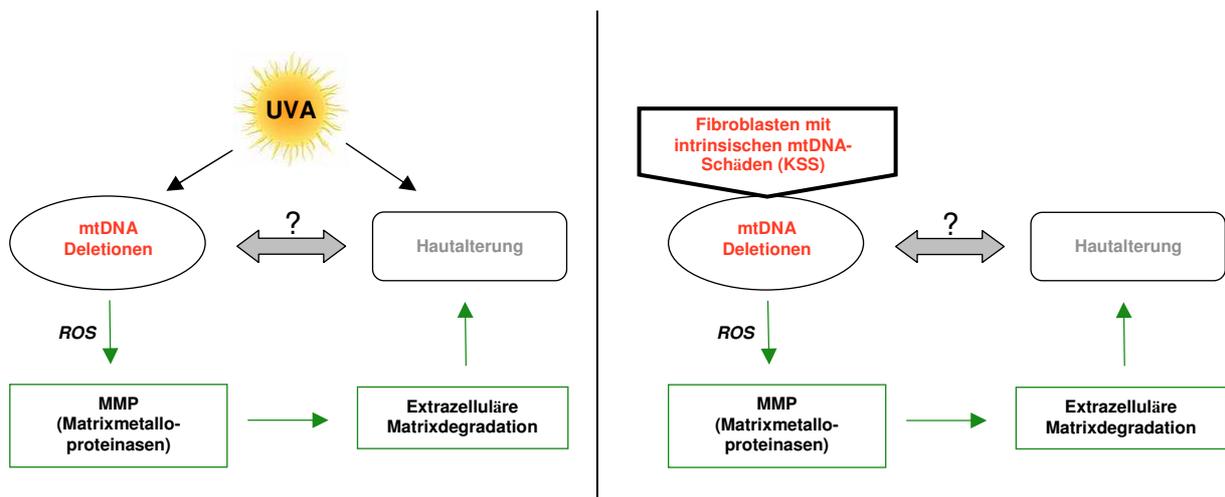
Bei der chronisch progressiven externen Ophthalmoplegie kommt es zu einer Lähmung der Augenmuskulatur (Ptosis) und teilweise auch zu Problemen der Herzmuskulatur. Diese Krankheit setzt erst im Erwachsenenalter ein und verschlimmert sich dann fortlaufend (Zeviani und Di Donato, 2004). Das Pearson-Syndrom ist eine seltene pädiatrische Multiorganerkrankung, die bereits im Säuglingsalter einsetzt (Kleinle *et al.*, 1997; Rotig *et al.*, 1990) und meistens vor dem dritten Lebensjahr zum Tod der Patienten führt. Gekennzeichnet ist diese Krankheit vor allem durch eine sideroblastische Anämie und eine exokrine Pankreasinsuffizienz. Überlebt der Patient die ersten Lebensjahre, so kann die Krankheit in das Kearns-Sayre-Syndrom übergehen (McShane *et al.*, 1991; Simonsz *et al.*, 1992). Dieses ist ebenfalls eine progressive Multiorganerkrankung, die vorwiegend post-mitotische Gewebe wie z.B. das Nervensystem, das Herz oder die Skelettmuskulatur betrifft (Di Mauro and Schon, 2003; Kearns and Sayre, 1958; Puoti *et al.*, 2003). In der Skelettmuskulatur kann der Gehalt an mtDNA-Molekülen mit Deletionen bis zu 50 % betragen (Shanske *et al.*, 1990). Als Leitsymptome gelten die wie bei der CPEO beobachtete Lähmung der äußeren Augenmuskulatur (Ptosis) und Reizleitungsstörungen des Herzens. Weiterhin werden allgemeine Muskelschwäche, Sensibilitätsstörungen, verminderte Reflexe und Gleichgewichtsstörungen (Ataxie) beobachtet. KSS setzt in der Regel nicht sofort im Säuglingsalter, aber spätestens vor dem 20. Lebensjahr ein (Zeviani *et al.*, 1988). Nach einer progressiven Zunahme der Symptomatik kommt es bereits im Alter zwischen 30 und 50 Jahren zum Tod (Scheffler, 2001). Obwohl dieselben „large scale rearrangements“ wie die Common Deletion in allen drei Krankheitsbildern gefunden wurden, unterscheidet sich vermutlich der Anteil und die Verteilung der Deletionen in den verschiedenen Geweben und Zellen, wobei die Übergänge scheinbar fließend sind (Holt *et al.*, 1988).

Zur Therapie mitochondrialer Erkrankungen wurde bislang nur eine Reihe unterstützender Maßnahmen wie Nahrungssupplementierung, operative Korrektur von Ptosis, Behandlung von Krämpfen oder Laktat-Azidose angewandt, die allerdings nur die Symptome lindern können, nicht aber die molekulare Ursache beheben (Zeviani und Di Donato, 2004). Neueste Therapieansätze basieren auf

gentherapeutischen Maßnahmen (Cwerman-Thibault *et al.*, 2010). So konnte für die Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), eine durch Punktmutationen ausgelöste Erkrankung der retinalen Ganglienzellen des optischen Nervs, eine erfolgreiche Gentherapie am Rattenmodell durchgeführt werden (Marella *et al.*, 2010).

## 1.4 Experimenteller Ansatz und Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die funktionellen Konsequenzen von mitochondrialen DNA-Deletionen auf die Hautalterung am Modell des dermalen Äquivalents sowie am Vollhautmodell zu überprüfen. Dazu wurden Fibroblasten von Patienten des Kearns-Sayre-Syndroms (KSS) verwendet, die bereits intrinsisch einen hohen Gehalt an der mitochondrialen Common Deletion aufweisen. Der Vorteil dieses Modells liegt in der Tatsache, dass es nicht nötig ist, die Common Deletion zuerst durch UV-Bestrahlung zu erzeugen. Unerwünschte und nicht kontrollierbare Nebeneffekte durch eine Bestrahlung konnten so ausgeschlossen werden und ausschließlich der Effekt der mtDNA-Deletion auf die Hautalterung untersucht werden (Abb. 1.8).



**Abb. 1.8: Experimenteller Ansatz zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen mtDNA-Deletionen und der lichtinduzierten Hautalterung.** Anstatt mtDNA-Deletionen durch UVA-Bestrahlung zu induzieren (links), wurden Fibroblasten mit intrinsischen mtDNA-Schäden verwendet (rechts). So ließ sich der Einfluss von mtDNA-Deletionen ohne Nebeneffekte durch UVA auf die Hautalterung ermitteln und überprüfen, inwieweit ROS und MMP daran beteiligt sind.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

- (1) Welche Auswirkungen auf die Funktionalität und Struktur einer Kollagenmatrix haben Fibroblasten mit intrinsisch hohem Gehalt an mtDNA-Deletionen bei Langzeitkultivierung in dermalen Äquivalenten?
- (2) Welche (licht-)alterungsrelevanten Faktoren werden von diesen Fibroblasten in der quasi-*in vivo*-Umgebung eines dermalen Äquivalents exprimiert?

- (3) Es konnte gezeigt werden, dass in KSS-Fibroblasten in Monolayerkulturen ein höherer ROS-Gehalt vorhanden ist (Majora *et al.*, 2009). Wie verhält sich das bei Kultivierung im dermalen Äquivalent?
- (4) Wie wirkt sich der Einsatz von Antioxidantien und Retinoiden, beides wichtige Therapeutika von gealterter Haut in der Dermatologie, auf die KSS-dermalen Äquivalente aus?
- (5) Ist es möglich, Vollhautäquivalente mit mtDNA-deletierten KSS-Fibroblasten im dermalen Bereich zu generieren und wenn ja, welchen Einfluss auf die Ausbildung und Barrierefunktion der epidermalen Schicht haben sie dann?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Primäre humane Zellen

Zellen	Areal der Biopsie	Alter des Spenders	Geschlecht des Spenders	Herkunft/ Isolation	Besonderheit
G1490/96 (KSS96)	Arm	10 Jahre	weiblich	Universitätsklinik Göttingen, Professor Wilichowski	Spender mit Kearns-Sayre-Syndrom: positiv für Common Deletion
G1261/95 (KSS95)	Oberschenkel	9 Jahre	weiblich		
F102	Vorhaut	8 Jahre	männlich	Florence-Nightingale-Krankenhaus, Düsseldorf; Isolation im eigenen Labor	
F107	Vorhaut	7 Jahre	männlich		
F131	Vorhaut	9 Jahre	männlich		
Keratinocyten von diversen Spendern	Vorhaut	<10 Jahre	männlich		

#### 2.1.2 Chemikalien und Lösungen für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz)
Antibiotika/Antimykotika (100x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ascorbinsäure	Sigma (Taufkirchen)
BPE	Invitrogen (Karlsruhe)
Bromdesoxyuridin	Sigma (Taufkirchen)
Choleratoxin	Sigma (Taufkirchen)
DMEM High Glucose	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva (Heidelberg)
DPBS (-CaCl <sub>2</sub> , -MgCl <sub>2</sub> )	Invitrogen (Karlsruhe)
EGF, human, rekombinant	Biochrom AG (Berlin)
Ethanolamin (12 mg/ml)	Biochrom AG (Berlin)
Fötale Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin (100x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerin	Sigma (Taufkirchen)
Ham's F12	Sigma (Taufkirchen)
Hydrocortison (1 mg/ml)	Biochrom AG (Berlin)
Insulin, bovin (10 mg/ml)	Biochrom AG (Berlin)
Kollagenase aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma (Taufkirchen)
Kollagen, Typ1 (~5 mg/ml) in essigs. Lösung	Symatase Biomatériaux (Chaponost, France)
MCDB 153 Keratinocyten Basismedium	Biochrom AG (Berlin)
MEM (10x)	Invitrogen (Karlsruhe)
MEM (25 mM Hepes)	Invitrogen (Karlsruhe)
N-Acetylcystein (NAC)	Sigma (Taufkirchen)
NaHCO <sub>3</sub>	Invitrogen (Karlsruhe)
NaOH (1M, sterile Lösung)	Sigma (Taufkirchen)
Natriumpyruvat (100x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Nicht essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom AG (Berlin)
Penicillin/Streptomycin (100x)	Biochrom AG (Berlin)

Phosphoethanolamin (28 mg/ml)	Biochrom AG (Berlin)
SFM Keratinozytenmedium	Invitrogen (Karlsruhe)
Trichostatin A	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin-EDTA (0,5%/0,05%)	Invitrogen (Karlsruhe)
Uridin	Sigma (Taufkirchen)

### 2.1.3 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Anzuchtmedium für humane dermale Fibroblasten	500 ml DMEM 1% Antibiotika/Antimykotika 1% L-Glutamine 1% Natriumpyruvat 200 µM Uridin 10% hitzeinaktiviertes FCS
Synthesemedium 1 (Synthese dermaler Äquivalente)	17,6 ml MEM (10x) 5,10 ml NaHCO <sub>3</sub> (7,5%) 0,88 ml L-Glutamin 0,88 ml Natriumpyruvat 0,88 ml nicht essentielle Aminosäuren 0,088 ml Penicillin/Streptomycin 0,044 ml Antibiotika/Antimykotika 75 ml steriles Wasser
Synthesemedium 2 (Synthese dermaler Äquivalente)	50 ml MEM (25 mM Hepes) 0,5 ml L-Glutamin 0,5 ml Natriumpyruvat 0,5 ml nicht essentielle Aminosäuren 0,1 ml Penicillin/Streptomycin 0,05 ml Antibiotika/Antimykotika 5 ml FCS
Synthesemedium 3 (Synthese dermaler Äquivalente)	3,22 ml Synthesemedium 1 0,63 ml FCS 0,35ml NaOH (0,1 N) 0,2 ml Synthesemedium 2
Keratinozytenmedium, serumfrei	500 ml Basismedium MCDB 153 500 ml SFM-Medium 250 µl Insulin (10 mg/ml) 250 µl Hydrocortison (1 mg/ml) 250 µl Ethanolamin (12 mg/ml) 250 µl Phosphoethanolamin (28 mg/ml) 25 mg BPE 10 µl humanes rekombinantes EGF (0,5 mg/ml) 5 ml L-Glutamin 5 ml Antibiotikum/Antimykotikum

FAD<sub>reduziert</sub>  
(Kultivierung von Vollhautäquivalenten)

350 ml DMEM  
120 ml Ham's F12  
25 ml FCS  
5 ml Na-Pyruvat  
5 ml Penicillin/Streptomycin  
200 µg Hydrocortison  
4,2 µl Cholera toxin (0,01 mg/ml)  
5 ml L-Glutamin  
1 ml Uridin (100 mM), bei KSS-Kultivierung  
500 µl Ascorbinsäure (50 mg/ml), frisch  
zugesetzt

## 2.1.4 Laborchemikalien

Bezeichnung	Hersteller (Firmensitz)
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid-Lösung 30% (29:1)	Applichem (Darmstadt)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
α-Chymotrypsin	Sigma (Taufkirchen)
β-Mercaptoethanol	Sigma (Taufkirchen)
Bradford-Reagenz	BioRad (München)
Brij 35	Sigma (Taufkirchen)
Chloroform	Sigma (Taufkirchen)
DEPC	Sigma (Taufkirchen)
Dithiothreitol	Applichem (Darmstadt)
DNA Minikit Qiamp	Qiagen (Hilden)
dNTPs	Invitrogen (Karlsruhe)
Einbettmedium für Kryoschnitte	Sakura (Staufen)
Gelatine	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaisers Glycerin-Gelatine	Merck (Darmstadt)
Kollagen Typ 1, Fluorescein-gequencht, bovin	EnzChek, Invitrogen (Karlsruhe)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Meerettich-Peroxidase Substrat-Lösung	ChemiGlow, Biozym (Hess. Oldendorf)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
M-MLV rev. Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Paraffin	Paraplast Plus, McCormick (St. Louis, MO)
Paraformaldehyd	Roth (Karlsruhe)
Poly(dT)-Primer	Invitrogen (Karlsruhe)
Proteinmarker Rainbow Full Range	GE Healthcare (München)
RNAse Out	Invitrogen (Karlsruhe)
SDS	Roth (Karlsruhe)
SybrGreen	Invitrogen (Karlsruhe)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Thermolysin	Sigma (Taufkirchen)
Trifluoressigsäure	Sigma (Taufkirchen)
TRIS	Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen)
TRIzol	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Roth (Karlsruhe)
wässr. Eindeckmedium	Citifluor (London, UK)
xylohaltiges Eindeckmedium	Entellan, Merck (Darmstadt)

## 2.1.5 Antikörper und Färbelösungen

### Primärantikörper

<i>Antigen</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Bestellnr.</i>	<i>Hersteller</i>
MMP1	Schaf, polyklonal	1:1000	Immunoblot	PC166	Binding Site
MMP1	Kaninchen, polykl.	1:100	Immunhisto	M3940	Sigma
DNPH	Kaninchen, polykl.	1:1000	Immunoblot	D9656	Sigma
GAPDH	Maus, monoklonal	1:80000	Immunoblot	ab8245	Abcam
BrdU	Maus, monoklonal	1:1000	Immunhisto	B2531	Sigma

### Sekundärantikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Spezies</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Detektion</i>	<i>Bestellnr.</i>	<i>Hersteller</i>
anti-Schaf	Kaninchen	1:1000	Peroxidasereaktion	402100	Calbiochem
anti-Maus	Kaninchen	1:5000	Peroxidasereaktion	P0260	Dako
anti-Kaninchen	Ziege	1:200	Fluoreszenz A594, rot	A11020	Invitrogen
anti-Kaninchen	Schwein	1:1000	Peroxidasereaktion	P0217	Dako
anti-Maus, biotinyliert	Pferd	1:200	Peroxidasereaktion	BA2000	Vector

### Färbelösungen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Hersteller</i>
Dihydrorhodamin	Histologie	Sigma (Taufkirchen)
DNPH	Immunoblot	Sigma (Taufkirchen)
Picrosirius Red (Direct Red 80)	Histologie	Sigma (Taufkirchen)
Eosin	Histologie	Merck (Darmstadt)
Hämatoxylin	Histologie	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brillant Blue R-250	Western Blot	BioRad (München)
ABC-Kit, Vectastain	Histologie	Vector (Berlingame, CA)
AEC-Kit, Vectastain	Histologie	Vector (Berlingame, CA)

## 2.1.6 Zubehör für Zellkultur und Labor

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Firmensitz)</b>
Blotmembran, Nitrozellulose	Schleicher & Schüll (Dassel)
Elektrophoresekammer	BioRad (München)
Erlenmeyerkolben, weit	50 ml Schott (Mainz)
Gelkammer für SDS-PAGE	Mini Transblot, BioRad (München)
Gitter zur Kultur von Hautäquivalenten, Edelstahl	AD 30 mm, Höhe 5 mm CSE Company, France
Glaszylinder	ID 10 mm Fa. Vorhees (Neuss)
Glaszylinder	ID 12 mm Fa. Vorhees (Neuss)
Glaszylinder	ID 15 mm Fa. Vorhees (Neuss)
Glaszylinder	ID 18 mm Fa. Vorhees (Neuss)
Mikroliterpipetten	10 µl Eppendorf (Hamburg)
Mikroliterpipetten	100 µl Eppendorf (Hamburg)
Mikroliterpipetten	1000 µl Eppendorf (Hamburg)
Neubauerkammer	Brand (Wertheim)
Petrischalen, unbeschichtet	60 mm BD Falcon (Heidelberg)
Pipettierhilfe	Pipetus, Hirschmann (Eberstadt)

Reaktionsgefäße	0,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße	2 ml	Eppendorf (Hamburg)
Realtime-PCR-Platte	96-well	Thermo (Schwerte)
Sterilfiltriereinheit	500 ml	Millipore (Schwalbach)
Superfrost-Objektträger		Thermo (Schwerte)
Zellfilter, Nylon	100 µm	BD Falcon (Heidelberg)
Zellkulturflaschen	T175	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturflaschen	T75	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturschalen	100 mm	TPP (Trasadingen, CH)
Zentrifugenröhrchen	15 ml	TPP (Trasadingen, CH)
Zentrifugenröhrchen	50 ml	TPP (Trasadingen, CH)

## 2.1.7 Geräte für Zellkultur und Labor

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller (Firmensitz)</b>
Analysenwaage	Sartorius CP124S (Göttingen)
Blottingapparatur, semi-dry	Biometra (Göttingen)
Fluoreszenz-/Chemilumineszenzdetektor mit CCD-Kamera	FluorChem 8900, Biozym (Hess. Oldendorf)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX60 (Hamburg)
GC-MS/MS	Varian-Saturn 2000 (Darmstadt)
Inkubator	Hera Cell 240, Heraeus (Hanau)
Kryokonsole	Tissue Tek, Satura (Staufen)
Kryotom	Leica CM3050 S (Wetzlar)
Lichtmikroskop	Zeiss Axiovert 25 (Jena)
Netzgerät Elektrophorese	Peqlab EV202 (Erlangen)
Photometer	Eppendorf (Hamburg)
Realtime-PCR System	BioRad MyiQ und iCycler (München)
Schlittenmikrotom	Microm HM 400 (Heidelberg)
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus (Hanau)
Thermocycler	Biometra (Göttingen)
Tischzentrifuge	Eppendorf 5417R (Hamburg)
Vakuumfiltrationsprozessor	Tissue Tek, Satura (Staufen)
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R, Thermo (Schwerte)

## 2.1.8 Computersoftware

<b>Programm</b>	<b>Funktion</b>
AlphaEaseFC	Fluoreszenzdetektion und Bildbearbeitung
AnalySIS	Mikroskopische Bildbearbeitung
BioRad iQ5	Realtime-PCR-Datenauswertung
GraphPad Prism	Statistische Berechnungen
Image J	Mikroskopische Bildbearbeitung

## 2.2 Zellkultivierung (Monolayer)

### 2.2.1 Isolation von epidermalen primären Keratinozyten

Humane Vorhäute wurden in serumfreiem Keratinozytenmedium bei 4°C bis zur Präparation gelagert (nicht länger als 10 Tage). Die Haut wurde intensiv mit PBS gewaschen, um Blut- und Medienreste zu entfernen. Das Unterhautfettgewebe wurde grob entfernt. Die Haut wurde in Stücke von etwa 0,5 x 1 cm<sup>2</sup> geschnitten und in Zellkulturschalen über Nacht bei 4°C in ca. 14 ml Thermolysin-Lösung (0,5 mg/ml) inkubiert. Dabei sollten die Stücke möglichst mit der Epidermisseite nach unten liegen. Bei sehr frischen Proben sollte mehr Thermolysin eingesetzt werden. Die Epidermis ließ sich dann in der Regel leicht mit zwei Pipetten abziehen und in ein Zentrifugenröhrchen überführen. Der Rest aus Dermis und verbliebenem Fettgewebe konnte zur Fibroblasten-Isolation (siehe 2.2.2) eingesetzt werden.

Zur Lyse der Epidermis wurden 3 ml Trypsin/EDTA (0,5%/0,05%) zugefügt, die am Rand klebenden Epidermisstücke ggf. herunterzentrifugiert und ca. 10 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch kräftiges Schütteln und Schlagen konnten die Keratinozyten aus der Epidermis gelöst werden und mit Hilfe eines Zellsiebes mit einer Porengröße von 100 µm Zellfilter filtriert, um Epidermisreste und Verklumpungen zu entfernen. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen abgefüllt und die Thermolysin-Aktivität durch Zugabe von serumhaltigem FAD-Medium blockiert. Die Keratinozyten wurden mit Hilfe einer Neubauerkammer gezählt und auf 2 Mio. Zellen/ml eingestellt und aliquotiert. Zur weiteren Verwendung wurden sie entweder in serumfreiem Keratinozytenmedium in T75er Zellkulturflaschen angezogen oder mit 10% Glycerin bei -80°C eingefroren, um später in flüssigen Stickstoff überführt zu werden. Die Keratinozyten wurden in P1 oder 2 in den Versuch genommen.

Ansetzen der Thermolysin-Lösung (500 ml-Ansatz):

10 mM HEPES	1,3 g
142 mM NaCl	4,15 g
6,7 mM NaOH	8,6 mg
1 mM CaCl <sub>2</sub>	55 mg

Der Puffer wurde in Wasser gelöst, auf pH 7,4 eingestellt und sterilfiltriert.

Zur so angesetzten Pufferlösung kamen 250 mg Thermolysin. Die fertige Thermolysinlösung wurde zu 14 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 2.2.2 Isolation von primären dermalen Fibroblasten

Die von der Keratinozytenisolation verbliebene Dermis der Vorhäute wurde zur Fibroblastenisolation verwendet. Dazu wurde verbliebenes Fettgewebe mit dem Skalpell entfernt und die Dermis in möglichst kleine Stücke zerteilt. Diese Stücke wurden möglichst mit der Hautunterseite nach unten auf eine Zellkulturschale gelegt und ca. 5-10 min trocknen gelassen. Anschließend wurde vorsichtig mit Anzuchtmedium aufgefüllt. Das Auswachsen der Fibroblasten benötigte ca. 7-14 Tage. Danach wurden die Fibroblasten entweder zur weiteren Verwendung in T175 Zellkulturflaschen passagiert, oder in Einfriermedium (Anzuchtmedium mit 10% DMSO) aufgenommen und bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

### 2.2.3 Kultivierung von Keratinozyten

Keratinozyten wurden als Monolayer-Kulturen in T75 Zellkulturflaschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> angezogen und bei ca. 80%-iger Konfluenz passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA von der Kulturflasche gelöst, die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von FAD-Medium inhibiert und die Zellen anschließend abzentrifugiert (1 min bei 1000 U/min).

Die Zellen wurden in serumfreiem Medium resuspendiert und auf zwei neue T75 Flaschen verteilt. Es wurden 15 ml Medium zugefügt und das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

### 2.2.4 Kultivierung von Fibroblasten

Fibroblasten wurden als Monolayer-Kulturen in T175 Zellkulturflaschen in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM-Medium verwendet, das mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS), 1% Antibiotika/Antimykotika, 1% L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat und 200 µM Uridin supplementiert war. Die Supplementierung der Fibroblasten mit Uridin war erforderlich, da unter anderem Fibroblasten von Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) kultiviert wurden, die konstitutiv hohe Deletionen in ihrer mitochondrialen DNA aufwiesen. Eine hiermit assoziierte Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette führt zur Hemmung der Dihydroorotsäuredehydrogenase (DHODH), so dass es zu einer Verminderung der durch dieses Enzym katalysierten Uridinsynthese kommt. Das Nährmedium wurde alle 2-3 Tage durch 20 ml frisches Medium ersetzt.

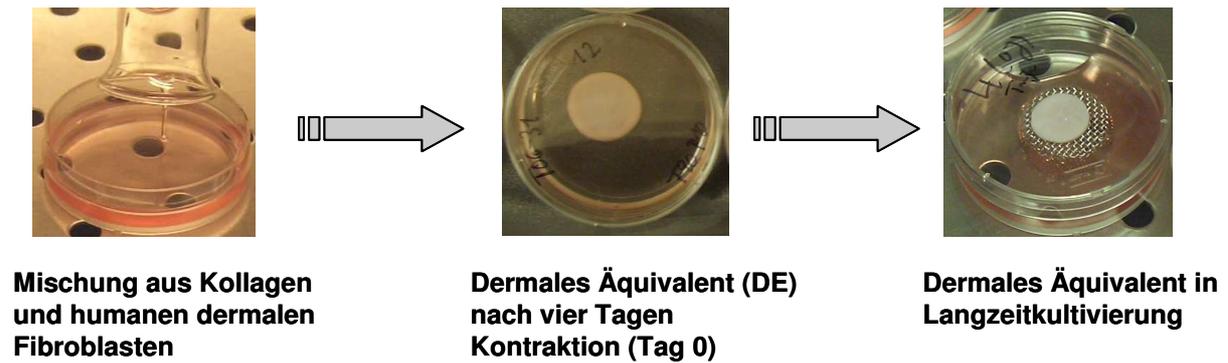
Eine Passagierung der Zellen erfolgte, sobald die Fibroblasten in einem konfluenten dichten Monolayer gewachsen waren. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C in 5 Minuten vom Plastikboden der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 ml Nährmedium inaktiviert und die abgelösten Zellen im Verhältnis 1:3 (bei KSS 1:2) in neue Kulturflaschen ausgesät.

## 2.3 Herstellung und Kultivierung dermalen Äquivalente

### 2.3.1 Synthese von dermalen Äquivalenten

Die Synthese von dermalen Hautäquivalenten erfolgte gemäß Asselineau *et al.*, 1984 wie folgt:

Humane dermale Fibroblasten wurden wie im Kapitel 2.2.4 beschrieben bis zur Konfluenz kultiviert und mittels Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl und Pelletierung der Zellen bei 200 g für 5 Minuten wurden die Fibroblasten in Synthesemedium 2 (2.1.3) resuspendiert (2 Mio. Zellen/ml). Von dieser Zellsuspension wurden 0,5 ml mit 4,4 ml Synthesemedium 3 und 2,0 ml Kollagenlösung vorsichtig in einem 50 ml Erlenmeyerkolben gemischt und in eine mit Synthesemedium 3 benetzte, unbeschichtete Petrischale (60 mm) überführt. Innerhalb der nächsten 3-4 Tage erfolgte die Kontraktion der dermalen Äquivalente bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank.



**Abb. 2.1: Synthese dermaler Äquivalente.** Nach der initialen Kontraktionsphase, in der die Fibroblasten aus löslichem Kollagen eine Matrix generieren, können die DE mehrere Wochen kultiviert werden.

### 2.3.2 Kultivierung von dermalen Äquivalenten

Nach Abschluss des Kontraktionsvorgangs der dermalen Äquivalente an Tag 4 ist eine Kultivierung für mind. sechs weitere Wochen möglich. Dafür wurde das Hautäquivalent mittels Pinzette und Plastikschaber vorsichtig auf ein Edelmetallgitter überführt, das in einer neuen unbeschichteten Petrischale (60 mm) platziert wurde. Durch Zugabe von Nährmedium bis zum Rand des Gitters (ca. 10 ml) wurden die Fibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel mit Nährstoffen versorgt. Ein Mediumswechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

### 2.3.3 Isolation von Fibroblasten aus dermalen Äquivalenten

Die Isolierung humaner dermaler Fibroblasten aus dem dreidimensionalen Kollagengel eines dermalen Hautäquivalents erfolgte durch Kollagenaseverdau. Dafür wurden die dermalen Hautäquivalente mit PBS gewaschen und in 1 ml einer Kollagenase-Lösung (2 mg/ml in PBS) für 30-60 min bei 37°C und 400 U/min inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Nährmedium wurden die Zellen bei 200 g für 5 min pelletiert und bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert.

## 2.4 Herstellung und Kultivierung von Vollhautmodellen

Auf 3-4 Tage alte DE (Herstellung siehe 2.3.1) wurde ein Glaszylinder (Durchmesser entsprechend des Umfangs des DE) aufgesetzt und mind. sechs Stunden in  $FAD_{red}$  vorinkubiert (Ascorbinsäure (50 $\mu$ g/ml) wurde stets frisch zugesetzt). Die Keratinozyten wurden wie unter 2.2.3 beschrieben von der Kulturflasche abgelöst und die Zellsuspension auf  $10^6$  Zellen/ml in  $FAD_{red}$  eingestellt. Anschließend wurden sie in den Glaszylinder eingebracht ohne den Überstand darin abzusaugen. Je nach Fläche des DE wurde eine angepasste Zellzahl aufpipettiert:

Glaszylinder Innendurchmesser in mm	Zellzahl Keratinozyten
18	500000
15	350000
12	230000
10	150000

Die Anpassung war notwendig, da die DE als kontrahierendes Modell verwendet wurden. Insbesondere die KSS DE weisen ein stärkeres Kontraktionsverhalten auf (Majora *et al.*, 2009), welches die Anpassung mit Hilfe verschieden großer Glaszylinder nötig machte.

Nach einem Tag wurden die Zylinder vorsichtig mit einer Pinzette entfernt und die Äquivalente auf Gitter gesetzt, also luftexponiert. Sie konnten ein bis zwei Wochen in  $FAD_{\text{reduziert}}$  kultiviert werden.



**Abb. 2.2: Das Vollhautäquivalent.** Mit Hilfe eines Glaszylinders können Keratinozyten auf das kontrahierte DE aufgebracht werden (links). Nach einer Woche hat sich eine epidermis-ähnliche Schicht ausgebildet (rechts, HE-Färbung, 400fache Vergrößerung).

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Isolation von DNA aus dermalen Äquivalenten

Zur Isolation von DNA aus den Fibroblasten eines dermalen Äquivalents wurde das Äquivalent zunächst mit PBS gewaschen und dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die DNA wurde mittels QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) wie folgt isoliert: Zum grob zerkleinerten DE wurden  $200\ \mu\text{l}$  Puffer AL zugefügt sowie  $20\ \mu\text{l}$  Proteinase K. Diese Mischung ließ man ca. 60 min bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubieren, um die Fibroblasten aus dem DE zu lösen und die DNA zugänglich zu machen. Danach wurden noch einmal  $200\ \mu\text{l}$  AL-Puffer zugegeben und 10 min bei  $70^{\circ}$  inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden  $200\ \mu\text{l}$  Ethanol zugesetzt, geschüttelt und auf die Reinigungssäule gegeben. Nach 1 min Zentrifugation ( $8000\ \text{U}/\text{min}$ ) wurde mit  $500\ \mu\text{l}$  Puffer AW1 gewaschen und abzentrifugiert, dann mit Puffer AW2 (3 min,  $14000\ \text{U}/\text{min}$ ) und zentrifugiert. Zur Elution der DNA wurden  $80\ \mu\text{l}$  AE-Puffer verwendet (1 min Inkubation, 1 min Zentrifugation). Dabei wurde das erste Eluat wieder auf die Säule aufgegeben, um eine größere Ausbeute zu erhalten.

### 2.5.2 Isolation von RNA aus dermalen Äquivalenten

DE wurden in PBS gewaschen und im 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml TRIzol-Reagenz versetzt. Bis zur Isolation konnten die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Nach dem Auftauen verblieben die DE 5 min bei Raumtemperatur, bevor dann  $200\ \mu\text{l}$  Chloroform aufgegeben wurden. Die Gefäße wurden dann mehrmals intensiv geschüttelt, so dass eine gute Phasendurchmischung stattfinden konnte. Danach ließ man die Phasen kurz absetzen, bevor man 15 min zentrifugierte. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, wobei es vermieden

wurde, die Interphase mitzuüberführen, in der sich die DNA ansammelt. Die RNA wurde durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol gefällt und 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75%-igem Ethanol gewaschen, erneut 5 min zentrifugiert und 10 min an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 56 °C gelöst. Die Aufbewahrung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

### 2.5.3 Isolation von RNA aus der epidermalen Schicht von Vollhautäquivalenten

Die epidermale Schicht wurde mit einer Pinzette vom dermalen Teil abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolation erfolgte wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben mit TRIzol. Es wurden jedoch nur 0,5 ml TRIzol zur Aufnahme der epidermalen Schicht der Vollhautäquivalente verwendet.

### 2.5.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer aromatischen Basen im UV-Bereich absorbieren, wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA bzw. RNA durchgeführt. Dem Absorptionsmaximum entsprechend wurde die Extinktion bei 260 nm bestimmt, die im Bereich von 0,1 bis 1 proportional zur Nukleinsäure-Konzentration ist. Eine Absorption von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml und bei einzelsträngiger RNA 40 µg/ml, so dass sich die Konzentrationen folgendermaßen berechnen:

$$OD_{260} * 50 * \text{Verdünnungsfaktor} = \text{dsDNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

$$OD_{260} * 40 * \text{Verdünnungsfaktor} = \text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

Zur Messung wurden jeweils 2 µl Probe plus 98 µl H<sub>2</sub>O gemischt und in eine UV-Küvette überführt. Da Proteine aufgrund ihrer aromatischen Aminosäuren im UV-Bereich ein Absorptionsmaximum bei 280 nm besitzen, erlaubt die Absorptionsmessung bei 280 nm zusätzlich eine Aussage über die Reinheit der Nukleinsäure-Probe. Das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte je nach Lösungsmittel bei DNA zwischen 1,7 und 2 liegen, bei RNA-Proben bei ~1,8.

### 2.5.5 Herstellung von komplementärer DNA (cDNA)

Die isolierte RNA wurde mit M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) reverser Transkriptase und Oligo-poly(dT)-Primern, die am Poly-A-Schwanz der mRNA binden in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 1,5 µg RNA mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 12 µl verdünnt, mit 1 µl poly(dT)-Primer (1 µg/µl) versetzt und die Primer-Anlagerung 5 min bei 60 °C im Thermocycler durchgeführt. Danach wurden folgende Mischung zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert:

Lösung	Volumen pro Ansatz in µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	7
First-Strand (FS)-Puffer (5x)	8
Dithiothreitol	4
dNTPs (10 mM)	4
RNAse Out (40 U/µl)	2
RTase M-MLV (20 U/µl)	2

Zum Abschluss der Reaktion wurde noch bei 70°C 10 min weiterinkubiert Die transkribierte cDNA wurde kurzfristig bei 4°C und langfristig bei -20°C gelagert.

### 2.5.6 Bestimmung der mitochondrialen Common Deletion mittels quantitativer Realtime-PCR

Die Quantifizierung der Common Deletion im mitochondrialen Genom erfolgte wie in Koch *et al.* (2001) beschrieben mittels quantitativer Realtime-PCR:

#### 1x PCR-Ansatz

H <sub>2</sub> O	2,25 µl
Sybr Green	12,5 µl
Primer forward (10 µM)	0,125 µl
Primer reverse (10 µM)	0,125 µl
DNA (100 ng/10 µl)	10 µl

#### PCR-Programm

	50°C	2 min	
Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	] 50 Zyklen
Hybridisierung	60°C	60 sec	
Elongation	während des Aufheizens		

Um die mitochondriale Common Deletion (CD) in Relation zur Gesamtzahl der vorhandenen mtDNA Moleküle zu bestimmen, wurde zusätzlich ein Stück mtDNA als interner Standard (IS) aus einer Region amplifiziert, die sich durch hohe Stabilität auszeichnet. Die absolute Anzahl der deletierten bzw. der gesamten mtDNA-Moleküle kann dann durch Vergleich mit Standardkurven bekannter Molekülzahl mit Hilfe entsprechender Referenzkonstrukte ermittelt werden.

Folgende Oligonukleotide der Firma Operon (Köln) wurden zur absoluten Quantifizierung der verschiedenen Transkripte in der Realtime-PCR eingesetzt:

Name	Sequenz von 5' nach 3'
IS1	GAT TTG GGT ACC ACC CAA GTA TTG
IS2	AAT ATT CAT GGT GGC TGG CAG TA
CD1	ACC CCC ATA CTC CTT ACA CTA TTC C
CD2	AAG GTA TTC CTG CTA ATG CTA GGC T

### 2.5.7 Bestimmung der Genexpression mittels semi-quantitativer Realtime-PCR

Zur Bestimmung der relativen Genexpression bestimmter Gene wurde zunächst die RNA aus DE oder epidermaler Schicht von Vollhautäquivalenten isoliert (2.5.2 und 2.5.3) und in cDNA umgeschrieben (2.5.5). Die relative Quantifizierung verschiedener Transkripte auf cDNA-Ebene erfolgte anschließend wie folgt in einer Real-Time-PCR:

#### 1x PCR-Ansatz

H <sub>2</sub> O	8,5 µl
SYBR Green	12,5 µl
Primer forward (10 µM)	1,5 µl
Primer reverse (10 µM)	1,5 µl
cDNA (siehe 2.5.5)	2 µl

**PCR-Programm**

Denaturierung	94 °C	20 sec	] 45 Zyklen
Hybridisierung	55 °C	20 sec	
Elongation	72 °C	30 sec	

Als intrazelluläres Referenzgen wurde das Gen der 18S ribosomalen RNA verwendet, das unter verschiedenen Bedingungen nahezu gleichmäßig exprimiert wird. Die Expression eines bestimmten Gens X lässt sich damit zwischen zwei Proben A und B wie folgt vergleichen:

Relative Expression von Gen X bei Probe A und Probe B

$$= 2^{-[(CT_{\text{Gen X Probe A}} - CT_{18S \text{ Probe A}}) - (CT_{\text{Gen X Probe B}} - CT_{18S \text{ Probe B}})]}$$

mit CT= cycle treshold

Der CT ist der Schwellenwert, der den Anfang der Phase des exponentiellen Wachstums der Kurve des Fluoreszenzsignals wiedergibt, und an dem das Signal erstmalig über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Folgende von der Firma Operon (Köln) bezogene Oligonukleotide wurden zur relativen Quantifizierung der verschiedenen Transkripte in einer Realtime-PCR eingesetzt:

<b>Name</b>	<b>Sequenz von 5' nach 3'</b>
IL-8 fw	TTTCCACCCCAAATTTATCA
IL-8 rv	AACCCTACAACAGACCCACA
LOX fw	ACATCCTGTGACTATGGCTACC
LOX rv	CTGGGGTTTACACTGACCTTTA
MMP-1 fw	GATGAAAGGTGGACCAACAATTT
MMP-1 rv	CCAAGAGAATGGCCGAGTTC
TIMP-1 fw	TCGTGGCTCCCTGGAACA
TIMP1 rv	CCAACAGTGTAGGTCTTGGTGAAG
VEGF-A fw	GGATTGCGCATTATTTTCTTG
VEGF-A rv	GTATGTATGTGGGTGGGTGTGTCT
SPT-1 fw	GCCGCTACTTGGAGAAAGA
SPT-1 rv	TGTTCCACCGTGACCACAAC
SPT-2 fw	AGCCGCCAAAGTCCTTGAG
SPT-2 rv	CTTGTCCAGGTTTCCAATTTCC
LOR fw	TCACATTGCCAGCATCTTCTCT
LOR rv	GGCTGCTTTTTCTGATAAGACATCT
INV fw	CCCATCAGGAGCAAATGAAAC
INV rv	GCTCGACAGGCACCTTCTG
FLG fw	AAGGAACTTCTGGAAAAGGAATTC
FLG rv	TTGTGGTCTATATCCAAGTGATCCAT
GLC-CER fw	GTACCTTCAGCCGCTATGAGAGTAC
GLC-CER rv	CCTGGATGGGCCCCATAC
ASMase fw	CATACCGCACTGGCAGCTT
ASMase rv	GGCGGTAGGCAGTATGTTG
BD fw	TTCTGATGCCTCTTCCAGTTT
BD rv	GGATGACATATGGCTCCACTCTT
LL-37 fw	TCACCAGAGGATTGTGACTTCAA
LL-37 rv	TGAGGGTCACTGTCCCCATAC
18s rRNA fw	GCCGCTAGAGGTGAAATTCCTTG
18s rRNA rv	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 Western Blot Analyse von MMP-1

Für die Western Blot Analyse wurden ganze DE in Lysispuffer (125  $\mu\text{mol/ml}$  TRIS; 4% SDS; 20% Glycerin; 100  $\mu\text{mol/ml}$  Dithiothreitol) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei 4°C 15 min abzentrifugiert (14000 U/min) und die Überstände in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Proteinbestimmung nach Bradford wurde die Proteinkonzentration in den Lysaten ermittelt. Zur Denaturierung wurden die Lysate 5 min bei 95°C aufgeköcht. Dabei wurden die Proteine mit dem anionischen Detergenz SDS beladen, wodurch die Eigenladung der Proteine unterdrückt und damit ein vergleichbares Ladungs-/Masse-Verhältnis erreicht wird. Die Disulfidbrücken wurden reduktiv mit Dithiothreitol gespalten. Gleiche Mengen Protein, gemischt mit glycerinhaltigem Blaumarker, wurden auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und per TRIS/Glycin-Elektrophorese (100 V, ca. 2 h) aufgetrennt (Laemmli, 1970). Zum späteren Größenvergleich lief ein Größenmarker im Gel mit. Per Semi-dry Blot wurden die Proteine anschließend bei 100 mA auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Dauer ca. 2 h). Nach Blocken unspezifischer Bindestellen mit gelöstem Milchpulver (5% in TBS-T: 0,002% Tween 20 in TRIS-buffered saline) für 1 h bei Raumtemperatur, wurde mit TBS-T gewaschen und über Nacht mit einem Schaf-anti-hMMP-1 polyklonalem Primärantikörper bei 4°C inkubiert (Verdünnung 1:1000). Der Blot wurde mehrmalig mit TBS-T gewaschen und mit einem anti-Schaf Meerettich-Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper (Verdünnung 1:5000) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion der Banden wurde eine Meerettich-Peroxidase-Substrat-Lösung auf dem Blot verteilt, 5 min inkubiert und die Intensität der Chemilumineszenz mittels CCD-Kamera im FluorChem-System aufgenommen. Als Ladungskontrolle wurde der Nachweis von GAPDH auf dem gleichen Blot verwendet.

<b>Ansatz für ein 10%iges PA-Trenngel</b>	<b>Gesamtvolumen 10 ml</b>
H <sub>2</sub> O	4 ml
30% Acrylamidmischung (29:1)	3,3 ml
1,5 M TRIS (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml
<b>Ansatz für das Sammelgel</b>	<b>Gesamtvolumen 3 ml</b>
H <sub>2</sub> O	2,1 ml
30% Acrylamidmischung (29:1)	0,5 ml
1,0 M TRIS (pH 6,8)	0,38 ml
10% SDS	0,03 ml
10% APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml
<b>Ansatz Laemmli-Laufpuffer</b>	<b>Ansatz Transferpuffer für Blotting</b>
0,2 M Glycin	20% Methanol
0,02 M TRIS	50 mM TRIS
0,1% SDS	40 mM Glycin
	0,037% SDS

## 2.6.2 Bestimmung von Proteincarbonylen mittels Oxyblot

Fibroblasten wurden in Lyse-Puffer (125 µmol/ml TRIS; 4% SDS; 20% Glycerin; 100 µmol/ml Dithiothreitol) homogenisiert, 30 min auf Eis gelagert und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Die Carbonylgruppen der Proteine im Lysat wurden mit einem Teil 24%-igem SDS und zwei Teilen 20 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) in 10%-iger Trifluoressigsäure innerhalb von 30 min im Dunkeln derivatisiert. Anschließend wurden die Proben mit 2 mM TRIS-Lösung mit 30% Glycerin und 19% β-Mercaptoethanol neutralisiert. Gleiche Proteinmengen wurde per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (siehe Kapitel 2.6.2). Über Nacht wurde danach mit einem Kaninchen-anti-DNPH-Antikörper bei 4 °C inkubiert. Die Membran wurde mit TBS-T gewaschen und ein anti-Kaninchen Meerettich-Peroxidase konjugierter Zweitantikörper aufgegeben. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Zweitantikörper heruntergewaschen und mit Meerettich-Peroxidase Substrat-Lösung 5 min inkubiert. Auch hier erfolgte die Detektion der Banden mittels CCD-Kamera im FluorChem-System.

## 2.6.3 Gelzymographie zur Bestimmung der MMP-Aktivität

Für die Gelzymographie zur Bestimmung der MMP-Aktivität wurden Fibroblasten mittels Kollagenase-Verdau aus DE isoliert (Kapitel 2.3.3) und anschließend gründlich mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in Lyse-Puffer (125 µmol/ml TRIS; 4% SDS; 20% Glycerin; 100 µmol/ml Dithiothreitol) homogenisiert und gleiche Mengen Protein durch SDS-PAGE aufgetrennt, wobei dem Gel 0,1% Gelatine als MMP-Substrat zugefügt wurde. Danach wurden die Gele 1 h in Renaturierungspuffer, bestehend aus 2,5% Triton-X100, inkubiert. Die Banden wurden bei 37 °C über Nacht in Entwicklungspuffer (0,05 M TRIS pH 7.5; 8 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,2 M NaCl; 0,02 % Brij-35 und 1 µM ZnCl<sub>2</sub>) generiert. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue in Methanol/Wasser mit 10% Essigsäure angefärbt, wobei an den Stellen, an denen die Gelatine abgebaut wurde, keine Blaufärbung zu beobachten war. Falls nötig, wurden die Gele mit 10%-iger Essigsäure entfärbt bis sich die weißen Banden vor dem blauen Hintergrund abzeichneten.

## 2.7 Histochemische Methoden

### 2.7.1 Nachweis von reaktiven Sauerstoffspezies am dermalen Äquivalent

DE wurden in kleine Stücke geschnitten und im schwarzen 1,5 ml Reaktionsgefäß 1h mit 60 µM Dihydrorhodamin 123 (DHR) in PBS bei 37 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen mit PBS wurden die Stücke in Kryoeinbettmedium über flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit dem Kryostat wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt, in eiskalter 2%-iger PFA-Lösung fixiert und mit wäßrigem Eindeckmedium überschichtet. Bei Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies entsteht orange-rot-fluoreszierendes Rhodamin, welches am Fluoreszenzmikroskop analysiert werden kann.

### 2.7.2 Immunhistochemischer Nachweis von MMP-1

DE wurden in kleine Stücke zerteilt, in Kryomedium eingebettet und über flüssigem Stickstoff eingefroren. Am Kryotom wurden 7 µm dicke Schnitte angefertigt. Nach

Trocknung der Schnitte wurden diese 15 min bei -20°C in Aceton fixiert und erneut getrocknet. Die einzelnen Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, in PBS gewaschen und ca. 30 ml Erstantikörperlösung (Kaninchen anti-MMP-1; 1:100 in PBS) aufgeträufelt. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Schnitt nur mit PBS versehen. Es wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert, intensiv mit PBS gespült und der entsprechende Fluorochrom-gekoppelter Zweitantikörper (Ziege anti-Kaninchen; 1:200) aufgegeben. Nach 1-2 h Inkubationszeit im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde auch der Zweitantikörper wieder abgespült, die Schnitte mit wäßrigem Eindeckmedium abgedeckt und am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 2.7.3 Kollagenfärbung mit Picrosirius Red

Kollagenfasern wurden nach Anfärbung mit Picrosirius Red durch ihre Doppelbrechung im polarisierten Licht visualisiert (Sweat *et al.*, 1964). Kryoschnitte wurden in 4%-igem PFA fixiert und 1 h in Sirius Red-Lösung (0.1 % Direct Red 80 in gesättigter Pikrinsäure) und 30 min in 1%-iger Essigsäure inkubiert. Die Schnitte wurden mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit xylolhaltigem Eindeckmedium überschichtet. Zur Analyse wurde ein Lichtmikroskop mit einem Satz Polarisationsfilter verwendet. Dünne Kollagenfasern erschienen grün, dickere Fasern orange-rot.

### 2.7.4 *In situ*-Zymographie zur Bestimmung der MMP-Aktivität

Von DE wurden Kryoschnitte angefertigt, welche aber nicht fixiert wurden. Es wurde eine Lösung aus Kollagen I, das mit fluoreszierenden Chromophoren so stark beladen ist, dass die Fluoreszenz unterdrückt („gequencht“) wird und erst bei Abbau des Kollagens zum Tragen kommt angesetzt (1:10 in 1%-iger Agarose in PBS). Auf den kurz vorgewärmten Objektträger wurden 50 µl dieser Lösung durch Auflegen eines ebenfalls vorgewärmten Deckgläschens schnell und gleichmäßig verteilt. In einer feuchten Kammer wurden die Objektträger 3 h bei 37°C inkubiert. Die resultierende grüne Fluoreszenz an den Stellen, wo ein Kollagenabbau stattfand, wurde umgehend unter dem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

### 2.7.5 Hämatoxylin/Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Für die Hämatoxylin/Eosin-Färbung (Protokoll nach Romeis, 1989) wurden Vollhautäquivalente in 4%-iger PFA-Lösung fixiert, durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Überführung in Xylol entwässert und in flüssigem Paraffin eingebettet. Mit dem Schlittenmikrotom wurden von den gekühlten Blöcken 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Nach Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe, wurden die Schnitte 5 min in saurer Hämalaun-Lösung nach Mayer (0,1% Hämatoxylin; 0,02% Kaliumjodat; 5% Kalialaun; 5% Chloralhydrat; 0,01% Zitronensäure) inkubiert, um die Zellkerne anzufärben. Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült und kurz in saurem Alkohol (0,5% Salzsäure in 70% Ethanol) differenziert, woraufhin erneut mit Leitungswasser gespült wurde. Zur roten Gegenfärbung wurde eine 0,5%-ige Eosin-Lösung (mit 0,05% Eisessig) verwendet. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser wurden die Schnitte über eine aufsteigende Alkoholreihe bis zum Xylol entwässert und mit xylolhaltigem Eindeckmedium überschichtet, um daraufhin lichtmikroskopisch untersucht werden zu können.

### **2.7.6 Immunhistologischer Nachweis des BrdU-Einbaus in proliferierenden Keratinozyten**

Eine Woche alte Vollhautäquivalente wurden 24 h mit 20  $\mu$ M BrdU inkubiert. Wie unter 2.7.5 beschrieben, wurden Paraffinschnitte hergestellt, entparaffiniert und hydriert. Nach kurzem Waschen in PBS wurden endogene Peroxidasen durch 30minütige Inkubation in 0,6%-iger  $H_2O_2$ -Lösung in Methanol blockiert und erneut mit PBS gewaschen. Zur DNA-Denaturierung wurden die Schnitte mit 2 N Salzsäure 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer behandelt. Anschließend wurde zur Neutralisierung mit 0,1 M Borax 5 min gewaschen. Die Schnitte wurden kurz mit Trypsin angedaut und die Antikörperbindestellen mit normalem Ziegenerum (5% in PBS mit 1% BSA und 0,05% Tween 20) geblockt, bevor mit einem Maus-anti-BrdU-Primärantikörper in der Verdünnung 1:1000 in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Die Detektion erfolgte per Avidin-Biotin-Complex-(ABC)-Methode unter Verwendung eines biotinylierten, peroxidase-gekoppelten anti-Maus-Zweitantikörpers. Nach Peroxidaseaktivierung mit  $H_2O_2$  bildete sich durch Oxidation von 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) eine rötlich-braune Färbung. Mit Hämatoxylinlösung wurde kurz gegengefärbt und dann in verflüssigter Kaisers Glycerin-Gelatine eingedeckelt.

### **2.8 GC-MS/MS-Analyse der Kollagenfragmentation über die Quantifizierung von Hydroxyprolin**

Die Kollagenfragmentation in DE wurde per GC-MS/MS nach Fligiel (Fligiel *et al.*, 2003) quantifiziert. Dazu wurden die DE zunächst mit  $\alpha$ -Chymotrypsin (8 h, 37°C) inkubiert. Dabei wurden nur vorgeschädigte Kollagenfasern hydrolysiert. Intakte Kollagenfasern blieben erhalten. Der lösliche Überstand wurde vom Pellet abgetrennt und beide Fraktionen der Totalhydrolyse mit 6 N HCl zugeführt (24 h bei 110°C). Es wurde zur Trockene eingedampft, zur Derivatisierung in Methanol/Trifluoressigsäure wieder aufgenommen und in Ethylacetat zur GC-MS/MS-Analyse gelöst. Der prozentuale Anteil an fragmentiertem Kollagen wurde aus der Menge Hydroxyprolin im Überstand nach  $\alpha$ -Chymotrypsin-Behandlung geteilt durch die Gesamtmenge an Hydroxyprolin im DE berechnet. Für frühe Zeitpunkte der DE-Kultivierung war diese Methode nicht geeignet.

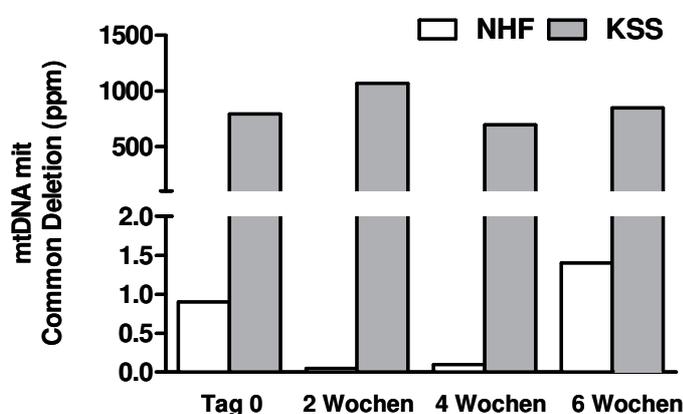
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Auswirkungen von mtDNA-Deletionen auf die Struktur und Funktion der Dermis

Am Modell des dermalen Äquivalents (DE, dermal equivalent) wurden die Auswirkungen von mtDNA-Deletionen auf die dermale Funktionalität untersucht. Dazu wurden Fibroblasten von Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom (KSS), einer mitochondrialen Erkrankung, die mit dem Auftreten von mtDNA-Deletionen assoziiert ist, in DE eingesät, die initiale Kontraktionsphase der DE abgewartet (3-4 Tage) und die DE bis zu sechs Wochen in Langzeitkultur gehalten. Als Kontrollzellen wurden normale humane Fibroblasten (NHF) gleicher Passagenzahl von gesunden, altersgleichen Spendern verwendet. Die Langzeitkultur von KSS DE diente dabei als Modell für den chronischen Verlauf von Alterungsprozessen, insbesondere der lichtinduzierten Hautalterung (Photoaging), welche mit vermehrten mtDNA-Deletionen einhergeht.

##### 3.1.1 Konstant erhöhter Anteil an Common Deletion in dermalen Äquivalenten mit KSS-Fibroblasten in Langzeitkultur

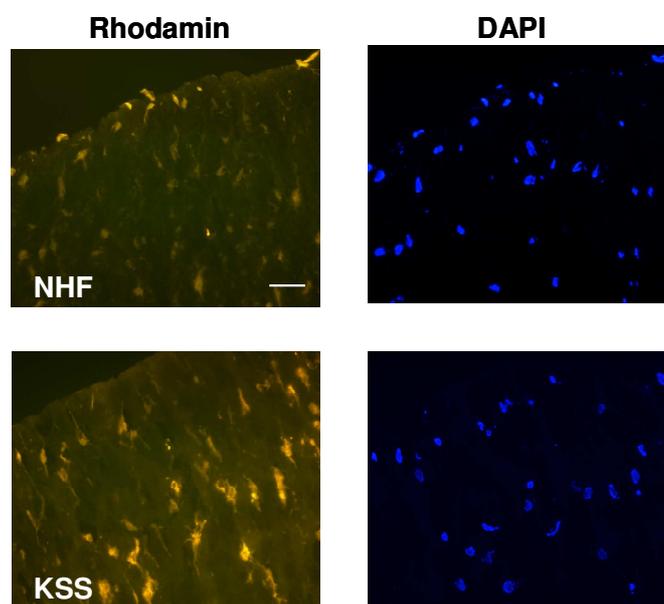
Die 4977 kb große Common Deletion ist ein Biomarker für die Integrität des mitochondrialen Genoms und ein Marker für lichtinduzierte Hautalterung (Berneburg und Krutmann, 1998). Wie in Vorarbeiten (Majora *et al.*, 2009) gezeigt, verfügen KSS-Fibroblasten in Monolayer-Zellkultur über einen konstitutiv höheren Anteil an der Common Deletion im Vergleich zu normalen humanen Fibroblasten (NHF). Mit höherer Passage verringert sich jedoch der Anteil der Common Deletion (Maresch, 2007). Es sollte daher mittels quantitativer Realtime-PCR überprüft werden, ob der Gehalt an Common Deletion im dermalen Äquivalent über einen längeren Inkubationszeitraum konstant bleibt. Abb. 3.1 zeigt, dass KSS dermale Äquivalente (KSS DE) in einem Zeitraum bis zu sechs Wochen durchgehend bis zu 10.000-mal mehr Common Deletion besitzen als in vergleichbaren NHF DE. Tag 0 bezeichnet den Zeitpunkt nach abgeschlossener Kontraktionsphase des DE. Dieses Ergebnis diente als Basis für weiterführende Experimente mit dem DE als Modell für Langzeiteffekte von mtDNA-Deletionen in der Hautalterung.



**Abb. 3.1:** Gehalt an Common Deletion in DE in einem Zeitraum von sechs Wochen. KSS DE (graue Balken) haben konstant einen wesentlich höheren Anteil an mtDNA mit Common Deletion im Vergleich zu NHF DE (weiße Balken).

### 3.1.2 Erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in KSS DE

In der Literatur finden sich Belege, dass mtDNA-Deletionen mit gesteigertem oxidativen Stress einhergehen (Jou *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2001). Dies ließ sich in KSS-Fibroblasten bestätigen, bei denen ein erhöhter Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sowohl im Zytosol, als auch im Mitochondrium vorliegt (Majora *et al.*, 2009). In KSS DE konnte ebenfalls ein erhöhter ROS-Level nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Dazu wurde jeweils ein schmales Stück aus einem DE herausgeschnitten, mit Dihydrorhodamin 123 inkubiert und für die histologische Analyse in Kryomedium eingebettet. Bei Anwesenheit von ROS wird der Farbstoff zu Rhodamin 123 umgesetzt. Je mehr orange-rote Fluoreszenz, desto mehr ROS sind im Gewebe vorhanden. KSS DE wiesen hier eindeutig mehr ROS auf als NHF DE.

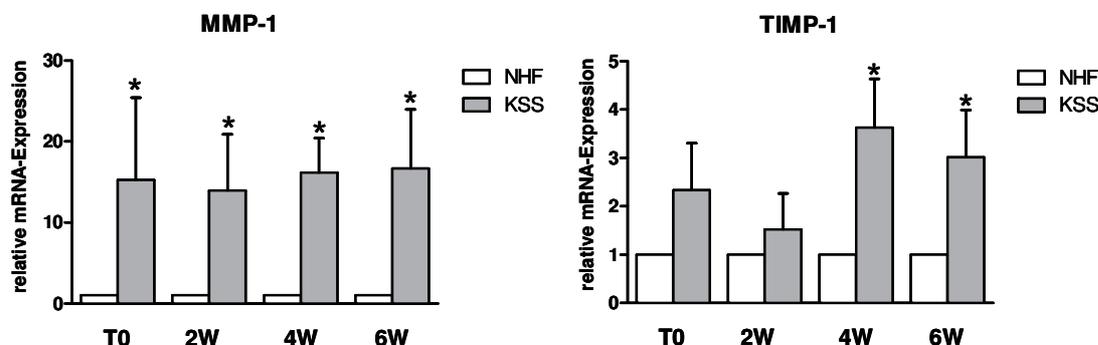


**Abb. 3.2: ROS in dermalen Äquivalenten.** Eine Woche alte DE wurden mit 123 Dihydrorhodamin inkubiert und Kryoschnitte angefertigt. Bei Anwesenheit von ROS entstand fluoreszierendes Rhodamin. In KSS DE konnten mehr ROS nachgewiesen werden als in NHF DE. Zur Kontrolle wurden die Zellkerne parallel mit DAPI angefärbt. Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3 KSS-Fibroblasten in DE exprimieren deutlich mehr Matrixmetalloproteinase-1 als NHF

Wie bereits erwähnt, sind Matrixmetalloproteinasen (MMP) maßgeblich am Kollagenabbau und damit am Hautalterungsprozess durch Faltenbildung beteiligt (Yaar und Gilchrist, 2003). MMP-1 ist einer der wichtigsten Vertreter der MMP. Bei KSS-Fibroblasten im Monolayer konnte kein signifikanter Unterschied in der MMP-1-Expression auf mRNA-Ebene mittels Realtime-PCR festgestellt werden (Maresch, 2007). Wie in Abb. 3.3 dargestellt, war die MMP-1-Expression in KSS DE jedoch bis zu 15-fach höher als in NHF DE, und zwar über den gesamten Inkubationszeitraum vom Ende der Kontraktionsphase der DE (Tag 0) bis sechs Wochen in Kultur. Es scheint, dass erst die Stimulation durch die Einbettung in Kollagen zu einer vermehrten MMP-1-Expression führt.

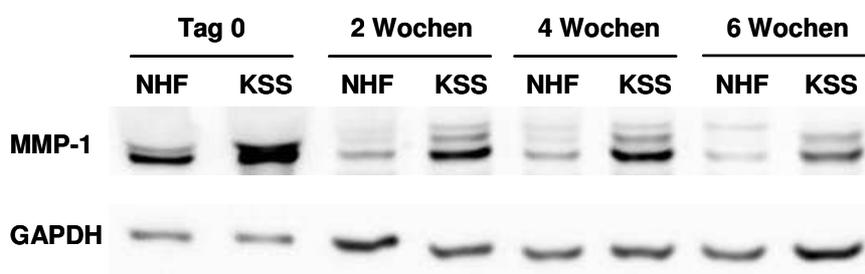
Auf Proteinebene konnte ebenfalls mehr MMP-1 in KSS DE nachgewiesen werden; zum einen durch immunhistologische Färbung mit einem MMP-1-spezifischen Antikörper und fluoreszierendem Zweitantikörper am Kryoschnitt (Abb. 3.5), zum anderen mittels Immunoblot nach SDS-PAGE aus direkten Lysaten von DE (Abb. 3.4).



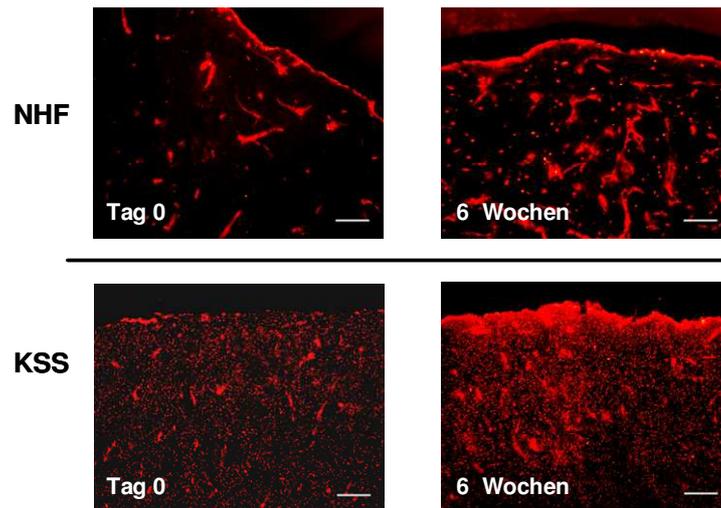
**Abb. 3.3: MMP-1 und TIMP-1 mRNA-Expression in DE.** Über einen Zeitraum von sechs Wochen exprimierten KSS in DE (graue Balken) bis zu 15-fach mehr MMP-1 als NHF (weiße Balken). TIMP-1 wies in KSS DE ebenfalls einen höheren Level auf, konnte aber die extrem starke MMP-1-Expression nicht kompensieren, da max. eine 3,5-fache Erhöhung vorlag. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM aus sechs unabhängigen Experimenten, normiert gegen 18S. KSS-Werte wurden auf die entsprechende NHF-Kontrolle normiert. T0: 0 Tage, 2/4/6W: 2/4/6 Wochen Inkubation der DE. \*: Statistisch signifikant für  $p < 0,05$  nach Student'scher T-Test.

### 3.1.4 KSS-Fibroblasten in DE exprimieren nicht genügend TIMP-1 zur Kompensation der erhöhten MMP-1-Expression

Gegenspieler der MMP sind die Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, kurz TIMP. Sie inhibieren die MMP stöchiometrisch, und zwar im Verhältnis eins zu eins (Brew *et al.*, 2000). Es zeigte sich in KSS DE, dass TIMP-1, der korrespondierende Inhibitor von MMP-1, über einen Zeitraum von sechs Wochen auf mRNA-Ebene stärker exprimiert wurde als in NHF DE (Abb. 3.3). Nach vier und sechs Wochen Inkubation war die Erhöhung sogar von statistischer Signifikanz im Vergleich zu NHF DE. Dennoch fiel die vermehrte Expression (bis zu vierfach höher) zu gering aus, um der bis zu 15-fachen Aufregulation von MMP-1 entgegenzuwirken. Dies spricht für das Vorhandensein von nicht an TIMP-1 gebundenem, aktiven MMP-1 im KSS DE.



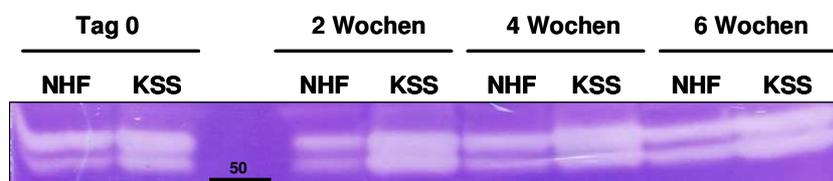
**Abb. 3.4: Western Blot-Analyse von MMP-1-Protein in DE.** Es wurden Direktlysate aus kompletten DE verwendet und MMP-1 mittels spezifischem Antikörper nachgewiesen. MMP-1 präsentiert sich dabei als Doppelbande bzw. Tripelbande (aktive Form 47 kDa, Proform 54 kDa, glykosylierte Form 57 kDa). Zu allen Zeitpunkten wurde mehr MMP-1-Protein in KSS DE als in NHF DE gefunden. Als Ladungskontrolle diente GAPDH.



**Abb. 3.5: Immunhistologischer Nachweis von MMP-1-Protein.** KSS und NHF DE wurden am Tag 0 nach Kontraktion und nach sechs Wochen Inkubation geerntet und Kryoschnitte angefertigt. An beiden Zeitpunkten konnte in KSS DE mehr MMP-1 nachgewiesen werden als in NHF DE. Außerdem war es in der Kollagenmatrix der KSS DE stärker verteilt als in der Matrix der NHF DE. Maßstab 50  $\mu$ m.

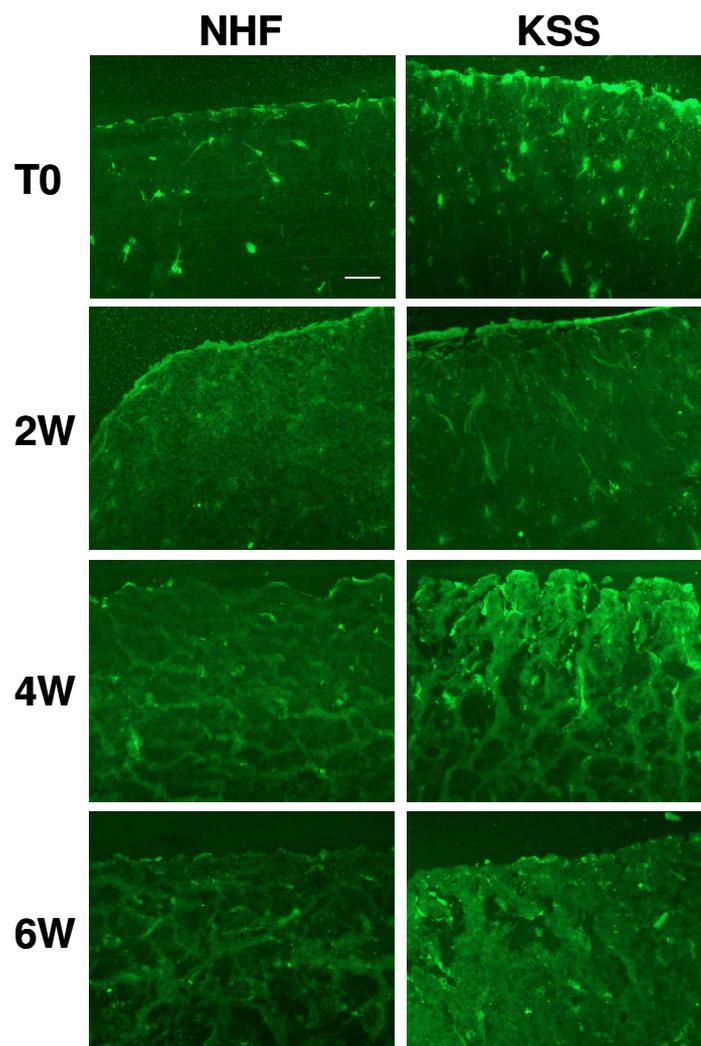
### 3.1.5 Verstärkte MMP-Aktivität in KSS DE

Um festzustellen, ob die vermehrte MMP-1-Expression auch mit einer verstärkten Kollagenaseaktivität einhergeht, wurden zymographische Analysen durchgeführt. Abb. 3.6 zeigt eine Gelzymographie von Lysaten aus Fibroblasten, welche zuvor aus DE isoliert wurden. Bei der Gelzymographie wurde eine SDS-PAGE mit Gelatine als Substrat im Gel verwendet. Untersucht wurden DE ab dem Ende der Kontraktionsphase (Tag 0) bis sechs Wochen danach. Weiße Banden auf dem Gel zeigten Aktivität von MMP. Erwartungsgemäß wiesen die KSS-Fibroblasten eine stärkere Aktivität auf als die normalen humanen Fibroblasten in diesem Assay. Die Identifizierung der MMP-1-Bande erfolgte aufgrund der Proteingröße (aktive Form 47 kDa, Proform 54 kDa). Varani *et al.* (2004) beschreiben eine Doppelbande von 52 und 57 kDa unter den gewählten Zymographiebedingungen, was dem dargestellten Befund in etwa entspricht.



**Abb. 3.6: Gelzymographie zum Nachweis proteolytischer Aktivität.** KSS- und normale Fibroblasten wurden aus DE isoliert und lysiert. Gleiche Mengen Protein wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und nach elektrophoretischer Trennung renaturiert. Helle Bereiche zeigen proteolytische Aktivität. KSS-Lysate weisen demnach mehr Aktivität über den ganzen Kultivierungszeitraum auf. Gezeigt ist hier der Bereich oberhalb von 50 kDa, also in der Größenordnung von MMP-1. Als Substrat wurde Gelatine verwendet.

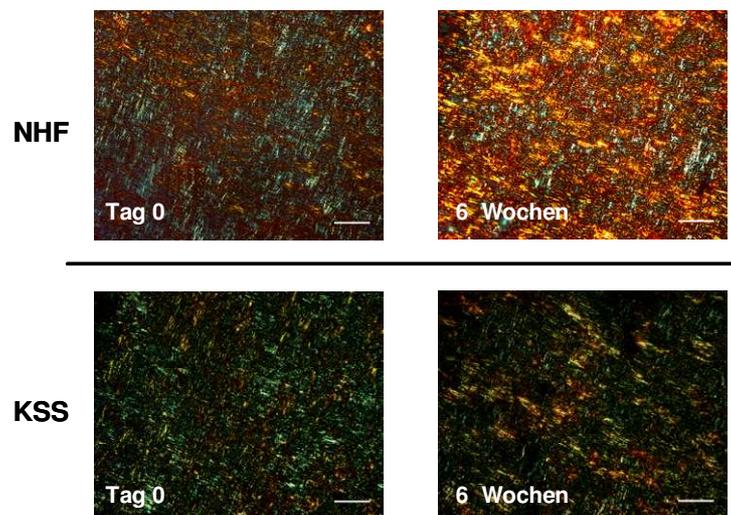
Ein weiterer Ansatz erfolgte mit Hilfe der *in situ*-Zymographie (Abb. 3.7). Dazu wurden Kryoschnitte von DE mit „gequenchem“ Fluorescein-gekoppeltem Kollagen I überschichtet. Die Kollagenaseaktivität zeigte sich durch die Intensität des resultierenden Fluoreszenzsignals. Die Aktivität in den KSS DE war während der sechswöchigen Kultivierungsphase deutlich höher als in den NHF DE und stieg stetig an. Bei den NHF DE ist insbesondere vom Tag 0 zu zwei Wochen Inkubation eine Steigerung der Aktivität erkennbar. Es konnte also mit zwei verschiedenen Methoden belegt werden, dass in KSS DE im Vergleich zu NHF DE eine höhere Kollagenaseaktivität vorliegt.



**Abb. 3.7: *In situ*-Zymographie von DE.** Kryoschnitte wurden mit „gequenchem“ Fluorescein-gekoppeltem Kollagen I überschichtet. Kollagenabbau resultierte in einem Fluoreszenzsignal. KSS DE (rechte Spalte) zeigten über den Kultivierungszeitraum von sechs Wochen mehr Kollagenase-Aktivität als NHF DE (linke Spalte). T0: Tag 0, 2W/4W/6W: 2/4/6 Wochen nach Kontraktion. Maßstab 50  $\mu$ m.

### 3.1.6 Schädigung der Kollagenmatrix in KSS DE

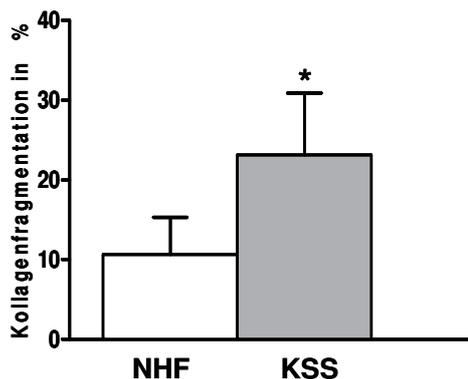
Die erhöhte MMP-1-Expression und Kollagenaseaktivität legte nahe, dass eine Schädigung der Kollagenmatrix in KSS DE auftreten sollte. Zum Beweis wurden Kryoschnitte von KSS und NHF DE mit Picosirius Red angefärbt, welches in Kollagenfasern interkalieren kann. Im polarisierten Licht erscheinen dicke Fasern orange-rot, dünne Fasern grün. Wie Abb. 3.8 zeigt, war die Kollagenmatrix in NHF DE weitaus robuster und dichter als in den KSS DE, sowohl zum Zeitpunkt Tag 0 nach Kontraktion, als auch nach sechswöchiger Kultivierung. Es kam sogar zu einer Stabilisierung des Kollagenfasergeflechts in NHF DE, wobei bei den KSS DE nur partiell eine geringfügige Verbesserung detektierbar war. Bei genauer Betrachtung konnten hier Löcher in der Matrix festgestellt werden.



**Abb. 3.8: Visualisierung von Kollagenfasern mittels Picosirius Red-Färbung unter polarisiertem Licht.** Orange-rote Färbung kennzeichnet eine intakte Matrix mit robusten Kollagenfasern. NHF DE haben also eine deutlich robustere Kollagenmatrix als KSS DE. Maßstab 20  $\mu\text{m}$ .

Um die Kollagenfragmentation durch MMP zu quantifizieren, wurden DE schrittweise hydrolysiert und der Hydroxyprolinegehalt per GC-MS/MS analysiert. Fragmentiertes Kollagen wurde dazu durch Hydrolyse mit  $\alpha$ -Chymotrypsin selektiv weiter aufgespalten, während intaktes Kollagen erhalten blieb. Nach Trennung der löslichen von der unlöslichen Fraktion, wurden beide einer Totalhydrolyse mit HCl zu einzelnen Aminosäuren zugeführt und der jeweilige Hydroxyprolinegehalt nach Derivatisierung zu Trifluoracetylmethylestern mittels GC-MS/MS bestimmt. Hydroxyprolin ist eine kollagenspezifische Aminosäure und kommt in kaum einem anderen Protein vor.

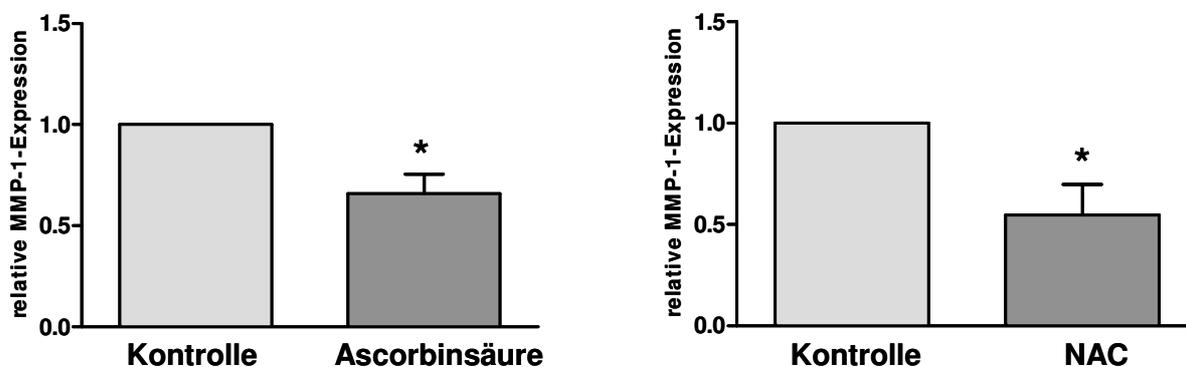
Es zeigte sich, dass nach sechs Wochen der Anteil an fragmentiertem Kollagen in KSS DE mehr als doppelt so hoch war wie in den NHF DE (Abb. 3.9), was die histologische Beweisführung (Abb. 3.8) bestätigte.



**Abb. 3.9: GC-MS-Analyse der Kollagenfragmentation in sechs Wochen alten DE.** Nach selektiver Hydrolyse von fragmentiertem Kollagen in DE mit  $\alpha$ -Chymotrypsin wurde die Menge an Hydroxyprolin (HYP) in löslicher und unlöslicher Fraktion bestimmt. Gezeigt ist der prozentuale Anteil von fragmentiertem im Vgl. zu intaktem Kollagen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$ SEM aus vier unabhängigen Experimenten. \*: Statistisch signifikant für  $p < 0,05$  nach Student'scher T-Test.

### 3.1.7 Erniedrigung der hohen MMP-1-Expression in KSS DE durch den Einsatz von Antioxidantien

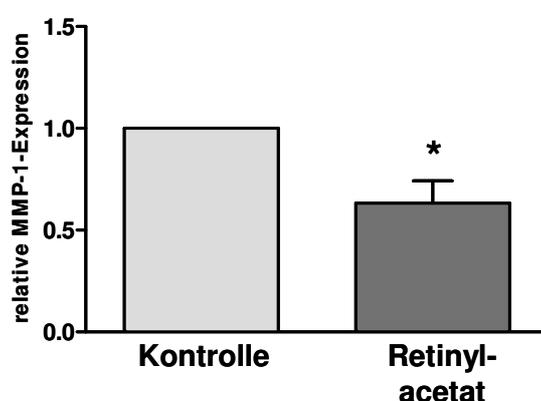
Es ist bekannt, dass ROS die Expression von MMP-1 in humanen Fibroblasten induzieren können (Brenneisen *et al.*, 1997; Schroeder *et al.*, 2007). Wie im Kapitel 3.1.2 erläutert, findet man in KSS-Monolayerkulturen wie auch in dermalen Äquivalenten einen erhöhten Gehalt an ROS im Vergleich zu NHF. Daher wurde versucht, durch Behandlung mit Antioxidantien eine Verringerung der MMP-1-Expression zu erreichen, was einer Revertierung des Phänotyps der KSS DE entspräche. Eine einwöchige Inkubation mit entweder Ascorbinsäure (1 mM) oder *N*-Acetylcystein (NAC, 2 mM) reduzierte die MMP-1-Expression in KSS DE im Vergleich zu unbehandelten Äquivalenten auf 66% bzw. 55% (Abb. 3.10). Der Einsatz von Antioxidantien kann also einer durch mtDNA-Deletionen bedingten ROS-vermittelten MMP-1-Expression entgegenwirken.



**Abb. 3.10: MMP-1-mRNA-Expression in KSS DE nach Behandlung mit Antioxidantien.** KSS DE wurden eine Woche lang entweder mit Ascorbinsäure oder *N*-Acetylcystein (NAC) behandelt. Die MMP-1-Expression wurde gegen 18S normiert und in Relation zur unbehandelten Kontrolle aufgetragen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus fünf (Ascorbinsäure) bzw. aus sechs (NAC) unabhängigen Experimenten. \*: Statistisch signifikant für  $p < 0,05$  nach Student'scher T-Test.

### 3.1.8 Erniedrigung der hohen MMP-1-Expression in KSS DE durch den Einsatz von Retinylacetat

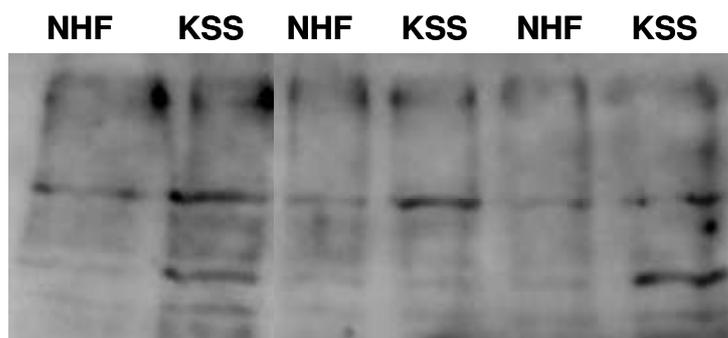
Retinoide können eine Abregulation von erhöhten MMP-Leveln in natürlich gealterter Haut bewirken (Varani *et al.*, 2000). Es lag daher nahe, diesen Ansatz auch am KSS DE zu verfolgen. KSS DE wurden eine Woche mit Retinylacetat inkubiert, welches sich aufgrund seiner Wasserlöslichkeit besonders für die Zellkultur eignet. Dieses wird in der Zelle zu *trans*-Retinolsäure umgesetzt, welche den eigentlichen Effektor darstellt (Fisher *et al.*, 1999; Varani *et al.*, 2000). Denkbar wäre eine Aktivierung über den Retinol-Rezeptor, aber auch eine Funktion als reines Antioxidans. Abb. 3.11 zeigt, dass die MMP-1-Expression nach einwöchiger Inkubation mit Retinylacetat (Konz. 10  $\mu$ M) auf 63% sinkt. Neben den bereits beschriebenen Effekten von Ascorbinsäure und NAC (Abb. 3.10), kann also auch ein Retinoid die MMP-1-Expression reduzieren.



**Abb. 3.11: MMP-1-mRNA-expression in KSS DE nach Behandlung mit Retinylacetat.** KSS DE wurden eine Woche lang mit Retinylacetat behandelt. Die MMP-1-Expression wurde gegen 18S normiert und in Relation zur unbehandelten Kontrolle aufgetragen. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus sechs unabhängigen Experimenten. \*: Statistisch signifikant für  $p < 0,05$  nach Student'scher T-Test.

### 3.1.9 Vermehrte Proteinoxidation in KSS-Fibroblasten

*In vivo* konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Proteinoxidation in lichtgealterter Haut vorliegt (Sander *et al.*, 2002). Eine Verknüpfung zwischen mtDNA-Deletionen und oxidativen Schäden wird ebenfalls in der Literatur beschrieben (Lu *et al.*, 1999). Oxydierte (und aggregierte) Proteine sind außerdem in der Lage, das Proteasom zu inhibieren, was wiederum zu einer Erhöhung der MMP-Expression führen kann (Catalgol *et al.*, 2009). In KSS-Fibroblasten konnten erhöhte Mengen an Proteincarbonylen nach Derivatisierung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) und nachfolgender Immunoblot-Detektion mit einem spezifischen DNPH-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Dieses Ergebnis fügt sich demnach nahtlos in die Erkenntnisse aus der Literatur ein.



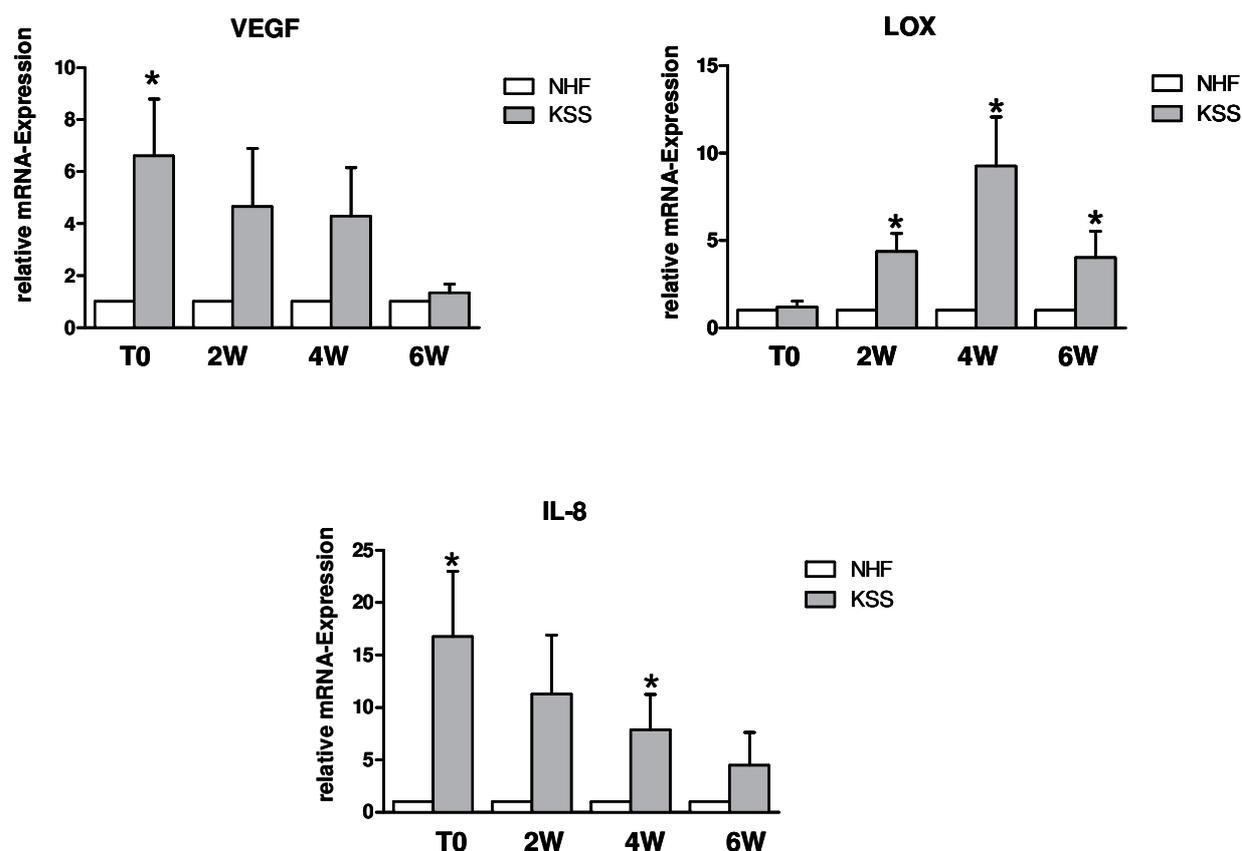
**Abb. 3.12: Oxyblot carbonylierter Proteine in NHF- und KSS-Fibroblasten.** Die Carbonylgruppen der Proteine im Lysat wurden mit Dinitrophenylhydrazin (DNPH) derivatisiert, per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot detektiert. Gezeigt werden drei unabhängige Proben. Durchschnittlich sind in KSS-Fibroblasten mehr oxidierte Proteine vorhanden.

### 3.1.10 Veränderte Expression weiterer hautalterungsrelevanter Gene in KSS DE

Nicht nur der Kollagenstoffwechsel ist von alterungsbedingten Veränderungen betroffen. Ein weiterer Aspekt ist, dass in gealterter Haut ein erhöhter Vernetzungsgrad von Kollagen- und Elastinfasern auftritt (Gerstein *et al.*, 1993; Sell *et al.*, 1996). Das für die Verknüpfung erforderliche Enzym ist die sogenannte Lysyloxidase (LOX). Wie Abb. 3.13 zeigt, konnte per Realtime-PCR nachgewiesen werden, dass zwischen zwei- und sechswöchiger Inkubationsphase bis zu achtmal mehr LOX-mRNA in KSS DE exprimiert wurde als in NHF DE. Im Vergleich dazu findet man im KSS-Fibroblasten-Monolayer nur eine relative LOX-mRNA-Expression mit dem Faktor 3,5 (Majora *et al.*, 2009).

Ein weiteres Kennzeichen der Hautalterung ist eine vermehrte Gefäßbildung (Braverman and Fonferko, 1982), welche mit einer erhöhten Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor VEGF einhergeht. Besonders interessant ist, dass eine durch MMP degradierte Kollagenmatrix Endothelzellen zur Gefäßbildung anregen kann (Varani *et al.*, 2008). So scheint es nicht verwunderlich, dass KSS-Fibroblasten in DE bis zu sechsfach mehr VEGF mRNA exprimieren als normale humane Fibroblasten. Erst nach sechs Wochen Inkubation gleichen sich hier KSS-Fibroblasten und NHF an (Abb. 3.13).

Altern kann auch als eine chronische Entzündung betrachtet werden, bei der eine Reihe von Zytokinen in die Matrix sezerniert werden. Man spricht vom sogenannten Inflamm-Aging (Franceschi *et al.*, 2007). Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) spielt dabei eine besondere Rolle, da u. a. an humanen Keratinozyten gezeigt werden konnte, dass dieses Zytokin vermittelt durch oxidativen Stress nach UV-Bestrahlung ausgeschüttet wird, was außerdem zu einer Transaktivierung von AP-1 führt (Wu *et al.*, 2008). IL-8 besitzt auch pro-angiogenetische Eigenschaften, da es die Migration von Endothelzellen beeinflussen kann (Li *et al.*, 2003). Im Realtime-PCR-Experiment (Abb. 3.13) zeigten KSS DE eine relative Expression von anfangs (Tag 0) 16-fach mehr IL-8-mRNA bis hin zu fünffacher Expression nach sechs Wochen, was dem Faktor in Monolayer-KSS-Fibroblasten im Vergleich zu NHF entspricht (Marc Majora, persönliche Kommunikation). Daraus ließe sich folgern, dass der initiale Kontraktionsprozess zusätzlich einen Stimulus für die IL-8-Expression darstellt.



**Abb. 3.13: Expression von hautalterungsrelevanten Genen.** mRNA-Expression von VEGF, LOX und IL-8 in KSS (graue Balken) und NHF DE (weiße Balken). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM aus sechs unabhängigen Experimenten, normiert gegen 18S. KSS-Werte wurden auf die entsprechende NHF-Kontrolle normiert. T0: 0 Tage, 2/4/6W: 2/4/6 Wochen Inkubation der DE. \*: Statistisch signifikant für  $p < 0,05$  nach Student'scher T-Test.

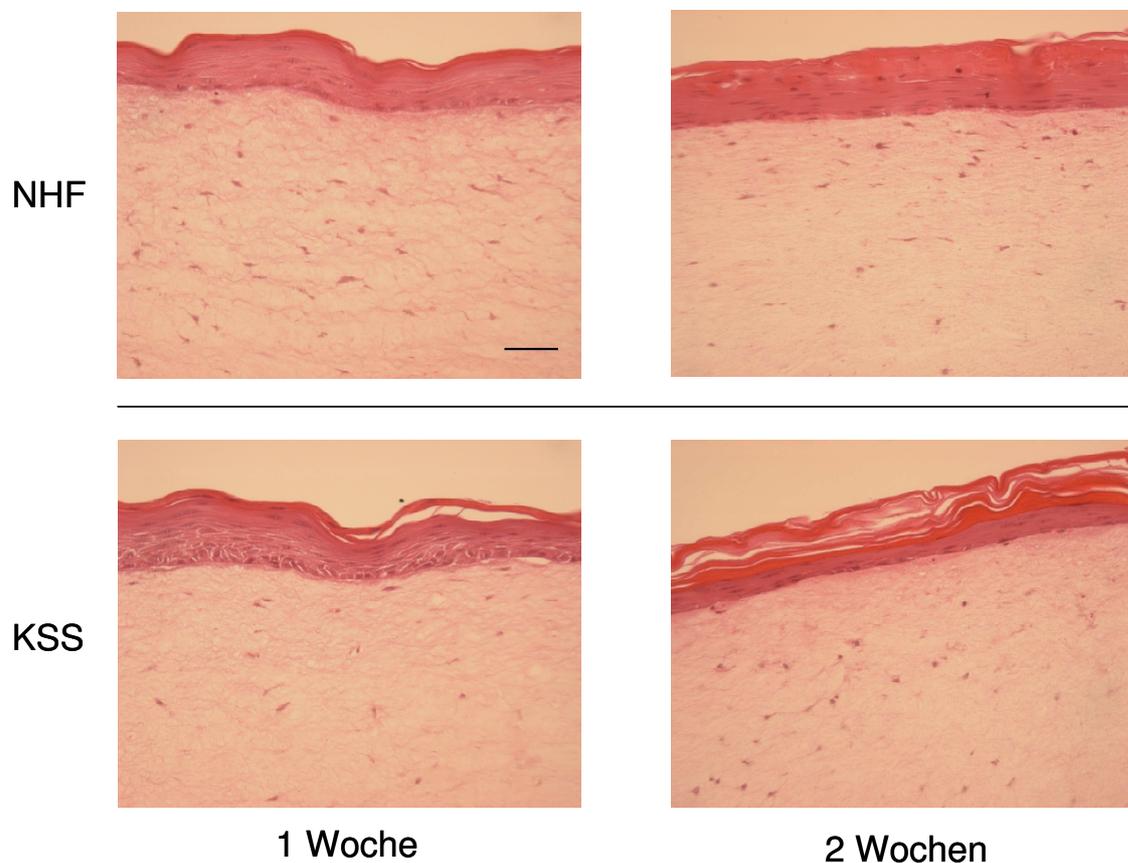
## 3.2 Auswirkungen von mtDNA-Deletionen in Fibroblasten auf die Epidermis

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, wie sich mtDNA-Deletionen in Fibroblasten im Vollhautmodell auf die Generierung einer funktionellen Epidermis auswirken. Dazu wurden auf dermale Äquivalente, entweder bevölkert von NHF oder KSS-Fibroblasten, humane primäre Keratinozyten von gesunden Spendern aufgebracht.

### 3.2.1 Generierung eines Vollhautmodells auf Basis des KSS dermalen Äquivalents

Zunächst wurde ein geeignetes System zur Erstellung von Vollhautäquivalenten mit KSS-Fibroblasten im dermalen Teil etabliert, wobei das Grundprinzip des kontrahierenden Äquivalents beibehalten werden sollte. Auf das dermale Äquivalent wurden zur Bildung einer funktionierenden Epidermis proliferierende Keratinozyten aufgebracht. Es gibt grundsätzlich zwei Methoden Keratinozyten zu kultivieren: (1) Im serumhaltigen Medium auf sogenannten Feederlayern aus nicht mehr

teilungsfähigen Fibroblasten und (2) in serumfreiem Spezialmedium. Ersteres wurde von Rheinwald und Green 1975 entwickelt und später durch Zusätze wie EGF, Insulin und Choleratoxin optimiert (Rheinwald und Green 1977). Beide Kultivierungsmöglichkeiten weisen Vor- und Nachteile auf. Bei der Anzucht auf Feederlayern hat man einige Vorteile. Zum einen können die Fibroblasten den zur Proliferation der Keratinozyten benötigten Mix an Wachstumsfaktoren direkt produzieren, zum anderen ist bei der Aussaat kein Wechsel von serumfreien auf ein serumhaltiges Medium notwendig. Ein Nachteil ist aber der höhere Arbeitsaufwand im Vergleich zur serumfreien Anzucht, die keine Vorkultivierung von Feederlayern erfordert und keine gestaffelte Trypsinierung, um dann schließlich Keratinozyten und Feederzellen wieder von einander zu trennen. Dazu kommt, dass serumfreie Medien durch ihre spezifischen Zusätze für eine starke Proliferation der Keratinozyten sorgen. Bei beiden Methoden benötigen die Keratinozyten zur Anhaftung auf dem Kunststoffboden einer Zellkulturflasche jedoch einige Tage Zeit.



**Abb. 3.14: NHF- und KSS-Vollhautäquivalente.** Nach einer Woche hat sich bei beiden eine mehrschichtige Epidermis ausgebildet. Die dermalen Bereiche sind von Fibroblasten bevölkert. Während beim NHF-Äquivalent nach zwei Wochen kaum eine Abnahme zu sehen ist, reduzierte sich die Epidermis in KSS-Äquivalenten merklich. Hämatoxylin/Eosin-Färbung von histologischen Schnitten. Maßstab 50  $\mu$ m.

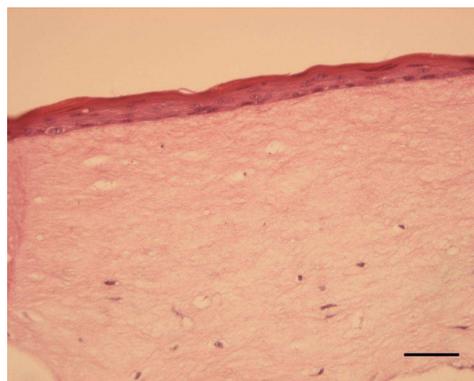
Bei dem kontrahierenden Äquivalentmodell stellte sich außerdem die Frage, wann die Aussaat erfolgen sollte (bereits nach einem Tag auf das „frische“ DE oder nach abgeschlossener Kontraktion) und wann der „Air-Lift“, also die Luftexposition erfolgen sollte. Wie sich zeigte, eigneten sich beide Anzuchtverfahren, also der Gebrauch von

Feederlayern oder die Verwendung von serumfreiem Medium, für die Generierung von Vollhautmodellen mit KSS-Fibroblasten. Bei Anwesenheit von KSS-Fibroblasten ist ein serumhaltiges Medium essentiell, so dass das Medium entsprechend geändert werden musste. Dazu wurde ein serumhaltiges Medium auf DMEM/Ham's F12-Basis verwendet. Aufgrund der simpleren Kultivierung wurde letztendlich der serumfreien Anzucht der Vorzug gewährt. Zu welchem Zeitpunkt die Keratinozyten auf die DE aufgebracht wurden, spielte ebenfalls eine untergeordnete Rolle. Die komplett kontrahierten Äquivalente erwiesen sich jedoch deutlich leichter in der Handhabung, da sie bereits kompakter und stabiler waren als DE, die nur einen Tag alt waren. Die Luftexposition wurde bereits 24 h nach Aussaat durchgeführt, da auch nach solch kurzer Zeit bereits ein zufriedenstellendes Ergebnis erzielt werden konnte (Abb. 3.14). Zum Vergleich: Bei anderen Protokollen beträgt diese Phase eine Woche (Bernerd, 2005).

Die Gesamtlebensdauer eines Vollhautäquivalents betrug unter den genannten Bedingungen etwa 2-3 Wochen, wobei sich bei den KSS Vollhautäquivalenten bereits nach 2 Wochen ein deutlicher Rückgang der epidermalen Schicht zeigte (Abb. 3.14, siehe auch Abschnitt 3.2.3).

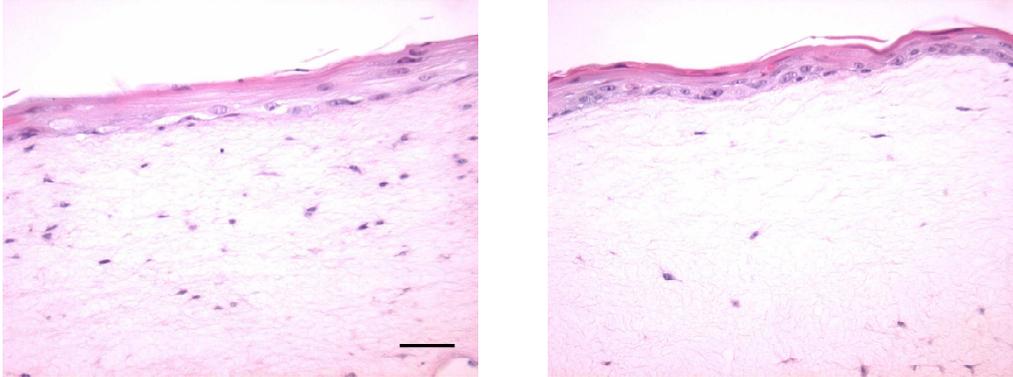
### 3.2.2 Probleme bei der Kultivierung von Vollhautäquivalenten

Von besondere Bedeutung für den Aufbau der epidermalen Schicht eines Vollhautäquivalents sind natürlich die verwendeten primären Keratinozyten. Anders als Fibroblasten konnten diese in der Zellkultur nur ca. fünfmal passagiert werden. Da sich die Zellen eines Spenders relativ schnell verbrauchen, mussten für die Generierung der Vollhautäquivalente Keratinozyten von vielen verschiedenen Spendern herangezogen werden. Jedoch waren nicht alle Keratinozyten kompatibel mit den im DE lebendene Fibroblasten. Zum Teil wurde daher ein Verschwinden der Fibroblasten zur Epidermisseite hin beobachtet (Abb. 3.15), insbesondere bei KSS-Fibroblasten, und sogar regelrechte Auflösungserscheinungen der DE, bei denen von der Mitte des DE ausgehend ein immer weiter ausdehnendes Loch entstand.



**Abb. 3.15: KSS-Vollhautäquivalent mit partiell Fibroblasten-freier Dermis.** Zur Epidermisseite hin wurde das Fehlen von Fibroblasten im dermalen Bereich beobachtet. Es sind Löcher zu sehen, wo vermutlich vorher noch Fibroblasten waren. Die Ausbildung der Epidermis ist ebenfalls beeinträchtigt. HE-Färbung, Maßstab 50 µm.

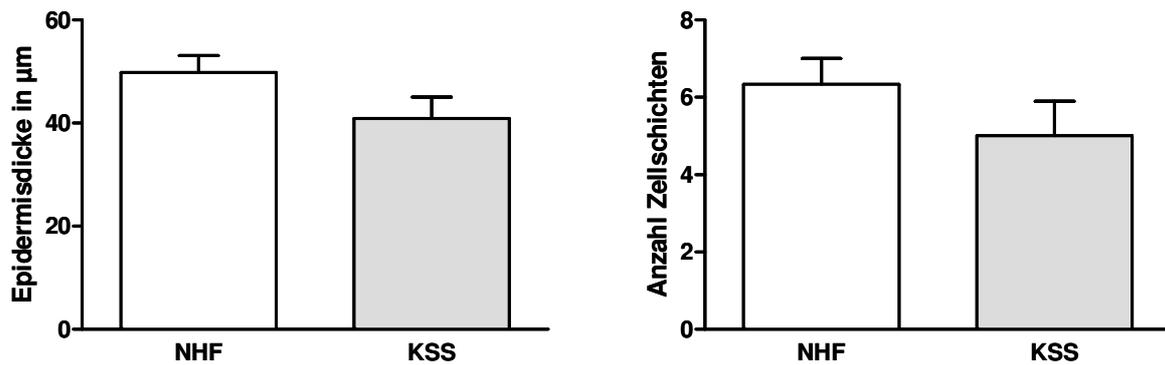
Das Alter der Keratinozyten war ebenfalls entscheidend für die Ausbildung einer epidermalen Schicht. So zeigte ein Versuch mit Keratinozyten in Passage 3, dass diese kein ausreichendes Teilungspotential mehr besaßen, um einen epidermalen Verbund zu bilden (Abb. 3.16).



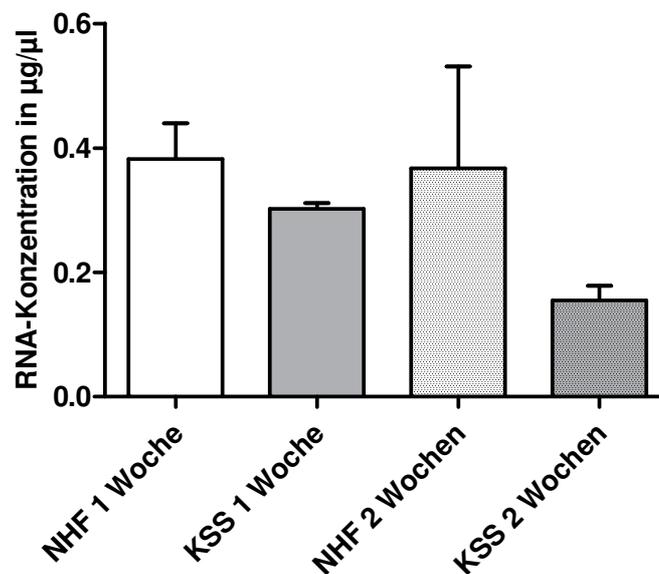
**Abb. 3.16: Vollhautäquivalente unter Verwendung von Keratinozyten nach der dritten Passage.** Weder bei NHF-Äquivalenten (links), noch bei KSS-Äquivalenten (rechts) konnte eine intakte Epidermis gebildet werden. HE-Färbung, Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3 Atrophie der epidermalen Schicht im KSS-Vollhautmodell

Chronologische Hautalterung ist gekennzeichnet durch eine Verdünnung der Haut, sowohl der Dermis (Kollagenabbau), als auch der Epidermis (Farage *et al.*, 2010; Yaar und Gilcrest, 2003). Um den Effekt von KSS-Fibroblasten in der Dermis auf die Generierung der Epidermis festzustellen, wurden deshalb KSS- und normale Fibroblasten in dermale Äquivalente eingebracht, eine dreitägige Kontraktionsphase abgewartet und anschließend humane primäre Keratinozyten auf das DE ausgesät. 24 Stunden später wurde das Vollhautäquivalent luftexponiert und nach einer Woche Inkubation in  $\text{FAD}_{\text{red}}$ -Medium geerntet. Durch Hämotoxylin-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten konnte der Aufbau des Hautmodells visualisiert werden. Waren KSS-Fibroblasten im dermalen Teil des Vollhautmodells eingesät, war die resultierende epidermale Schicht von Keratinozyten im Durchschnitt dünner als bei Vollhautmodellen mit normalen humanen Fibroblasten und wies weniger Zellschichten auf (Abb. 3.17). Desweiteren konnte aus der epidermalen Schicht von KSS-Vollhautmodellen nach zwei Wochen Inkubation deutlich weniger RNA isoliert werden als von NHF-Vollhautmodellen (Abb. 3.18). Beide Beobachtungen belegten, dass ein Einfluss von KSS-Fibroblasten auf die epidermale Schicht im Hautmodell vorhanden sein musste und zwar in derart, dass es zu einer Störung der Ausbildung der epidermalen Schicht im Hautmodell kam.



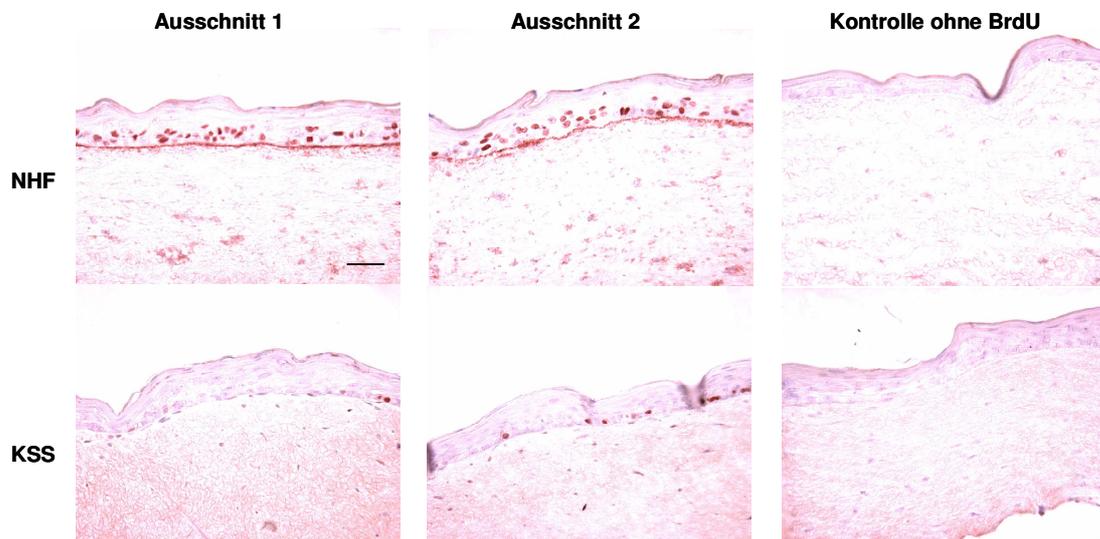
**Abb. 3.17: Epidermisdicke und Anzahl Zellschichten in NHF- und KSS-Vollhautäquivalenten.** KSS-Äquivalente besitzen im Schnitt eine geringere Dicke der Epidermis (links) und weniger Schichten von Keratinozyten (rechts). Zur Ermittlung der Werte wurden jeweils fünf Messpunkte pro histologischem Bild in 400-facher Vergrößerung herangezogen und gemittelt. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von sechs verschiedenen Vollhautäquivalenten, unabhängigen voneinander generiert. Für den Unterschied in der Epidermisdicke zwischen NHF- und KSS-Äquivalenten (links) ergibt sich eine statistische Wahrscheinlichkeit p von 0,05 nach Student'schem T-Test.



**Abb. 3.18: RNA-Konzentration in der epidermalen Schicht von Vollhautäquivalenten.** Nach Trennung von dermalen und epidermalen Schicht, wurde aus der Epidermis RNA isoliert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Nach zwei Wochen Inkubationszeit der Äquivalente konnte in KSS-Äquivalenten nur noch etwa ein Drittel der Konzentration an RNA im Vgl. zu NHF-Äquivalenten gemessen werden. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Ein statistisch signifikanter Unterschied war nicht vorhanden.

### 3.2.4 Verringerte Proliferation von Keratinozyten in KSS-Vollhautäquivalenten

Es sollte getestet werden, ob die im Abschnitt 3.2.3 beschriebene Atrophie der epidermalen Schicht in KSS-Vollhautäquivalenten mit einer verminderten Proliferationskapazität der Keratinozyten einherging. Dazu wurden eine Woche alte Vollhautäquivalente 24 h mit BrdU (20  $\mu$ M) inkubiert, geerntet und am Paraffinschnitt ein immunhistochemischer Nachweis auf BrdU durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.6). BrdU wird bei Zellteilung in die neu synthetisierte DNA eingebaut und kann dann mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden. Wie man deutlich in Abb. 3.19 erkennen kann, war die Anzahl an proliferierenden Keratinozyten in KSS-Vollhautäquivalenten stark reduziert, während in NHF-Vollhautäquivalenten eine große Population proliferierender Zellen zu finden war. Selbst wenn die Dicke an manchen Stellen der epidermalen Schicht gleich erschien, so war die Epidermis in KSS-Vollhautäquivalenten zu diesem Zeitpunkt schon im Niedergang begriffen.

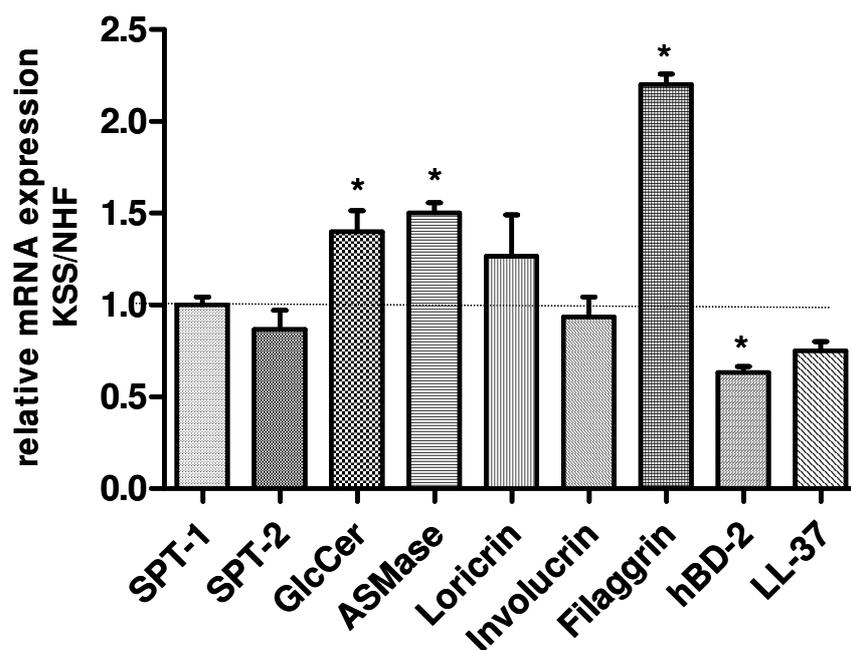


**Abb. 3.19: Keratinozytenproliferation in NHF- und KSS-Vollhautäquivalenten.** Nach einer Woche Kultivierungszeit wurden Vollhautäquivalente 24 h mit BrdU inkubiert, Kryoschnitte angefertigt und in die DNA eingebautes BrdU immunhistochemisch nachgewiesen. Bei NHF-Äquivalenten waren noch zahlreiche proliferierende Keratinozyten in der Epidermis vorhanden (rotbraune Färbung), bei KSS hingegen kaum noch. Gezeigt sind hier jeweils zwei Ausschnitte aus einem Vollhautäquivalent. Die Kontrollen ohne BrdU zeigten keine Färbung (außen rechts). Maßstab 50  $\mu$ m.

### 3.2.5 Genexpressionsprofil von Keratinozyten in Vollhautäquivalenten

Von einer Woche alten Vollhautäquivalenten wurde die epidermale Schicht mit einer Pinzette abgezogen, RNA isoliert und die relativen Expressionen ausgewählter Gene mittels Realtime-PCR analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.20 dargestellt. In diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse, die Expression von Genen zu analysieren, die bei der Differenzierung von Keratinozyten eine Rolle spielen, bzw. für die Ausbildung einer funktionalen epidermalen Barriere von Bedeutung sind. Kein Unterschied ergab sich bei den Serin-Palmitoyl-Transferasen 1 und 2 (SPT-1, SPT-2), welche eine limitierende Rolle bei der Sphingolipidsynthese spielen. (Holleran *et al.*, 1990). Bei zwei weiteren Enzymen, die in der Sphingolipidsynthese involviert sind, nämlich der  $\beta$ -Glucocerebrosidase ( $\beta$ -GlcCer, Glucosylceramidase) und der

sauren Sphingomyelinase (ASMase) ergab sich eine signifikant höhere relative mRNA-Expression (bis zu 1,5-fach) in der epidermalen Schicht von Vollhautäquivalenten mit KSS-Fibroblasten in der Dermis als bei NHF in der Dermis. Loricrin zeigte eine leicht höhere Expression (jedoch nicht signifikant), Involucrin keinen Unterschied. Beide können im Stratum Corneum durch Transglutaminasen an das Gerüst des Cornified Envelopes (CE) der Keratinozyten gekoppelt werden (Nemes und Steinert, 1999). Filaggrin (FLG) ist für die Bildung des Stratum Corneums von besonderer Bedeutung, da es die Formation von Keratin-Makrofibrillen im Zytosol von Corneocyten induziert und ist ebenso wie die Keratine Bestandteil des CE (Candi *et al.*, 2005). Außerdem wird es als „Natural Moisturizing Factor“ (NMF) benötigt (Proksch *et al.*, 2008). Hier zeigte sich eine mehr als doppelt so hohe mRNA-Expression in der Epidermis von KSS-Vollhautäquivalenten im Vergleich zu NHF-Vollhautäquivalenten, was für eine spätere Differenzierungsstufe der epidermalen Schicht spricht. Interessant war die geringere Expression der antimikrobiellen Proteine  $\beta$ -Defensin (BD) und Cathelicidin (LL-37) in KSS-Äquivalenten, was eine Schwächung der Barrierefunktion im Sinne der Infektionsabwehr bedeutete. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass in mehreren Bereichen der epidermalen Barrierefunktion Unterschiede zwischen KSS- und NHF-Vollhautäquivalenten zu verzeichnen waren.



**Abb. 3.20: Genexpression von epidermalen Barriermarkern.** Gezeigt ist die relative Expression in der epidermalen Schicht von KSS- im Vergleich zu NHF-Vollhautäquivalenten. Werte über 1 zeigen eine relativ höhere Expression in KSS-Äquivalenten an, Werte unter 1 eine niedrigere Expression als in NHF-Äquivalenten. Die Daten sind Mittelwerte  $\pm$ SEM aus sechs (ASMase, hBD-2, Filaggrin: drei, LL-37: zwei) unabhängigen Experimenten, normiert gegen 18S. \*: Statistisch signifikant für  $p < 0,05$  nach Student T-Test.

## 4 Diskussion

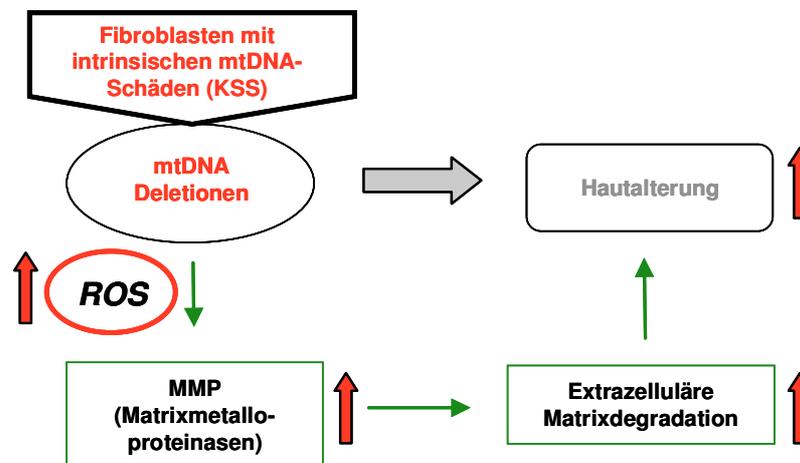
### 4.1 MMP-vermittelte Schädigung der Dermis durch Fibroblasten mit mtDNA-Deletionen: KSS DE als Modell für lichtgealterte Haut

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den funktionellen Auswirkungen von mtDNA-Deletionen auf die Hautalterung. Wie im Kapitel 1.2.1 erläutert, ist der Abbau von Kollagen ein Kennzeichen lichtgealterter Haut (Fisher *et al.*, 1996), ebenso wie das vermehrte Auftreten von mtDNA-Deletionen. KSS-Fibroblasten in Monolayer-Zellkultur verfügen über einen konstitutiv höheren Anteil an der Common Deletion im Vergleich zu normalen humanen Fibroblasten. Allerdings verringert sich mit höherer Passage der Anteil der Common Deletion (Maresch, 2007). Es scheint bei der Passagierung zu einer Selektion der weniger mtDNA-geschädigten KSS-Fibroblasten zu kommen, da diese wahrscheinlich bei der Proliferation einen Vorteil haben. Es war daher wichtig zu überprüfen, ob der Anteil an mtDNA-Deletionen in DE stabil blieb, denn die Langzeitkultur von KSS DE sollte als Modell für den chronischen Verlauf lichtinduzierter Hautalterung verwendet werden. Es zeigte sich, dass die KSS-Fibroblasten in DE über die ganze Kultivierungsdauer von sechs Wochen einen sehr viel höheren Anteil an mtDNA mit Common Deletion als normale Fibroblasten in DE besaßen (Abb. 3.1), was eine grundsätzliche Voraussetzung für die weiterführenden Studien war.

Es konnte gezeigt werden, dass KSS-Fibroblasten in Langzeitkultur einen Abbau der Kollagenmatrix in DE bewirkten. Matrixmetalloproteinasen (MMP) sind maßgeblich am Kollagenabbau und damit am Hautalterungsprozess durch Faltenbildung beteiligt (Yaar und Gilchrist, 2003). MMP-1 ist einer der wichtigsten Vertreter dieser Enzymklasse und damit von zentraler Bedeutung für die (lichtinduzierte) Hautalterung. Es lag daher nahe, zunächst die MMP-1-Expression in KSS-Langzeitäquivalenten zu untersuchen. Über die Kultivierungsdauer von sechs Wochen wiesen sie eine erhöhte MMP-1-Expression auf, und zwar ohne entsprechende Kompensation durch TIMP-1-Expression (Abb. 3.3). Dies war insofern ein überraschender Befund, da bei KSS-Fibroblasten im Monolayer *kein* signifikanter Unterschied in der MMP-1-Expression auf mRNA-Ebene festgestellt werden konnte (Maresch, 2007). Dies unterstreicht die Wichtigkeit, Fibroblasten in einem ihrer natürlichen Umgebung nachempfundenen Modell, in diesem Fall einer Kollagenmatrix, zu untersuchen, da der Kontakt zu Kollagen einen erheblichen Einfluss auf die Zellphysiologie und das Expressionsprofil zu haben scheint.

Die vermehrte MMP-1-Expression wurde nicht nur auf mRNA-Ebene festgestellt, sondern auch eine größere Menge MMP-1-Protein im KSS DE immunhistologisch und durch Westernblot-Analyse nachgewiesen (Abb. 3.5 und 3.4), was beweist, dass der hohe MMP-1-mRNA-Level auch translatorisch umgesetzt wurde. Aber die bloße Anwesenheit von MMP-1-Protein allein reicht nicht aus, um die Verringerung von intakten Kollagenfasern und den gleichzeitigen Anstieg von Kollagenfragmenten zu erklären (Abb. 3.8 und 3.9). Das MMP-1-Protein muss sich auch im aktiven Zustand befinden, d. h., weder an TIMP-1 gebunden und damit inaktiviert, noch in der Proform vorliegend. Vor diesem Hintergrund wurde die Kollagenaseaktivität mit zwei verschiedenen Ansätzen (Gel- und *in situ*-Zymographie) bestimmt und in KSS DE in der Tat eine stärkere Aktivität beobachtet (Abb. 3.6 und 3.7). Diese Befunde unterstützen die These, dass die Anwesenheit von UV-induzierbaren mtDNA-

Deletionen zur Alterung der Haut beitragen kann (Abb. 4.1) (Krutmann und Schroeder, 2009; Majora *et al.*, 2009).



**Abb. 4.1: Zusammenhang zwischen mtDNA-Deletionen und Hautalterung.** Fibroblasten mit mtDNA-Deletionen zeigten einen ROS-vermittelten Anstieg der MMP-Expression, was zur Degradierung der extrazellulären Matrix führte, einem pathologischen Merkmal der (licht-induzierten) Hautalterung (rote Pfeile symbolisieren eine Verstärkung). Als Beleg für die Rolle von ROS spricht die Tatsache, dass die MMP-Expression u. a. mit Antioxidantien reduziert werden konnte.

Die Analyse weiterer alterungsrelevanter Gene unterstützte diese Annahme ebenfalls. In gealterter Haut findet sich z. Bsp. ein erhöhter Vernetzungsgrad von Kollagen- und Elastinfasern (Gerstein *et al.*, 1993; Sell *et al.*, 1996). Das für die Quervernetzung verantwortliche Enzym LOX ist sowohl in der Monolayer-Zellkultur in KSS- im Vergleich zu normalen Fibroblasten, stärker exprimiert (Majora *et al.*, 2009), als auch, wie in dieser Arbeit belegt, in DE in Langzeitkultur. Probanden, die repetitiv mit UV-Licht bestrahlt wurden, wiesen ebenfalls mehr LOX in exponierter Haut auf als in nicht-exponierter (Majora *et al.*, 2009). Hairless-Mäuse, die das vornehmliche Tiermodell zur Untersuchung von UV-induzierten Hautveränderungen darstellen (Kligman, 1989; Kligman, 1996), exprimierten mehr LOX in der Haut als unbestrahlte Tiere (Majora *et al.*, 2009).

Ein weiteres Kennzeichen der Hautalterung ist eine vermehrte Gefäßbildung (Braverman und Fonferko, 1982). Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF spielt hierbei eine wichtige Rolle in der hautalterungsbedingten Neoangiogenese (Yano *et al.*, 2002). Vor diesem Hintergrund ist es interessant, dass KSS-Fibroblasten in DE mehr VEGF exprimieren als normale humane Fibroblasten. Bemerkenswert ist, dass eine durch MMP degradierte Kollagenmatrix Endothelzellen zur Gefäßbildung anregen kann, wobei jedoch VEGF als Komponente nicht berücksichtigt wurde (Varani *et al.*, 2008). Dies ist aber auch ein weiterer Beleg für den Einfluss der Kollagenmatrix und ihres Zustands auf das Verhalten der in sie eingebetten Zellen.

Altern kann auch als eine chronische Entzündung betrachtet werden, gekennzeichnet durch die Sezernierung einer Reihe von Zytokinen in die Matrix. Man spricht vom sogenannten Inflamm-Aging (Franceschi *et al.*, 2007). IL-8 spielt dabei eine besondere Rolle, da u.a. an humanen Keratinozyten gezeigt werden konnte, dass IL-8 vermittelt durch oxidativen Stress nach UV-Bestrahlung ausgeschüttet wird. Es konnte in diesem Zusammenhang auch eine Transaktivierung von AP-1

beobachtet werden (Wu *et al.*, 2008) und AP-1 kann bekanntermaßen die Expression von MMP-1 aktivieren. In einer anderen Veröffentlichung wird gezeigt, dass IL-8 die MMP-1-Produktion in Endothelzellen erhöht, ihre Migrationsfähigkeit befördert und somit auch pro-angiogenetische Eigenschaften hat (Li *et al.*, 2003).

So konnten in KSS DE erhöhte Level von VEGF (vermehrte Angiogenese in lichtgealterter Haut), LOX (mehr Vernetzung in gealterter Haut, höhere Expression in Haut nach UV-Bestrahlung) und IL-8 (Inflamm-Aging) (Abb. 3.13) nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass nicht nur der Kollagenstoffwechsel in KSS von alterungsassoziierten Veränderungen betroffen ist.

Der exakte Mechanismus, wie mtDNA-Deletionen die beschriebenen Veränderungen in DE auslösen, ist bislang nicht bekannt. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass mtDNA-Deletionen mit einem erhöhten ROS-Gehalt assoziiert sind, was über retrograde Signalwege zur Aktivierung alterungsrelevanter Gene wie z. Bsp. MMP-1 führen kann (Krutmann und Schroeder, 2009; Majora *et al.*, 2009; Schroeder *et al.*, 2008). Genau das konnte man an KSS-Fibroblasten in vorhergehenden Studien zeigen. Sie wiesen im Monolayer einen deutlich höheren ROS-Gehalt auf, was über die stärkere Expression von LOX zu einer schnelleren Kollagengelkontraktion in der initialen Phase der DE führte. Bei Durchführung der Kontraktion unter Ausschluss von Sauerstoff oder unter Einsatz des Antioxidans PBN (Phenyl- $\alpha$ -tert-butylnitron) konnte dieser Effekt deutlich verringert werden (Majora *et al.*, 2009). In dieser Arbeit war es gelungen, einen höheren ROS-Gehalt von KSS auch im DE zu visualisieren (Abb. 3.2) und die MMP-1-Expression in KSS DE mit den Antioxidantien NAC und Ascorbinsäure zu reduzieren, was ebenfalls für eine Beteiligung von ROS als Mittler der beschriebenen Lichtalterungssymptomatik spricht (Abb. 3.10). In der therapeutischen Praxis wird dies durch die erfolgreiche Anwendung von Antioxidantien gegen sichtbare Zeichen der Hautalterung wie die Bildung tiefer Falten untermauert (Farris, 2005; Kang *et al.*, 2003). Eine Reihe weiterer Studien weist auf den Zusammenhang zwischen mtDNA-Mutationen, oxidativem Stress und ROS-bedingten Schädigungen, auch im Bezug auf Alterungsphänomene, hin (Gonzalo *et al.*, 2005; Jou *et al.*, 2005; Kujoth *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2006; Trifunovic, 2006).

Es wird postuliert, dass ROS Schäden an Proteinen, Lipiden und auch an der mtDNA verursachen, was wiederum zu mehr ROS führt und in einem sich weiter verstärkenden Teufelskreis endet (Berneburg *et al.*, 1999). In lichtgealterter Haut ist in der Tat eine verstärkte Proteinoxidation nachgewiesen worden (Sander *et al.*, 2002). Oxydierte (und aggregierte) Proteine sind außerdem in der Lage, das Proteasom zu inhibieren, was wiederum zu einer Erhöhung der MMP-Expression führen kann (Catalgol *et al.*, 2009), so dass sich der Kreis wieder schließt. In KSS-Fibroblasten wurden übereinstimmend mit der Literatur mehr oxydierte Proteine gefunden (Abb. 3.12).

Man kann nicht ausschließen, dass die verwendeten KSS-Fibroblasten neben der Common Deletion noch andere mtDNA-Mutationen besitzen, welche ggf. auch zum Phänotyp lichtgealterter Haut beitragen. In der Literatur gibt es derzeit eine Diskussion darüber, ob nun mtDNA-Deletionen oder Punktmutationen den Ausschlag für den Alterungsphänotyp von Mausmodellen mit mutierter Polymerase  $\gamma$  geben (Kujoth *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004; Vermulst *et al.*, 2008). Ebenso wie die Frage, ob ROS am mitochondrial-assoziierten Alterungsprozess beteiligt sind oder nicht, bzw. ob mtDNA-Mutationen einfach eine größere Empfindlichkeit gegenüber Apoptose bedingen (Hiona und Leeuwenburgh, 2008; Trifunovic *et al.*, 2005). In

dieser Arbeit wurde die Common Deletion als Biomarker gewählt, da sie die am meisten verbreitete Deletion in humaner mtDNA ist (Schon *et al.*, 1989; Shoffner *et al.*, 1989) und eindeutig belegt wurde, dass sie mit Photoaging assoziiert ist (Berneburg *et al.*, 1997) und man sie durch UV-Bestrahlung induzieren kann (Berneburg *et al.*, 1999; Berneburg *et al.*, 2004). Dafür, dass die Common Deletion den Phänotyp der verwendeten KSS-Fibroblasten ausmacht, spricht, dass diese in höheren Passagen einen Teil der mtDNA-Deletionen verlieren (Maresch, 2007) und dann mitunter ein weniger ausgeprägtes Kontraktionsverhalten zeigen, sich von ihrer Morphologie der von normalen Fibroblasten annähern und weniger MMP-1 exprimieren. Dies wurde aber bisher nicht systematisch untersucht. Neben der Kontrolle des Gehalts an Common Deletion in den KSS-Fibroblasten wurde als direkte Kontrolle im Labor das Kontraktionsverhalten bei der Generierung der KSS DE verfolgt, welches im Fall der KSS DE deutlich schneller und stärker ist als bei NHF DE (Majora *et al.*, 2009).

Der Kollagenabbau in KSS DE konnte innerhalb von sechs Wochen beobachtet werden (Abb. 3.8 und 3.9), wohingegen die Lichtalterung der menschlichen Haut ein chronischer Prozess ist, der Jahrzehnte benötigt und der unter Laborbedingungen schwer nachzuahmen ist. Studien zur Sonnenbankbenutzung brachten zwar aufschlussreiche Ergebnisse, was den Zusammenhang zwischen Hautalterung, mtDNA-Deletionen und den involvierten Faktoren angeht (Reimann *et al.*, 2008), dennoch ist man aus ethischen und laborpraktischen Gründen stets limitiert. Mit dem Modell des KSS dermalen Äquivalents konnte daher eine gute Alternative eines humanen Systems zur Untersuchung der Lichtalterung der menschlichen Haut etabliert werden. Dieses Modell ist auch gut geeignet, um Substanzen zu testen, die den Alterungsprozess revertieren oder verzögern könnten. Dies wurde anhand klinisch erprobter Strategien wie dem Einsatz von Antioxidantien bzw. Retinol bereits gezeigt (Abb. 3.10 und 3.11). Beide waren in der Lage die extrem hohe MMP-1-Expression in KSS DE deutlich abzuschwächen und damit das Schlüsselenzym für die beobachtete Degradation der Kollagenmatrix zu reduzieren.

In zukünftigen Studien können am KSS-Modell weitere Aspekte der (lichtinduzierten) Hautalterung untersucht werden, einem komplexen Prozess, der von vielen Signalwegen gesteuert wird und sich in unterschiedlichen Ausprägungen darstellt. Dazu gehören die mtDNA-Mutagenese, die Auswirkung oxidativer Schäden, die Rolle des Proteasoms, der Einfluss von Autophagie, epigenetische Phänomene sowie die Beteiligung der Apoptose an der Hautalterung.

Nicht zuletzt ist es natürlich interessant, welche Auswirkungen mtDNA-geschädigte Fibroblasten in der Kollagenmatrix auf die Keratinozytenpopulation im epidermalen Teil eines Vollhautäquivalents haben, womit sich Abschnitt 4.2 befasst. Auch die Generierung eines Hautäquivalents mit eingebrachten Endothelzellen stellt ein faszinierendes Studienobjekt dar. Entweder als Zweikomponentensystem aus Fibroblasten und Endothelzellen in einer Matrix, oder aber auch als Dreikomponentensystem, zusätzlich mit epidermalen Keratinozyten, die die Matrix überschichten. Dies ermöglicht die Erforschung der vielfältigen Wechselwirkungen der drei Zelltypen untereinander. Als funktioneller Parameter für die Endothelzellen fungiert dabei die Gefäßformierung, gekennzeichnet durch eine Migrationsphase, Proliferation und schließlich die Anordnung zu Gefäßstrukturen. Umfangreiche Arbeiten zu diesem Thema, auch in Langzeitäquivalenten, wurden bereits durchgeführt (Boehnke *et al.*, 2007; Boehnke, 2009). Die zelluläre Antwort von Endothelzellen auf MMP-1-vorgeschädigte Kollagenmatrix wurde ebenfalls bereits

beleuchtet (Varani *et al.*, 2008). Die Frage wäre also: Wie würde sich das Einbringen von KSS-Fibroblasten in die beschriebenen Systeme äußern?

## 4.2 Gestörte epidermale Homöostase in Vollhautäquivalenten mit KSS-Fibroblasten

Um die Auswirkungen von mtDNA-Deletionen nicht nur auf die dermale, sondern auch auf die epidermale Funktion zu analysieren, wurden KSS-Fibroblasten in ein Vollhautmodell integriert. Als dermale Grundlage sollte das kontrahierende DE-Modell, welches auch für diese Arbeit verwendet wurde, dienen. Zum einen, weil KSS-Fibroblasten ein sehr viel höheres Kontraktionsvermögen haben als normale humane Fibroblasten (Majora *et al.*, 2009) und es deshalb schwer ist, die Kontraktion ganz zu vermeiden, auch wenn man Zelldichte und Kollagenkonzentration reduziert, zum Anderen zeigen nicht-kontrahierende DE ein anderes Expressionsprofil als kontrahierende (Grinnell, 2003). Die Vergleichbarkeit zu den bisherigen Versuchen wäre also nicht mehr gegeben. Es gibt eine Vielzahl unterschiedlicher Protokolle und Kulturmedien zur Anzucht von Keratinozyten und zur Kultivierung von Vollhautäquivalenten. Die Pioniere der Keratinozytenkultivierung waren Rheinwald und Green. Sie entwickelten 1975 eine Methode, um Keratinozyten auf nicht mehr teilungsfähigen 3T3-Mausfibroblasten zu kultivieren, wobei die Keratinozyten inselartige Kolonien umgeben von Fibroblasten bilden und die Feeder die nötigen Wachstumsfaktoren bereitstellen (Rheinwald und Green, 1975). Das von ihnen verwendete Medium enthielt 10% Kälberserum und Hydrocortison, um die Proliferation der Zellen zu stimulieren. Zwei Jahre später veröffentlichten sie eine optimierte Mediumvariante mit Zusatz von EGF, Insulin und Choleratoxin (Rheinwald und Green, 1977). Statt 3T3-Mausfibroblasten können auch humane Fibroblasten als Feederzellen verwendet werden (Boehnke, 2009). Bereits in den 80er Jahren wurden serumfreie Kulturmedien entwickelt. Bei der Kultivierung von Keratinozyten spielt dabei auch immer die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Medium eine Rolle. Niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen fördern eher die Proliferation, hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen führen zur Differenzierung der Keratinozyten (Boyce und Ham, 1983). Vorteil synthetischer Medien ohne Serumanteil ist natürlich die definierte Zusammensetzung der Mediumbestandteile und somit eine größere Kontrolle über die auf die Zellen einwirkenden Faktoren. In dieser Arbeit wurden beide Varianten, die Kultur auf (humanen) Feederlayern und die serumfreie Anzucht von Keratinozyten getestet. Beides führte zu einer erfolgreichen Kultivierung, so dass die Entscheidung für die serumfreie Kultivierung hauptsächlich aus praktischen Gründen erfolgte: Es ist keine Vorkultivierung von Feedern nötig und es treten keine Probleme durch Kontamination mit Feederzellen bei der Ablösung der Keratinozyten auf. Das Medium, in dem das Vollhautäquivalent inkubiert wurde, musste allerdings beiden Zelltypen, Fibroblasten und Keratinozyten, gerecht werden. Es musste für die Keratinozyten deshalb eine Umstellung von serumfreier zu serumhaltiger Kultivierung erfolgen, was aber gut funktionierte (Abb. 3.14) und so auch in der Literatur beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2003).

Die gewählte Methode wies insofern eine gewisse Robustheit auf, da es keine Rolle spielte, ob das verwendete DE nun einen oder vier Tage alt war, sprich die Kontraktion beendet war oder nicht, und sich auch für die Generierung von KSS-Vollhautäquivalente eignete. Außerdem konnte der Übergang von mediumbedeckter zu luftexponierter Kultivierung bereits nach einem Tag nach der Aussaat der Keratinozyten auf das DE durchgeführt werden und lieferte trotzdem die gewünschte

Ausbildung der epidermalen Schicht. In der Literatur werden auch längere Zeiten von bis zu einer Woche von Aussaat bis Luftexposition beschrieben (Bernerd, 2005; Lee *et al.*, 2003). Die Luftexposition ist nötig, um die Differenzierung der Keratinozyten einzuleiten (Asselineau *et al.*, 1985).

Maßgeblich für den Erfolg waren aber nicht zuletzt die verwendeten Keratinozyten. Wie schon Rheinwald und Green erkannten, teilen sich Keratinozyten lediglich über 20 bis 50 Zellgenerationen und stellen dann sehr abrupt die Proliferation ein (Rheinwald und Green, 1975). Am sinnvollsten war daher die Verwendung von Keratinozyten, die nicht mehr als zweimal passagiert wurden (Abb. 3.16). Es kam gelegentlich auch zu Inkompatibilitäten zwischen Fibroblasten (hauptsächlich KSS) und Keratinozyten, was sich in einem Verschwinden der Fibroblasten (wahrscheinlich durch Apoptose) in der Dermis zur Epidermisseite hin und sogar zur partiellen Auflösung der dermalen Komponente äußerte (Abb. 3.15). So konnte in einer Fibroblasten-Keratinozyten-Co-Kultur gezeigt werden, dass Keratinozyten in der Lage sind, u. a. MMP-1, MMP-3 und IL-8 in Fibroblasten zu induzieren (Li *et al.*, 2009; Nowinski *et al.*, 2004). Möglicherweise könnte dieser zusätzliche Impuls gerade bei den ohnehin schon sehr viel MMP-1 exprimierenden KSS-Fibroblasten zu den beschriebenen Phänomenen führen. Dass normale humane Keratinozyten gezielt Apoptose in Fibroblasten in Co-Kultur induzieren, scheint nicht beschrieben zu sein. Lediglich von Keratinozyten aus Keloiden wird berichtet, dass sie Apoptose von Fibroblasten in Co-Kultur verhindern und ihre Proliferation fördern (Funayama *et al.*, 2003).

Inwieweit eine Kontamination von Immunzellen in den isolierten Keratinozyten eine Rolle spielt, kann nicht gesagt werden. Allerdings sollte die Keratinozyten-Medienkomposition zur Eliminierung von Immunzellen führen.

Die Gesamtlebensdauer eines kollagenbasierten Vollhautäquivalent beträgt ca. zwei bis drei Wochen, wobei sich KSS-Fibroblasten in der dermalen Matrix insofern negativ auswirken, dass dort schon nach zwei Wochen ein deutlicher Rückgang der epidermalen Schicht zu verzeichnen war (Abb. 3.15). In diesem Zeitraum konnte insbesondere der initiale Aufbau einer epidermalen Struktur untersucht werden. Um chronische Effekte in Langzeitstudien zu verfolgen, können organotypische Kulturen auf Fibrinbasis und einem künstlichen Fasergeflecht als strukturgebendes Material verwendet werden. Diese weisen bis zu 15 Wochen lang eine intakte Homöostase auf (Boehnke *et al.*, 2007). Zukünftige Studien könnten mit KSS-Fibroblasten in diesem Modell durchgeführt werden, um den Effekt auf die Homöostase im zeitlichen Verlauf noch genauer analysieren zu können.

Erste Erkenntnisse wurden aber bereits am kollagenbasierten Vollhautmodell gewonnen. So ist die Dicke der epidermalen Schicht in KSS-Vollhautäquivalenten im Durchschnitt deutlich geringer als bei NHF (Abb. 3.17). Ein Phänotyp, der generell dem der gealterten Haut entspricht (Farage *et al.*, 2010; Yaar and Gilchrist, 2003). Im Abheilungsprozess eines akuten UV-Erythem kann es zwar zu einer Verdickung der Epidermis aufgrund einer Hyperplasie kommen, welche aber eher von kurzweiliger UVB- als von UVA-Strahlung ausgelöst wird. Chronische UV-Schäden zeigen sich dagegen in Atrophie der Epidermis wie der Dermis (Fritsch, 1998). Da die Common Deletion eine UVA-induzierbare Deletion der mtDNA ist, entspräche demnach eine Atrophie der epidermalen Schicht in KSS-Vollhautäquivalenten auch dem Phänotyp lichtgealterter Haut.

Es stellte sich daher zunächst die Frage, welche Unterschiede in Proliferation bzw. Differenzierung die Keratinozyten in den beiden Hautmodellen (KSS und NHF) aufweisen würden. Ein Proliferationsassay mit BrdU als Marker, der nur bei der Zellteilung und DNA-Neusynthese eingebaut werden kann, ergab ein deutliches Bild. Nur noch wenige Keratinozyten teilten sich in einwöchigen KSS-Hautmodellen, anders als bei NHF-Hautmodellen, die im Basalbereich noch in mehreren Zellschichten Teilungsaktivität zeigten (Abb. 3.19). Wäre von Beginn an gar keine Proliferation in den KSS-Hautmodellen aufgetreten, so hätte auch kein Aufbau einer epidermalen Schicht stattfinden können. Eine Hyperproliferation zu Beginn sollte in einer dickeren Epidermis resultieren, könnte aber erklären, warum die Zellen nach einer Woche nicht mehr proliferieren. Ihr Stammzellpotential wäre bereits ausgeschöpft. Es scheint jedoch so, dass es bei ihnen eine stärkere Verschiebung in Richtung Differenzierung gab. Ein anderes Szenario könnte davon ausgehen, dass zwar von Anfang an Proliferation stattfand, aber durchgehend in geringerem Maße als bei den NHF-Vollhautäquivalenten, sie sich aber im Grunde nicht in der Differenzierungsgeschwindigkeit unterscheiden. Letztendlich könnten aber auch beide Theorien in Kombination stimmen: weniger Proliferation und mehr Differenzierung, eine Kombination, die sehr schnell zur Epidermisatrophie führen würde.

Um genau diese Fragestellung zu beleuchten, wurde ein Expressionsprofil epidermaler Barrieremarker erstellt. Bei zwei von vier Enzymen, die in der Sphingolipidsynthese involviert sind, ergab sich eine signifikant höhere Expression in KSS- im Vergleich zu NHF-Hautäquivalenten, nämlich bei der  $\beta$ -Glucocerebrosidase sowie der sauren Sphingomyelinase (Abb. 3.20). Es könnte sich hierbei um eine Gegenregulation handeln, als Antwort auf eine unzureichende Barrierefunktion, aber auch um einen Übergang in Richtung stärkerer Differenzierung. Die Proteine, die in der Entstehung des Cornified Envelopes eher zu Anfang (beginnend bereits im Stratum granulosum) exprimiert werden wie Involucrin und Loricrin, scheinen hier weniger von einer Erhöhung betroffen (vgl. 1.1.6). Der größte Effekt ergab sich beim Filaggrin, welches ein charakteristischer Marker für fortgeschrittene Differenzierung ist und vornehmlich beim Übergang zum Stratum corneum gebildet wird (Dale *et al.*, 1997). Hier war die Expression in KSS-Äquivalenten sogar doppelt so hoch wie in NHF-Äquivalenten (Abb. 3.20). Diese Daten sprechen prinzipiell für eine Verschiebung des Gesamtepithels in Richtung Verhornung. Trotzdem ist die Gegenregulation nicht auszuschließen. Der Ablauf des Epithelaufbaus muss daher noch genauer in seiner zeitlichen Abfolge untersucht werden.

Weiterführende Tests müssen außerdem klären, ob die Barrierefunktion im Vollhautäquivalent *in situ* gestört ist. Möglich wäre hier zum Beispiel ein Penetrationstest mit dem Farbstoff Lucifer Yellow (Matsuki *et al.*, 1998). Bei einer funktionierenden Barriere sollte dieser nicht bis in den dermalen Teil eines Hautäquivalents vordringen. Ein anderer Ansatz wäre die Untersuchung der „tight junctions“, den Verbindungen zwischen den Zellen (Mitic *et al.*, 2000). Treten dort Störungen auf, kann die Epidermis keinen dicht geschlossenen Zellverband herstellen. Klassische Tests zur Barrierefunktion wie der transepidermale Wasserverlust (TEWL) können jedoch nicht eingesetzt werden, da die Hautmodelle zu filigran sind, als dass sie mit den herkömmlichen Geräten, die in der Regel für *in vivo*-Studien entworfen wurden, untersucht werden könnten.

Interessant ist auch der Befund, dass die beiden analysierten Defensine ( $\beta$ -Defensin und Cathelicidin) in KSS-Vollhautäquivalenten weniger stark exprimiert werden als in NHF-Vollhautäquivalenten (Abb. 3.20). Im Sinne des Infamm-Aging und der starken Expression von IL-8 in KSS DE (ohne Keratinozyten) hätte man hier auch einen

Anstieg erwarten können. Fakt ist jedoch, dass dies eine enorme Schwächung der Barriere bezugnehmend auf die Infektionsabwehr darstellt. Dazu passt, dass ältere Menschen anfälliger für Hautinfektionen und die Verläufe in der Regel langwieriger sind (Gavazzi und Krause, 2002).

Alles in allem läßt sich feststellen, dass Unterschiede in der Generierung bzw. Homöostase der epidermalen Schicht bestehen, wenn sich KSS- statt normale Fibroblasten in der Dermis eines Vollhautäquivalents befinden (bei identischen Keratinozyten in der epidermalen Schicht), und diese Unterschiede derart ausfallen, dass es zu einer Atrophie und zu einer eingeschränkten Barrierefunktion der Epidermis kommt, und dass diese Befunde auf den Einfluss von Fibroblasten mit einem hohen Gehalt an mtDNA-Deletionen zurückzuführen sind.

Aus den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten ergibt sich die Frage, über welche Signalwege oder Faktoren die Fibroblasten in der Dermis in der Lage sind, die Keratinozyten in der Epidermis zu beeinflussen.

Nachgewiesen wurde der Effekt, dass sich mit zunehmender Fibroblastenzelldichte eine Normalisierung der epithelialen Architektur vollzieht (Boehnke *et al.*, 2007; El-Ghalbzouri *et al.*, 2002), und dass Epithelien ohne Fibroblasteninteraktion sehr schnell atrophieren. Es scheint eindeutig, dass für die epidermale Geweberegeneration das Vorhandensein von Fibroblasten absolut erforderlich ist (Contard *et al.*, 1993; El-Ghalbzouri *et al.*, 2002; Szabowski *et al.*, 2000).

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Keratinozyten auf MMP-1-vorgeschädigter Kollagenmatrix bis zu 50% langsamer proliferieren und sich langsamer ausbreiten, um das Kollagen zu bedecken als Keratinozyten, die auf intaktes Kollagen aufgebracht wurden. Als Ursache wurde die nachlassende mechanische Stabilität des fragmentierten Kollagens ausgemacht, welche negative Auswirkungen auf die Keratinozyten haben sollen (Varani *et al.*, 2009).

In der Literatur werden in der Regel stimulierende Effekte durch lösliche Faktoren von Fibroblasten auf Keratinozyten in Co-Kultur bzw. organotypischen Kulturen beschrieben (El-Ghalbzouri *et al.*, 2002; El-Ghalbzouri *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). Ein Kandidat ist der KGF (Keratinocyte Growth Factor, FGF7), der Ende der 80er Jahre als spezifischer Wachstumsfaktor von Epithelzellen identifiziert wurde (Rubin *et al.*, 1989) und der von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und mikrovaskulären Endothelzellen produziert wird (Werner, 1998). Während manche Veröffentlichungen die Bedeutung des Faktors KGF in Bezug auf die epidermale Homöostase in organotypischen Kulturen als untergeordnet einstufen (El-Ghalbzouri *et al.*, 2004), betonen andere die besondere Rolle des KGF in Proliferationsstimulierung und verzögerter Differenzierung (Andreadis *et al.*, 2001). Ein erster Versuch zur Expression von KGF in KSS-Langzeitäquivalenten zeigte eine fünffach höhere Expression im Vergleich zu NHF DE, nach der initialen Kontraktionsphase am Tag 0 war sie sogar vierzigfach höher. Daher wäre eigentlich eine Hyperproliferation in KSS-Vollhautäquivalenten zu erwarten. Allerdings wurden diese Daten von rein dermalen Äquivalenten gewonnen. Inwieweit es eine Rückkopplung gibt, wenn auch wirklich Keratinozyten anwesend sind, kann erst bei Analyse der dermalen Bereiche von Vollhautäquivalenten ermittelt werden.

Es könnte auch eine Störung im Wnt-Signalweg vorliegen. Die Familie der Wnt-Gene ist hochkonserviert und spielt eine besondere Rolle in der Embryogenese und Gewebshomöostase. Außerdem sind sie Mediatoren bei Psoriasis (Schuppenflechte), in der es zu deutlichen Veränderungen in Keratinozytenwachstum und -differenzierung aktiviert durch inflammatorische Zytokine kommt (Gudjonsson *et al.*, 2010).

In der Aufklärung der beteiligten Faktoren und Signalwege vom mtDNA-geschädigten Fibroblasten zum Keratinozyten liegt noch eine große Herausforderung, ebenso wie in der Beantwortung der Frage, ob es sich dabei um einen ROS-vermittelten Prozess handelt. Wie diese Arbeit zeigte, sind die Untersuchungen zu diesem Thema noch am Anfang, aber eine interessante Basis, grundsätzliche Phänomene der (lichtinduzierten) Hautalterung zu beleuchten.

## 5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von UV-induzierbaren mtDNA-Deletionen in dermalen Fibroblasten auf die Hautalterung zu untersuchen. Es wurden sowohl Effekte auf die Integrität der Kollagenmatrix in dermalen Äquivalenten (DE) untersucht, aber auch die Einflüsse auf die Ausbildung und das Gleichgewicht der Epidermis im Vollhautmodell.

Dazu wurden Fibroblasten, entnommen von Kearns-Sayre-Syndrom-(KSS)-Patienten, die bereits intrinsisch einen hohen Gehalt an der UV-induzierbaren Common Deletion aufweisen, sowie normale humane Fibroblasten (NHF) in dermale Äquivalente eingebracht und bis zu sechs Wochen in Langzeitkultur gehalten. Der Gehalt an Common Deletion blieb in den KSS DE über den ganzen Inkubationszeitraum konstant. In KSS DE wurde außerdem ein höherer Level an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Vergleich zu NHF DE festgestellt. Während der sechswöchigen Inkubationszeit zeigten die KSS DE durchgehend eine erhöhte Matrixmetalloproteinase-1 (MMP-1) Expression, welche nicht durch die des entsprechenden Inhibitors TIMP-1 kompensiert wurde. Durch immunhistologische und Western Blot Analyse konnte auch auf Proteinebene mehr MMP-1 nachgewiesen werden, ebenso wie eine stärkere proteolytische Aktivität. Dies äußerte sich in einem vermehrten Abbau von Kollagen in der dermalen Matrix und einem gleichzeitigen Anstieg des prozentualen Anteils an Kollagenfragmenten in den KSS DE.

Die erhöhte MMP-1-Expression konnte durch Behandlung der DE mit den Antioxidantien *N*-Acetylcystein und Ascorbinsäure sowie durch Retinylacetat deutlich reduziert werden, Substanzen, die auch in der Therapie von Schäden durch (lichtinduzierte) Hautalterung eingesetzt werden.

Zusätzlich zu den Veränderungen im Kollagenmetabolismus konnte auch eine erhöhte Expression der hautalterungsrelevanten Faktoren Lysyloxidase (LOX), vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und Interleukin 8 (IL-8) in KSS DE gemessen werden. LOX, die der Quervernetzung von Kollagen- und Elastinfasern dient, wird in UV-bestrahlter Haut verstärkt exprimiert. Außerdem ist gealterte Haut stärker vernetzt. Lichtgealterte Haut neigt zur vermehrten Gefäßbildung, wobei VEGF eine wichtige Rolle spielt. Desweiteren kann man Alterung auch als einen chronischen Entzündungsprozess verstehen, bei dem eine Reihe Zytokine wie auch das IL-8 ausgeschüttet werden. In KSS-Fibroblasten konnten auch mehr oxidierte Proteine gefunden werden. So deuten alle genannten Faktoren daraufhin, dass KSS DE die molekularen und strukturellen dermalen Veränderungen lichtgealterter Haut widerspiegeln.

Neben den dermalen Effekten von mtDNA-geschädigten Fibroblasten wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss auf die epidermale Genese bzw. Homöostase untersucht. Es zeigte sich, dass Vollhautäquivalente, die KSS-Fibroblasten im dermalen Teil enthielten, zwar eine vollständig Epidermis ausbildeten, dass diese jedoch im Durchschnitt dünner war und aus weniger Zellschichten bestand. Dies ging bereits nach einwöchiger Kultivierung mit einer verringerten Proliferation der Keratinozyten in KSS-Vollhautäquivalenten einher. Diese Merkmale entsprechen ebenfalls dem Phänotyp gealterter Haut, der von Atrophie gekennzeichnet ist. Die Erstellung eines Genexpressionsprofils der epidermalen Schicht der KSS Vollhautäquivalente sollte weiteren Aufschluss geben, denn in der Hautalterung kommt es auch zu einer verminderten epidermalen Barrierefunktion.

Zwei von vier untersuchten Enzymen der Sphingolipidsynthese zeigten eine signifikant höhere Expression in KSS- im Vergleich zu NHF-Hautäquivalenten,

nämlich die  $\beta$ -Glucocerebrosidase und die saure Sphingomyelinase, was entweder auf eine Gegenregulation als Antwort auf eine unzureichende Barrierefunktion, oder aber auch ein Hinweis auf eine Verschiebung in Richtung stärkere Differenzierung sein könnte. Für letzteres spräche, dass Proteine, die in der Entstehung des Cornified Envelopes eher zu Anfang gebildet werden wie Involucrin und Loricrin in KSS-Hautäquivalenten nicht signifikant höher exprimiert werden als bei NHF, im Gegensatz zum Filaggrin, welches ein charakteristischer Marker für fortgeschrittene Differenzierung ist und u. a. in der Vernetzung von Keratinfilamenten von Bedeutung ist. Die antimikrobiellen Proteine  $\beta$ -Defensin und Cathelicidin wurden in KSS Hautäquivalenten jedoch in geringerem Maße exprimiert als in normalen Hautäquivalenten. Weitere Studien zur Barrierefunktion *in situ* müssen zur Klärung der beobachteten Phänomene noch durchgeführt werden.

Abschließend läßt sich feststellen, dass Fibroblasten mit mtDNA-Deletionen einen erheblichen Einfluss auf die dermale Integrität und das epidermale Gleichgewicht haben, und zwar derart, dass es den Kennzeichen lichtgealterter Haut entspricht. Das Modell des KSS-Hautäquivalents könnte daher für weiterführende Studien zur Erforschung der Zusammenhänge von mtDNA-Mutationen und der Hautalterung herangezogen werden, ebenso wie zur Erprobung therapeutischer Strategien.

## 6 Summary

Aim of this study was to elucidate the contribution of UV-inducible mtDNA deletions in dermal fibroblasts to photoaging of the skin. The impact of mtDNA deletions on the integrity of the collagen matrix in dermal equivalents and on the epidermal generation and homeostasis in full skin equivalents were studied.

Therefore human dermal equivalents (DEs) were generated by employing human skin fibroblasts either derived from Kearns-Sayre syndrome (KSS) patients, who constitutively carry large amounts of the UV-inducible mitochondrial common deletion, or normal human volunteers. In comparison with normal DEs, KSS DEs exhibited significantly elevated common deletion levels over the whole long term incubation time of six weeks. Moreover the KSS DEs produced more reactive oxygen species (ROS). Importantly, during the six weeks culture period, KSS DEs showed an increased expression of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) compared to NHF DEs without appropriate compensation by the corresponding inhibitor TIMP-1. On protein level more MMP-1 was detected by immunohistochemistry as well as Western blot analysis of DEs. Also, more proteolytic activity of MMP-1 in KSS DEs in comparison to normal DEs was confirmed by zymographic approaches. This was associated with progressive loss of intact collagen fibers and a concomitant increase in collagen fragments in KSS DEs. Increased MMP-1 expression was reduced, if KSS DEs were treated with the antioxidants *N*-acetyl-cysteine and ascorbic acid or with retinyl acetate, that are commonly used in therapeutical treatments of (photo) aged skin. In addition to alterations in collagen metabolism, KSS DEs showed increased mRNA expression for lysyl oxidase (LOX), vascular endothelial growth factor (VEGF) and interleukin-8 (IL-8). LOX, which is responsible for cross-linking of collagen and elastin fibers, is highly induced in UV-irradiated skin. In addition, aged skin is stronger cross-linked than young skin. Photoaged skin is prone to stronger angiogenesis, too, amongst other factors mediated by VEGF. Last but not least, skin aging can be understood as a chronic inflammatory process with cells secreting many cytokines like e. g. IL-8. Furthermore more oxidized proteins were found in KSS fibroblasts. In aggregate, the molecular and structural changes in KSS DEs strongly resembled those observed in photoaged skin.

Beside dermal effects due to mtDNA-damaged fibroblasts influences on epidermal generation and homeostasis were investigated. Full skin equivalents harbouring KSS fibroblasts in the dermal part exhibited a thinner epidermal compartment and less keratinocyte layers. Concomitant less proliferational capacity was observed in KSS full skin equivalents. This features are similar to those of photoaged skin, that is characterized by dermal as well as epidermal atrophy.

To analyze the barrier function of the epidermal layers of KSS full skin equivalents a gene expression profile was generated, because barrier function can be disturbed in aged skin. Two of four enzymes of the sphingolipid synthesis showed a significantly higher expression in KSS in comparison to normal skin equivalents, namely  $\beta$ -glucocerebrosidase and acidic sphingomyelinase. Maybe this is a counter regulation as response to a lack of barrier function, but otherwise it may be a sign for a shift towards stronger epidermal differentiation. The latter theory is supported by the fact that proteins needed at the beginning of cornified envelope generation like involucrin and loricrin are less affected than those that are involved in the final steps like the keratin linking protein filaggrin, which is significantly more expressed in KSS skin equivalents than in normal ones. However, the antimicrobial peptides  $\beta$ -defensin and cathelicidin showed a lower expression level in KSS skin equivalents. Further studies

concerning the barrier function *in situ* will surely result in a better understanding of the observed phenomena.

Finally, it can be summarized that fibroblasts with mtDNA deletions do have an extensive influence on dermal integrity and epidermal homeostasis corresponding to the hallmarks of photoaged skin. Therefore the KSS equivalent is a very useful model to study the connection between mtDNA mutations and chronic photoaging as well as its prevention.

## 7 Literatur

- 1 Allen RG, Tresini M: Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28:463-499 (2000).
- 2 Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465 (1981).
- 3 Andreadis ST, Hamoen KE, Yarmush ML, Morgan JR: Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system. *FASEB J* 15:898-906 (2001).
- 4 Asselineau D, Bernhard B, Bailly C, Darmon M: Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. *Exp Cell Res* 159:536-539 (1985).
- 5 Asselineau D, Prunieras M: Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication. *Br J Dermatol* 111 Suppl 27:219-222 (1984).
- 6 Beckman KB, Ames BN: The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78:547-581 (1998).
- 7 Bell E, Ehrlich HP, Buttle DJ, Nakatsuji T: Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. *Science* 211:1052-1054 (1981).
- 8 Bell E, Ivarsson B, Merrill C: Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1274-1278 (1979).
- 9 Bell E, Sher S, Hull B, Merrill C, Rosen S, Chamson A, Asselineau D, Dubertret L, Coulomb B, Lapiere C, Nusgens B, Neveux Y: The reconstitution of living skin. *J Invest Dermatol* 81:2-10 (1983).
- 10 Bereiter-Hahn J, Voth M: Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27:198-219 (1994).
- 11 Berneburg M, Gattermann N, Stege H, Grewe M, Vogelsang K, Ruzicka T, Krutmann J: Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system. *Photochem Photobiol* 66:271-275 (1997).
- 12 Berneburg M, Grether-Beck S, Kurten V, Ruzicka T, Briviba K, Sies H, Krutmann J: Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* 274:15345-15349 (1999).

- 13 Berneburg M, Krutmann J: Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. *J Invest Dermatol* 111:709-710 (1998).
- 14 Berneburg M, Plettenberg H, Medve-Konig K, Pfahlberg A, Gers-Barlag H, Gefeller O, Krutmann J: Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion *in vivo* in normal human skin. *J Invest Dermatol* 122:1277-1283 (2004).
- 15 Bernerd F: [Human skin reconstructed *in vitro* as a model to study the keratinocyte, the fibroblast and their interactions: photodamage and repair processes]. *J Soc Biol* 199:313-320 (2005).
- 16 Bernerd F, Asselineau D, Frechet M, Sarasin A, Magnaldo T: Reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin *in vitro*: a model to study hypersensitivity to UV light. *Photochem Photobiol* 81:19-24 (2005).
- 17 Bernerd F, Asselineau D, Vioux C, Chevallier-Lagente O, Bouadjar B, Sarasin A, Magnaldo T: Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7817-7822 (2001).
- 18 Bernstein EF, Chen YQ, Kopp JB, Fisher L, Brown DB, Hahn PJ, Robey FA, Lakkakorpi J, Uitto J: Long-term sun exposure alters the collagen of the papillary dermis. Comparison of sun-protected and photoaged skin by northern analysis, immunohistochemical staining, and confocal laser scanning microscopy. *J Am Acad Dermatol* 34:209-218 (1996).
- 19 Boehnke K: Etablierung und Charakterisierung eines Hautmodells zur Analyse epidermaler Regeneration, dermaler Histogenese und endothelialer Vaskulogenese *in vitro* 2009.
- 20 Boehnke K, Mirancea N, Pavesio A, Fusenig NE, Boukamp P, Stark HJ: Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents. *Eur J Cell Biol* 86:731-746 (2007).
- 21 Boyce ST, Christianson DJ, Hansbrough JF: Structure of a collagen-GAG dermal skin substitute optimized for cultured human epidermal keratinocytes. *J Biomed Mater Res* 22:939-957 (1988).
- 22 Boyce ST, Ham RG: Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol* 81:33-40 (1983).
- 23 Braverman IM, Fonferko E: Studies in cutaneous aging: II. The microvasculature. *J Invest Dermatol* 78:444-448 (1982).
- 24 Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ: Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. *Photochem Photobiol* 78:43-48 (2003).

- 25 Brenneisen P, Briviba K, Wlaschek M, Wenk J, Scharffetter-Kochanek K: Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) increases the steady-state mRNA levels of collagenase/MMP-1 in human dermal fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 22:515-524 (1997).
- 26 Brew K, Dinakarpanthian D, Nagase H: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477:267-283 (2000).
- 27 Bua E, Johnson J, Herbst A, DeLong B, McKenzie D, Salamat S, Aiken JM: Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet* 79:469-480 (2006).
- 28 Candi E, Schmidt R, Melino G: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328-340 (2005).
- 29 Candi E, Tarcsa E, Idler WW, Kartasova T, Marekov LN, Steinert PM: Transglutaminase cross-linking properties of the small proline-rich 1 family of cornified cell envelope proteins. Integration with loricrin. *J Biol Chem* 274:7226-7237 (1999).
- 30 Canton I, Cole DM, Kemp EH, Watson PF, Chunthapong J, Ryan AJ, MacNeil S, Haycock JW: Development of a 3D human in vitro skin co-culture model for detecting irritants in real-time. *Biotechnol Bioeng* 106:794-803 (2010).
- 31 Carroll J, Fearnley IM, Shannon RJ, Hirst J, Walker JE: Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics* 2:117-126 (2003).
- 32 Catalgol B, Ziaja I, Breusing N, Jung T, Hohn A, Alpertunga B, Schroeder P, Chondrogianni N, Gonos ES, Petropoulos I, Friguet B, Klotz LO, Krutmann J, Grune T: The proteasome is an integral part of solar ultraviolet a radiation-induced gene expression. *J Biol Chem* 284:30076-30086 (2009).
- 33 Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605 (1979).
- 34 Chu DH, Haake AR, Holbrook K, Loomis CA: The Structure and Development of Skin: Fitzpatrick's dermatology in general medicine, pp 58-88 2003.
- 35 Contard P, Bartel RL, Jacobs L, Perlish JS, MacDonald ED, Handler L, Cone D, Fleischmajer R: Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone. *J Invest Dermatol* 100:35-39 (1993).
- 36 Corral-Debrinski M, Horton T, Lott MT, Shoffner JM, Beal MF, Wallace DC: Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat Genet* 2:324-329 (1992).
- 37 Cortopassi GA, Arnheim N: Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 18:6927-6933 (1990).

- 38 Cortopassi GA, Shibata D, Soong NW, Arnheim N: A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7370-7374 (1992).
- 39 Cwerman-Thibault H, Sahel JA, Corral-Debrinski M: Mitochondrial medicine: to a new era of gene therapy for mitochondrial DNA mutations. *J Inherit Metab Dis* (2010).
- 40 Dale BA, Presland RB, Lewis SP, Underwood RA, Fleckman P: Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J Invest Dermatol* 108:179-187 (1997).
- 41 Di Donato S: Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis* 23:247-263 (2000).
- 42 Di Mauro S, Schon EA: Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656-2668 (2003).
- 43 Egawa M, Kohno Y, Kumano Y: Oxidative effects of cigarette smoke on the human skin. *Int J Cosmet Sci* 21:83-98 (1999).
- 44 El-Ghalbzouri A, Gibbs S, Lamme E, Van Blitterswijk CA, Ponec M: Effect of fibroblasts on epidermal regeneration. *Br J Dermatol* 147:230-243 (2002).
- 45 El-Ghalbzouri A, Lamme EN, van BC, Koopman J, Ponec M: The use of PEGT/PBT as a dermal scaffold for skin tissue engineering. *Biomaterials* 25:2987-2996 (2004).
- 46 Elias PM: Stratum corneum defensive functions: an integrated view. *J Invest Dermatol* 125:183-200 (2005).
- 47 Farage M, Miller K, Maibach H: Degenerative changes in aging skin, Farage M, Miller K, Maibach H (eds): *Textbook of aging skin*, pp 25-35 (Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2010).
- 48 Farris PK: Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. *Dermatol Surg* 31:814-817 (2005).
- 49 Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang ZQ, Varani J, Kang S, Voorhees JJ: Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379:335-339 (1996).
- 50 Fisher GJ, Quan T, Purohit T, Shao Y, Cho MK, He T, Varani J, Kang S, Voorhees JJ: Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *Am J Pathol* 174:101-114 (2009).
- 51 Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Lin P, McPhillips F, Wang Z, Li X, Wan Y, Kang S, Voorhees JJ: Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest* 101:1432-1440 (1998).

- 52 Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, Voorhees JJ: Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol* 69:154-157 (1999).
- 53 Fligiel SE, Varani J, Datta SC, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ: Collagen degradation in aged/photodamaged skin in vivo and after exposure to matrix metalloproteinase-1 in vitro. *J Invest Dermatol* 120:842-848 (2003).
- 54 Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S: Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev* 128:92-105 (2007).
- 55 Fritsch P: *Dermatologie und Venerologie*. (Springer Verlag, Berlin 1998).
- 56 Funayama E, Chodon T, Oyama A, Sugihara T: Keratinocytes promote proliferation and inhibit apoptosis of the underlying fibroblasts: an important role in the pathogenesis of keloid. *J Invest Dermatol* 121:1326-1331 (2003).
- 57 Gavazzi G, Krause K-H: Ageing and infection. *Lancet Infect Dis* 2:659-666 (2002).
- 58 Gerstein AD, Phillips TJ, Rogers GS, Gilchrest BA: Wound healing and aging. *Dermatol Clin* 11:749-757 (1993).
- 59 Ghadially R, Brown BE, Sequeira-Martin SM, Feingold KR, Elias PM: The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model. *J Clin Invest* 95:2281-2290 (1995).
- 60 Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6715-6719 (1980).
- 61 Gonzalo R, Garcia-Arumi E, Llige D, Marti R, Solano A, Montoya J, Arenas J, Andreu AL: Free radicals-mediated damage in transmitochondrial cells harboring the T14487C mutation in the ND6 gene of mtDNA. *FEBS Lett* 579:6909-6913 (2005).
- 62 Gredilla R, Bohr VA, Stevnsner T: Mitochondrial DNA repair and association with aging--an update. *Exp Gerontol* 45:478-488 (2010).
- 63 Grinnell F: Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 13:264-269 (2003).
- 64 Gudjonsson JE, Johnston A, Stoll SW, Riblett MB, Xing X, Kochkodan JJ, Ding J, Nair RP, Aphale A, Voorhees JJ, Elder JT: Evidence for altered Wnt signaling in psoriatic skin. *J Invest Dermatol* 130:1849-1859 (2010).
- 65 Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11:298-300 (1956).
- 66 Heckmann M: *Taschenbuch Dermatologie*. (Springer Verlag, Berlin 1999).

- 67 Herrmann JM, Hell K: Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 30:205-211 (2005).
- 68 Hiona A, Leeuwenburgh C: The role of mitochondrial DNA mutations in aging and sarcopenia: Implications for the mitochondrial vicious cycle theory of aging. *Exp Gerontol* 43:24-33 (2008).
- 69 Holleran WM, Williams ML, Gao WN, Elias PM: Serine-palmitoyl transferase activity in cultured human keratinocytes. *J Lipid Res* 31:1655-1661 (1990).
- 70 Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA: Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 331:717-719 (1988).
- 71 Holt IJ, He J, Mao CC, Boyd-Kirkup JD, Martinsson P, Sembongi H, Reyes A, Spelbrink JN: Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion* 7:311-321 (2007).
- 72 Hulmes DJS: Collagen Diversity, Synthesis and Assembly, Fratzl P (ed): Collagen -Structure and Mechanics, pp 15-41 (Springer Verlag, Berlin 2008).
- 73 Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U: Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408:708-713 (2000).
- 74 Jordana M, Sarnstrand B, Sime PJ, Ramis I: Immune-inflammatory functions of fibroblasts. *Eur Respir J* 7:2212-2222 (1994).
- 75 Jou MJ, Peng TI, Wu HY, Wei YH: Enhanced generation of mitochondrial reactive oxygen species in cybrids containing 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Ann N Y Acad Sci* 1042:221-228 (2005).
- 76 Jung EG: *Dermatologie* 4th ed. (Hippokrates Verlag, Stuttgart 1998).
- 77 Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP: Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120:1955-1958 (2007).
- 78 Kaguni LS: DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* 73:293-320 (2004).
- 79 Kalinin AE, Kajava AV, Steinert PM: Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24:789-800 (2002).
- 80 Kang S, Chung JH, Lee JH, Fisher GJ, Wan YS, Duell EA, Voorhees JJ: Topical N-acetyl cysteine and genistein prevent ultraviolet-light-induced signaling that leads to photoaging in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 120:835-841 (2003).
- 81 Kaufman BA, Durisic N, Mativetsky JM, Costantino S, Hancock MA, Grutter P, Shoubridge EA: The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell* 18:3225-3236 (2007).

- 82 Kearns TP, Sayre GP: Retinitis pigmentosa, external ophthalmoplegia, and complete heart block: unusual syndrome with histologic study in one of two cases. *AMA Arch Ophthalmol* 60:280-289 (1958).
- 83 Kee SH, Steinert PM: Microtubule disruption in keratinocytes induces cell-cell adhesion through activation of endogenous E-cadherin. *Mol Biol Cell* 12:1983-1993 (2001).
- 84 Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W: Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2160-2164 (1993).
- 85 Khalil Z, Ralevic V, Bassirat M, Dusting GJ, Helme RD: Effects of ageing on sensory nerve function in rat skin. *Brain Res* 641:265-272 (1994).
- 86 Khorramizadeh MR, Tredget EE, Telasky C, Shen Q, Ghahary A: Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts. *Mol Cell Biochem* 194:99-108 (1999).
- 87 Kleinle S, Wiesmann U, Superti-Furga A, Krahenbuhl S, Boltshauser E, Reichen J, Liechti-Gallati S: Detection and characterization of mitochondrial DNA rearrangements in Pearson and Kearns-Sayre syndromes by long PCR. *Hum Genet* 100:643-650 (1997).
- 88 Kligman LH: The ultraviolet-irradiated hairless mouse: a model for photoaging. *J Am Acad Dermatol* 21:623-631 (1989).
- 89 Kligman LH: The hairless mouse model for photoaging. *Clin Dermatol* 14:183-195 (1996).
- 90 Koch H, Wittern KP, Bergemann J: In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. *J Invest Dermatol* 117:892-897 (2001).
- 91 Koop DR: Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. *FASEB J* 6:724-730 (1992).
- 92 Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE: Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47:333-343 (2009).
- 93 Krämer U, Schikowski T: Recent Demographic Changes and Consequences for Dermatology, Gilchrest BA, Krutmann J (eds): *Skin Aging*, pp 2-8 (Springer Verlag, Berlin 2006).
- 94 Kraytsberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K: Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 38:518-520 (2006).
- 95 Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, Wanrooij S, Spelbrink JN, Lightowlers RN, Turnbull DM: What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet* 40:275-279 (2008).

- 96 Krutmann J, Diepgen T: Hautalterung. (Springer Verlag, Berlin 2003).
- 97 Krutmann J, Gilchrest B: Photoaging of skin, Krutmann J, Gilchrest B (eds): Skin aging, pp 33-44 Duesseldorf; Boston 2006).
- 98 Krutmann J, Schroeder P: Role of mitochondria in photoaging of human skin: the defective powerhouse model. *J Investig Dermatol Symp Proc* 14:44-49 (2009).
- 99 Kujoth GC, Hiona A, Pugh TD, Someya S, Panzer K, Wohlgemuth SE, Hofer T, Seo AY, Sullivan R, Jobling WA, Morrow JD, Van RH, Sedivy JM, Yamasoba T, Tanokura M, Weindruch R, Leeuwenburgh C, Prolla TA: Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309:481-484 (2005).
- 100 Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685 (1970).
- 101 Larsson NG, Holme E, Kristiansson B, Oldfors A, Tulinius M: Progressive increase of the mutated mitochondrial DNA fraction in Kearns-Sayre syndrome. *Pediatr Res* 28:131-136 (1990).
- 102 Lee DY, Lee JH, Lee ES, Cho KH, Yang JM: Fibroblasts play a stimulatory role in keratinocyte proliferation but an inhibitory role in melanocyte growth and pigmentation in a skin equivalent system from skin type IV. *Arch Dermatol Res* 294:444-446 (2003).
- 103 Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK: IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 170:3369-3376 (2003).
- 104 Li M, Moeen RA, Chavez-Munoz C, Lai A, Ghahary A: Keratinocyte-releasable factors increased the expression of MMP1 and MMP3 in co-cultured fibroblasts under both 2D and 3D culture conditions. *Mol Cell Biochem* 332:1-8 (2009).
- 105 Lu CY, Lee HC, Fahn HJ, Wei YH: Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutat Res* 423:11-21 (1999).
- 106 Lucero HA, Kagan HM: Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci* 63:2304-2316 (2006).
- 107 Majora M, Wittkamp T, Schuermann B, Schneider M, Franke S, Grether-Beck S, Wilichowski E, Bernerd F, Schroeder P, Krutmann J: Functional consequences of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts: increased contractile strength in collagen lattices is due to oxidative stress-induced lysyl oxidase activity. *Am J Pathol* 175:1019-1029 (2009).
- 108 Marella M, Seo BB, Thomas BB, Matsuno-Yagi A, Yagi T: Successful amelioration of mitochondrial optic neuropathy using the yeast NDI1 gene in a rat animal model. *PLoS One* 5:e11472 (2010).

- 109 Maresch T: Untersuchungen zum Kausalzusammenhang zwischen mtDNS-Mutationen, oxidativem Stress und Hautalterung 2007).
- 110 Martin W, Russell MJ: On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:59-83 (2003).
- 111 Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, Ueda E, Morishima Y, Tabata K, Yasuno H, Hashida M, Iizuka H, Ikawa M, Okabe M, Kondoh G, Kinoshita T, Takeda J, Yamanishi K: Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1044-1049 (1998).
- 112 McCord JM, Fridovich I: Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte protein (hemocyanin). *J Biol Chem* 244:6049-6055 (1969).
- 113 McShane MA, Hammans SR, Sweeney M, Holt IJ, Beattie TJ, Brett EM, Harding AE: Pearson syndrome and mitochondrial encephalomyopathy in a patient with a deletion of mtDNA. *Am J Hum Genet* 48:39-42 (1991).
- 114 Mita S, Schmidt B, Schon EA, DiMauro S, Bonilla E: Detection of "deleted" mitochondrial genomes in cytochrome-c oxidase-deficient muscle fibers of a patient with Kearns-Sayre syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9509-9513 (1989).
- 115 Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM: Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G250-G254 (2000).
- 116 Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S, .: Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med* 320:1293-1299 (1989).
- 117 Mortimer CE: *Chemie* 6th ed. (Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1996).
- 118 Munnich A, Rustin P, Rotig A, Chretien D, Bonnefont JP, Nuttin C, Cormier V, Vassault A, Parvy P, Bardet J, .: Clinical aspects of mitochondrial disorders. *J Inher Metab Dis* 15:448-455 (1992).
- 119 Nass S, Nass MM: Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J Cell Biol* 19:613-629 (1963).
- 120 Nemes Z, Steinert PM: Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp Mol Med* 31:5-19 (1999).
- 121 Nowinski D, Lysheden AS, Gardner H, Rubin K, Gerdin B, Ivarsson M: Analysis of gene expression in fibroblasts in response to keratinocyte-derived

- factors in vitro: potential implications for the wound healing process. *J Invest Dermatol* 122:216-221 (2004).
- 122 Ockner RK, Kaikaus RM, Bass NM: Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: review and hypothesis. *Hepatology* 18:669-676 (1993).
- 123 Peng TI, Yu PR, Chen JY, Wang HL, Wu HY, Wei YH, Jou MJ: Visualizing common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial reactive oxygen species generation and apoptosis upon oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1762:241-255 (2006).
- 124 Ponc M, Weerheim A, Kempenaar J, Mommaas AM, Nugteren DH: Lipid composition of cultured human keratinocytes in relation to their differentiation. *J Lipid Res* 29:949-961 (1988).
- 125 Porteous WK, James AM, Sheard PW, Porteous CM, Packer MA, Hyslop SJ, Melton JV, Pang CY, Wei YH, Murphy MP: Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion. *Eur J Biochem* 257:192-201 (1998).
- 126 Poumay Y, Coquette A: Modelling the human epidermis in vitro: tools for basic and applied research. *Arch Dermatol Res* 298:361-369 (2007).
- 127 Presland RB, Kimball JR, Kautsky MB, Lewis SP, Lo CY, Dale BA: Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 108:170-178 (1997).
- 128 Proksch E, Brandner JM, Jensen JM: The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol* 17:1063-1072 (2008).
- 129 Prunieras M, Regnier M, Woodley D: Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface. *J Invest Dermatol* 81:28-33 (1983).
- 130 Puoti G, Carrara F, Sampaolo S, De CM, Vincitorio CM, Invernizzi F, Zeviani M: Identical large scale rearrangement of mitochondrial DNA causes Kearns-Sayre syndrome in a mother and her son. *J Med Genet* 40:858-863 (2003).
- 131 Rahman S, Poulton J, Marchington D, Suomalainen A: Decrease of 3243 A->G mtDNA mutation from blood in MELAS syndrome: a longitudinal study. *Am J Hum Genet* 68:238-240 (2001).
- 132 Reimann V, Kramer U, Sugiri D, Schroeder P, Hoffmann B, Medve-Koenigs K, Jockel KH, Ranft U, Krutmann J: Sunbed use induces the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Invest Dermatol* 128:1294-1297 (2008).
- 133 Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6:331-343 (1975).

- 134 Rheinwald JG, Green H: Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature* 265:421-424 (1977).
- 135 Rittie L, Fisher GJ, Voorhees JJ: Retinoid therapy for photoaging, Gilchrist BA, Krutmann J (eds): *Skin Aging*, pp 143-156 (Springer Verlag, Berlin 2006).
- 136 Romeis B: *Mikroskopische Technik* 17th Edition ed. (Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1989).
- 137 Rotig A, Cormier V, Blanche S, Bonnefont JP, Ledest F, Romero N, Schmitz J, Rustin P, Fischer A, Saudubray JM, .: Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy. *J Clin Invest* 86:1601-1608 (1990).
- 138 Rubin JS, Osada H, Finch PW, Taylor WG, Rudikoff S, Aaronson SA: Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:802-806 (1989).
- 139 Sander CS, Chang H, Salzman S, Muller CS, Ekanayake-Mudiyanselage S, Elsner P, Thiele JJ: Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 118:618-625 (2002).
- 140 Saraste M: Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:1488-1493 (1999).
- 141 Scheffler IE: A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* 1:3-31 (2001).
- 142 Schieke S, Stege H, Kurten V, Grether-Beck S, Sies H, Krutmann J: Infrared-A radiation-induced matrix metalloproteinase 1 expression is mediated through extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in human dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 119:1323-1329 (2002).
- 143 Schmeichel KL, Bissell MJ: Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. *J Cell Sci* 116:2377-2388 (2003).
- 144 Schon EA, Rizzuto R, Moraes CT, Nakase H, Zeviani M, DiMauro S: A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* 244:346-349 (1989).
- 145 Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van RH, Wallace DC, Rabinovitch PS: Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308:1909-1911 (2005).
- 146 Schroeder P, Gremmel T, Berneburg M, Krutmann J: Partial depletion of mitochondrial DNA from human skin fibroblasts induces a gene expression profile reminiscent of photoaged skin. *J Invest Dermatol* 128:2297-2303 (2008).
- 147 Schroeder P, Pohl C, Calles C, Marks C, Wild S, Krutmann J: Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling. *Free Radic Biol Med* 43:128-135 (2007).

- 148 Schuermann BA, Majora M, Franke S, Schneider M, Hajimiragha H, Wilichowski E, Bernerd F, Schroeder P, Krutmann J.: Functional consequences of mitochondrial DNA deletions in human skin aging: The presence of UV-inducible large scale deletions in fibroblasts causes alterations in skin equivalent models identical to those found in photoaging. (*submitted*)
- 149 Scott KA, Wood EJ, Karran EH: A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction. *FEBS Lett* 441:137-140 (1998).
- 150 Sell DR, Lane MA, Johnson WA, Masoro EJ, Mock OB, Reiser KM, Fogarty JF, Cutler RG, Ingram DK, Roth GS, Monnier VM: Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:485-490 (1996).
- 151 Shanske S, Moraes CT, Lombes A, Miranda AF, Bonilla E, Lewis P, Whelan MA, Ellsworth CA, DiMauro S: Widespread tissue distribution of mitochondrial DNA deletions in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 40:24-28 (1990).
- 152 Shevchenko RV, James SL, James SE: A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction. *J R Soc Interface* 7:229-258 (2010).
- 153 Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN: Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10771-10778 (1994).
- 154 Shoffner JM, Lott MT, Voljavec AS, Soueidan SA, Costigan DA, Wallace DC: 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 U S A* 86:7952-7956 (1989).
- 155 Shuster S, Black MM, McVitie E: The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density. *Br J Dermatol* 93:639-643 (1975).
- 156 Sies H: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82:291-295 (1997).
- 157 Simonetti S, Chen X, DiMauro S, Schon EA: Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR. *Biochim Biophys Acta* 1180:113-122 (1992).
- 158 Simonsz HJ, Barlocher K, Rotig A: Kearns-Sayre's syndrome developing in a boy who survived Pearson's syndrome caused by mitochondrial DNA deletion. *Doc Ophthalmol* 82:73-79 (1992).
- 159 St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD: Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277:44784-44790 (2002).
- 160 Stahl W, Mukhtar H, Afaq F, Sies H: Vitamins and polyphenols in systemic photoprotection, Gilchrist BA, Krutmann J (eds): *Skin Aging*, pp 113-121 (Springer Verlag, Berlin 2006).

- 161 Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI: Sirius Red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol* 78:69-72 (1964).
- 162 Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, Angel P: c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 103:745-755 (2000).
- 163 Trifunovic A: Mitochondrial DNA and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1757:611-617 (2006).
- 164 Trifunovic A, Hansson A, Wredenberg A, Rovio AT, Dufour E, Khvorostov I, Spelbrink JN, Wibom R, Jacobs HT, Larsson NG: Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17993-17998 (2005).
- 165 Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly Y, Gidlof S, Oldfors A, Wibom R, Tornell J, Jacobs HT, Larsson NG: Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429:417-423 (2004).
- 166 Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW: Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1797:113-128 (2010).
- 167 Varani J, Perone P, Deming MO, Warner RL, Aslam MN, Bhagavathula N, Dame MK, Voorhees JJ: Impaired keratinocyte function on matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) damaged collagen. *Arch Dermatol Res* (2009).
- 168 Varani J, Perone P, Warner RL, Dame MK, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ: Vascular tube formation on matrix metalloproteinase-1-damaged collagen. *Br J Cancer* 98:1646-1652 (2008).
- 169 Varani J, Schuger L, Dame MK, Leonard C, Fligiel SE, Kang S, Fisher GJ, Voorhees JJ: Reduced fibroblast interaction with intact collagen as a mechanism for depressed collagen synthesis in photodamaged skin. *J Invest Dermatol* 122:1471-1479 (2004).
- 170 Varani J, Warner RL, Gharaee-Kermani M, Phan SH, Kang S, Chung JH, Wang ZQ, Datta SC, Fisher GJ, Voorhees JJ: Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol* 114:480-486 (2000).
- 171 Vermulst M, Wanagat J, Kujoth GC, Bielas JH, Rabinovitch PS, Prolla TA, Loeb LA: DNA deletions and clonal mutations drive premature aging in mitochondrial mutator mice. *Nat Genet* 40:392-394 (2008).
- 172 Vierkotter A, Schikowski T, Ranft U, Sugiri D, Matsui M, Kramer U, Krutmann J: Airborne Particle Exposure and Extrinsic Skin Aging. *J Invest Dermatol* (2010).

- 173 Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 92:827-839 (2003).
- 174 Vives-Bauza C, Gonzalo R, Manfredi G, Garcia-Arumi E, Andreu AL: Enhanced ROS production and antioxidant defenses in cybrids harbouring mutations in mtDNA. *Neurosci Lett* 391:136-141 (2006).
- 175 Voet D, Voet JG: Biochemie 1st ed. (VCH, Weinheim 1994).
- 176 Wallace DC: Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* 256:628-632 (1992).
- 177 Wallace DC: 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* 57:201-223 (1995).
- 178 Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK: Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242:1427-1430 (1988).
- 179 Wang Y, Bogenhagen DF: Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 281:25791-25802 (2006).
- 180 Weber K, Wilson JN, Taylor L, Brierley E, Johnson MA, Turnbull DM, Bindoff LA: A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 60:373-380 (1997).
- 181 Wei YH, Lee CF, Lee HC, Ma YS, Wang CW, Lu CY, Pang CY: Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 BP-deleted mitochondrial DNA. *Ann N Y Acad Sci* 928:97-112 (2001).
- 182 Werner S: Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev* 9:153-165 (1998).
- 183 Wikipedia: Tocopherol (2010).
- 184 Wong LJ: Diagnostic challenges of mitochondrial DNA disorders. *Mitochondrion* 7:45-52 (2007).
- 185 Wu S, Gao J, Dinh QT, Chen C, Fimmel S: IL-8 production and AP-1 transactivation induced by UVA in human keratinocytes: roles of D-alpha-tocopherol. *Mol Immunol* 45:2288-2296 (2008).
- 186 Yaar M: Clinical and histological features of intrinsic versus extrinsic skin aging, Gilchrist B, Krutmann J (eds): *Skin aging*, pp 9-21 (Springer Verlag, Berlin 2006).
- 187 Yaar M, Gilchrist B: Aging of skin: Fitzpatrick's dermatology in general medicine, pp 1386-1398 (2003).

- 188 Yaffe MP: Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol* 1:E149-E150 (1999).
- 189 Yang JH, Lee HC, Lin KJ, Wei YH: A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin. *Arch Dermatol Res* 286:386-390 (1994).
- 190 Yang JH, Lee HC, Wei YH: Photoageing-associated mitochondrial DNA length mutations in human skin. *Arch Dermatol Res* 287:641-648 (1995).
- 191 Yano K, Oura H, Detmar M: Targeted overexpression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in the epidermis of transgenic mice prevents ultraviolet-B-induced angiogenesis and cutaneous photo-damage. *J Invest Dermatol* 118:800-805 (2002).
- 192 Zacchi V, Soranzo C, Cortivo R, Radice M, Brun P, Abatangelo G: In vitro engineering of human skin-like tissue. *J Biomed Mater Res* 40:187-194 (1998).
- 193 Zeviani M, Carelli V: Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 16:585-594 (2003).
- 194 Zeviani M, Di Donato S: Mitochondrial disorders. *Brain* 127:2153-2172 (2004).
- 195 Zeviani M, Moraes CT, DiMauro S, Nakase H, Bonilla E, Schon EA, Rowland LP: Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Neurology* 38:1339-1346 (1988).
- 196 Zhang Y, Ikeno Y, Qi W, Chaudhuri A, Li Y, Bokov A, Thorpe SR, Baynes JW, Epstein C, Richardson A, Van RH: Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 64:1212-1220 (2009).

## 8 Anhang

### Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name	Bianca-Angela Schürmann
Geburtsdatum, -ort	20.08.1976, Wuppertal
Familienstand	ledig
Anschrift	Angerhauser Str. 47c, 47259 Duisburg
Telefon	0203/9342616; 01570/3322969
Email	mail@bschuermann.de

#### Forschungstätigkeit

09/07 bis vorauss. 01/11	Promotion im Bereich Molekulare Altersforschung bei Prof. Krutmann, IUF, Düsseldorf Thema: „Funktionelle Auswirkungen von mitochondrialen DNA-Deletionen auf die Hautalterung“ (Analyse am dermalen Äquivalent und am Vollhautmodell)
07/05 bis 06/07	Wiss. Angestellte an der Uni Wuppertal, Fachgruppe chem. Mikrobiologie, Schwerpunkt: Aufklärung und Manipulation der Biosynthesewege von Aminoglykosidantibiotika

#### Hochschulstudium

10/00 bis 06/05	Chemie mit Abschluss Diplom, Uni Wuppertal Titel der Diplomarbeit: „Fortimicin Biosynthese in <i>Micromonospora olivasterospora</i> : Identifizierung der myo-Inositol-Dehydrogenase“
-----------------	--

#### Berufliche Tätigkeit

06/99 bis 10/00	Chemielaborantin beim Landesumweltamt NRW, Düsseldorf, Bereich HPLC-Spurenanalytik
-----------------	--

#### Berufliche Ausbildung

08/96 bis 06/99	Ausbildung zur Chemielaborantin beim Landesumweltamt NRW, Essen/Düsseldorf
-----------------	--

#### Schulbildung

08/87 bis 06/96	Carl-Duisberg-Gymnasium, Wuppertal, Abschluss: Abitur
-----------------	---

## Weitere Qualifikationen

Tierversuchsschein	Fachkundenachweis gem. § 9 TierSchG an der Tierversuchsanlage Düsseldorf, Mai 2009
Sprachkenntnisse	Englisch: fließend in Wort und Schrift Spanisch: Grundkenntnisse Französisch: Grundkenntnisse
EDV-Kenntnisse	MS Excel, Word, Powerpoint: sehr gut Statistiksoftware GraphPad Prism: sehr gut Bearbeitung mikrosk. Bilder mit ImageJ, AnalySIS und AxioVision: gut PCR-Datenauswertung mit BioRAD iQ5: sehr gut Plasmidklonierung mit Clone, pDRAW: gut
BWL-Kenntnisse	Vorprüfung BWL als Nebenfach, Uni Wuppertal, 2003
Lehrerfahrung	Praktikumsbetreuung in allgemeiner Chemie für Sicherheitstechniker, Uni Wuppertal

## Stipendien und Preise

Stipendiatin im GRK1033 „Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Alterungsprävention“, 2007-2009

Stipendium zur Teilnahme am SFRR Advanced Lecture Course in Spetses, Griechenland, 2010

Auszeichnung der Diplomarbeit mit dem 1. Preis der GFBU Wuppertal, 2006, dotiert mit 3000 Euro

## Persönliches Engagement

Senatsmitglied der Uni Wuppertal sowie Mitglied im Fachbereichs- und Fachschaftsrat Chemie

## Veröffentlichungen

Schuermann BA, Majora M, Franke S, Schneider M, Hajimiragha H, Wilichowski E, Bernerd F, Schroeder P, Krutmann J. **UV-inducible large scale deletions cause photoaging in human dermal equivalent models** (*submitted*)

Majora M, Wittkamp T, Schuermann B, Schneider M, Franke S, Grether-Beck S, Wilichowski E, Bernerd F, Schroeder P, Krutmann J. **Functional consequences of mitochondrial DNA deletions in human skin fibroblasts: increased contractile strength in collagen lattices is due to oxidative stress-induced lysyl oxidase activity.** *Am J Pathol.* 2009 Sep;175(3):1019-29. Epub 2009 Aug 6.

## Beteiligung an Konferenzen

FEBS/SFRR-E/IUBMB Advanced Lecture Course, Spetses island, Greece, June, 4-10, 2010 "Protein maintenance and turnover in ageing & diseases": **Involvement of reactive oxygen species in enhanced collagen degradation in dermal skin equivalents harbouring human fibroblasts with mitochondrial DNA deletions.** Schuermann BA, Majora M, Franke S, Schneider M, Schroeder P, Krutmann J (Poster Presentation)

5th Annual Meeting of the GRK 1033, Kardinal Schulte Haus, Bergisch Gladbach, December 11 - 12, 2009: **Functional role of mtDNA deletions in skin aging.** Schuermann BA (Lecture).

13th Joint Meeting Signal Transduction - Receptors, Mediators and Genes, Weimar, October 29 - 31, 2009: **Increased levels of mtDNA large scale deletion in human fibroblasts lead to augmented collagen degradation in dermal skin equivalents.** Schuermann BA, Majora M, Schroeder P, Krutmann J (Poster Presentation).

Biomarkers of Ageing 2009, Halle-Wittenberg, September 18 - 20, 2009: **Increased levels of mtDNA large scale deletions in human fibroblasts enhance collagen degradation in dermal skin equivalents.** Schuermann BA, Majora M, Schroeder P, Krutmann J (Poster Presentation).

39th Annual ESDR Meeting 2009, Budapest, Hungary, September 9 - 12, 2009: **Enhanced collagen degradation in a dermal skin equivalent model containing fibroblasts with large scale deletions of mtDNA.** Schuermann BA, Majora M, Schroeder P, Krutmann J (Poster Presentation).

15th International Congress on Photobiology, Düsseldorf, June 18 - 23, 2009: **Increased levels of large scale deletions of mtDNA of skin fibroblasts result in increased collagen degradation in dermal skin equivalents.** Schuermann BA, Majora M, Schroeder P, Krutmann J (Poster Presentation).

4. Annual Meeting of the GRK 1033, Schloss Mickeln, Düsseldorf, November 22 - 23, 2007: **Charakterisierung molekularer Mechanismen des Zusammenhangs von Hautalterung und dem Auftreten von Deletionen der mitochondrialen DNS.** Schuermann BA, Maresch T, Majora M, Schroeder P, Krutmann J (Lecture).