Untersuchungen zum Kausalzusammenhang zwischen mtDNS-Mutationen, oxidativem Stress und Hautalterung

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

> vorgelegt von Tanja Désirée Maresch aus Essen

> > Dezember 2007

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: 13.12.07

für Georg

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	EINLEITUNG	1
<u>1.1</u>	Mitochondrien und oxidativer Stress	1
<u>1.2</u>	Die Bedeutung von oxidativem Stress und mtDNS- Mutationen für Alterungsprozesse	7
<u>1.3</u>	Mitochondriale Erkrankungen - das Kearns-Sayre-Syndrom	10
<u>1.4</u>	Haut	13
<u>1.5</u>	Hautalterung	16
<u>1.6</u>	Hautäquivalentmodelle als <i>in vitro</i> -Modelle der dermatologischen Forschung	18
<u>2</u>	WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG	.22
<u>3</u>	MATERIAL UND METHODEN	.23
<u>3.1</u>	Material	23
<u>3.1.1</u>	Humane dermale Fibroblasten	23
3.1.2	Zusammensetzung von Zellkultur-Medien	23
$\frac{3.1.3}{2.1.4}$	Zellkultur-Zusätze und Reagenzien	24
$\frac{3.1.4}{2.1.5}$	<u>Autiliämen und Eäskelägungen</u>	24
<u>3.1.3</u>	Antikolper und Falbelosungen	23
3.2	Zellkultur Methoden (Monolaver)	
$\frac{3.2}{3.2}$	Isolation humaner dermaler Fibroblasten	26
3.2.2	Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten im Monolaver	
3.2.3	Kryokonservierung und Rekultivierung humaner dermaler Fibroblasten	27
3.2.4	Bestimmung der Zellzahl humaner dermaler Fibroblasten	27
• •		•••
<u>3.3</u>	Zellkultur Methoden (dermale Hautaquivalente)	28
$\frac{3.3.1}{2.2.2}$	<u>Syntnese von dermalen Haulaquivalenten</u> Bestimmung der Kontraktionsfähigkeit humaner Eibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel	28
$\frac{3.3.2}{3.3.3}$	Kultivierung dermaler Hautäquivalente	29
<u>3.3.4</u>	Isolierung der Fibroblasten aus dem dermalen Hautäquivalent	30
		21
$\frac{3.4}{2.41}$	Molekularbiologische Methoden	31
$\frac{3.4.1}{2.4.2}$	Isolierung von Nukleinsauren aus numanen dermalen Fibrobiasten	31
$\frac{3.4.2}{3.4.2}$	Synthese yon komplementerer DNS (aDNS)	33
$\frac{3.4.5}{3.4.4}$	Real-Time-PCR	34
<u></u>		54
<u>3.5</u>	Biophysikalische Methoden	37
<u>3.5.1</u>	Messung reaktiver Sauerstoffspezies in lebenden Zellen	37
<u>3.5.2</u>	Durchflusszytometrische Analyse	38
3.6	Histochemische Methoden	40
3.6.1	Immunochemische Färbung von Gefrierschnitten	40

<u>4</u>	ERGEBNISSE
<u>4.1</u>	KSS-Fibroblasten unterscheiden sich genetisch, physiologisch und morphologisch von Kontroll- Eibroblasten
<u>4.1.1</u>	KSS-Fibroblasten besitzen einen konstitutiv höheres Gehalt an Common Deletion als Kontroll- Fibroblasten 42
<u>4.1.2</u>	KSS-Fibroblasten besitzen einen höheren Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies als Kontroll- Eibroblasten 44
<u>4.1.3</u>	KSS-Fibroblasten unterscheiden sich in ihrer Morphologie von Kontroll-Fibroblasten
<u>4.2</u> <u>4.2.1</u> <u>4.2.2</u> <u>4.2.3</u>	Etablierung und Modifikation eines Modellsystems dermaler Hautäquivalente
<u>4.3</u>	KSS-Fibroblasten kontrahieren ein Kollagengel schneller als Kontroll-Fibroblasten
<u>4.4</u>	ROS haben einen Einfluss auf den Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-
<u>4.4.1</u>	Der Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten wird durch anoxische Bedingungen reduziert
<u>4.4.2</u>	Der Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten wird durch Zugabe von PBN reduziert
<u>4.5</u>	Welcher molekulare Mechanismus liegt dem ROS-vermittelten Kontraktionsunterschied
<u>4.5.1</u>	<u>XWischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten Zugrunde:</u> <u>KSS-Fibroblasten zeigen im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten keinen Unterschied in MMP1- oder</u>
<u>4.5.2</u>	<u>KSS- und Kontroll-Fibroblasten besitzen eine vergleichbare Ausstattung der Integrinuntereinheiten α2</u> und β1
<u>4.5.3</u>	Eine erhöhte Lysyloxidase-Expression ist am gesteigerten Kontraktionsvermögen der KSS-Fibroblasten beteiligt 63
<u>5</u>	DISKUSSION
<u>6</u>	ZUSAMMENFASSUNG
Z	LITERATURVERZEICHNIS
<u>8</u>	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS
<u>9</u>	<u>ANHANG</u> 91
<u>9.1</u>	Danksagung
<u>9.2</u>	Lebenslauf
<u>9.3</u>	Erklärung

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien und oxidativer Stress

Mitochondrien sind zytoplasmatische, von einer Doppelmembran umgebene Organellen, die in fast allen eukaryotischen Zellen vorkommen (Zeviani & Di Donato 2004). Die glatte äußere Membran trennt den Intermembranraum vom Zytosol der Zelle und enthält Proteinkomplexe ("Porine"), die einen Austausch kleinerer Moleküle (< 10 kDa) erlauben (Koolman & Röhm 2003). Die innere Membran dagegen, die den Intermembranraum vom Innenraum der Mitochondrien ("Matrix") abgrenzt, besitzt viele Einstülpungen ("Cristae"), so dass eine große Membranoberfläche entsteht. Da diese Membran auch für kleinere Moleküle undurchlässig ist, sorgen zahlreiche Transporter für den Import und Export wichtiger Metabolite (Koolman & Röhm 2003). Die Anzahl und Gestalt der Mitochondrien variiert je nach Zelltyp und Funktionszustand (Bereiter-Hahn & 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; Suelmann & Fischer 2000).

Mitochondrien besitzen ihre eigene mitochondriale DNS (Nass & Nass 1963), die in der Matrix der Mitochondrien in mehreren Kopien vorliegt ("Polyploidie"). Die humane mtDNS ist ein 16.569 bp großes zirkuläres Molekül, das aus zwei komplementären Strängen besteht ("heavy" und "light" Strang). Die mtDNS enthält keine Introns und kodiert für insgesamt 37 Gene (13 Proteine, 22 tRNSs und 2 rRNSs) (Holt *et al.* 1988; Wallace *et al.* 1988; Wallace 1992). Da sich der Code der mtDNS vom nukleären Code unterscheidet, findet die Transkription wie auch die Translation dieser Gene in der Matrix der Mitochondrien mit Hilfe der mitochondrial kodierten tRNSs und rRNSs sowie weiterer nukleär kodierter Transkriptions- und Translationsfaktoren statt (Zeviani & Di Donato 2004). Die Replikation der mitochondrialen DNS ist nicht an die Replikation der nukleären DNS in der S-Phase gekoppelt, so dass während eines Zellzyklus z.B. ein mtDNS-Molekül zweimal, ein anderes dagegen gar nicht repliziert werden kann (Scheffler 2001). Auch in Zellen, die sich nicht mehr teilen, wie z.B. in Nerven-, Muskel-, oder Herzzellen, unterliegt die mtDNS daher einem kontinuierlichen "Turn-Over". Für die Replikation von mtDNS sind wie auch bei ihrer Transkription neben den mitochondrial kodierten rRNSs weitere nukleär kodierte Proteine unabdinglich wie z.B. die DNS-Polymerase γ . Dieses Enzym ist das einzige Replikationsenzym für die mitochondriale Erbsubstanz und besteht aus zwei Untereinheiten: einer Polymerase mit hoher Prozessivität und Selektivität und einer intrinsischen 3' \rightarrow 5'-Exonuklease für simultanes "Proofreading" (Kaguni 2004).

Mitochondrien erfüllen eine Vielzahl wichtiger Funktionen, wie z.B. beim Die Lipidmetabolismus oder der Assemblierung von Eisen/Schwefel-Gruppen. Sie sind beteiligt an der Biosynthese des Häm, der Pyrimidine, der Nukleotide und der Phospholipide (Attardi & Schatz 1988). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien wichtige Aufgaben als Sensoren und Initiatoren bei der Apoptose übernehmen (Wang 2001). Die wichtigste Aufgabe der Mitochondrien ist jedoch die Synthese von Adenosintriphosphat (ATP), einem energiereichen Molekül, das die Katalyse zahlreicher biochemischer Reaktionen ermöglicht. Dies geschieht durch oxidative Phosphorylierung mit Hilfe der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Atmungskette. Diese dient als gemeinsame Endstrecke intrazellulärer Stoffwechselprozesse (Zitratzyklus, Abbau von Fettsäuren und Glykolyse) und stellt daher zusammen mit der ATP-Synthase die größte Energiequelle der Zelle dar. Die Atmungskette besteht aus vier Multienzymkomplexen (Komplex I – Komplex IV) und zwei hydrophoben, mobilen Elektronenüberträgern (Coenzym Q und Cytochrom c). Zusammen mit der ATP-Synthase, die teilweise auch als Komplex V bezeichnet wird, ist die Atmungskette in die innere Mitochondrienmembran eingelagert (Abb. 1.1).



Untereinheiten der einzelnen Komplexe sind farbig dargestellt [Quelle: (Zeviani & Carelli 2003)]

Die Komplexe I bis IV bilden als Redox-Moleküle eine Elektronentransportkette, entlang der die bei den oxidativen Stoffwechselreaktionen auf NADH, FMNH₂ und FADH₂ übertragenen Elektronen weitergereicht werden. Parallel dazu bauen die Komplexe I, III und IV einen elektrochemischen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran auf. Die Komplexe I und III transportieren dafür Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum, während der Komplex IV bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser Protonen aus der Matrix verbraucht. Das entstandene Membranpotential bildet zusammen mit dem pH-Gradienten ein elektrochemisches Potential, das von der ATP-Synthase zur Synthese des energiereichen Adenosintriphosphat (ATP) aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (Pi) genutzt wird (Saraste 1999) und (Di Donato 2000). Bis auf Komplex II der mitochondrialen Atmungskette, der ausschließlich kernkodiert ist, beinhalten alle Komplexe sowohl Kern- als auch mitochondrial kodierte Untereinheiten (Stryer 1999). Die Biosynthese der mitochondrialen Atmungskette erfordert daher eine Kooperation von nukleärem und mitochondrialem Genom, da nur eine ausgeglichene Expression beider Genome eine korrekte Assemblierung der Atmungsketten-Komplexe gewährleistet.

Komplex I der Elektronentransportkette ist die NADH-Dehydrogenase, ein 940 kDa großer Enzymkomplex aus sieben mitochondrial kodierten Untereinheiten (ND1-ND6 und ND4L) und mind. 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 FADH2 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 (F0F1-ATP-Synthase) setzt sich aus zwei mitochondrial kodierten Untereinheiten (ATPase6 und ATPase8) und mind. 13 kernkodierten Untereinheiten zusammen. Ein Teil der ATP-Synthase (F0-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 Pi gekoppelt (Saraste 1999; Di Donato 2000).

Während der oxidativen Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran entweicht auch unter physiologischen Bedingungen ein Teil der Elektronen aus der Elektronentransportkette. Dabei gelten die Komplexe I und III als Hauptorte der Elektronenfreisetzung (St Pierre et al. 2002; Hansford et al. 1997). Diese Elektronen können dann 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). Die Mitochondrien gelten daher als Hauptquelle für die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Dalton et al. 1999).

Neben den Mitochondrien gibt es jedoch noch weitere Quellen für die Entstehung von ROS (Übersicht in (Beckman & Ames 1998b)). So entsteht z.B. bei der β-Oxidation der Fettsäuren in den Peroxisomen als Nebenprodukt H₂O₂ (Ockner et al. 1993). Weiterhin existiert im Cytosol eine Gruppe von Enzymen, die so genannten Cytochrom-P450-Enzyme, deren Aufgabe es ist, durch Reduktion oder Oxidation körperfremde Substanzen abzubauen. Einige dieser P450-Enzyme reduzieren jedoch auch direkt molekularen Sauerstoff O₂ zu O₂⁻ (Koop 1992). Es konnte gezeigt werden, dass in Rattenleber Cytochrom-P450-Oxidasen signifikant zur zellulären Gesamtproduktion von ROS beitragen (Bondy & Naderi 1994). Eine weiter enzymatische Reaktion bei der H₂O₂ entsteht, ist die Oxidation von Lysinseitenketten durch die Lysyloxidase (LOX). Eine wesentliche Aufgabe dieses Enzyms ist die Stabilisierung der extrazellulären Matrix durch Quervernetzung von Kollagen- und Elastinfasern (Lucero & Kagan 2006). Auch bei der Reaktion von Monoamino-Oxidasen kommt es zur Bildung von H₂O₂. Diese mitochondrialen Enzyme bauen Monoamine durch Desaminierung mit Hilfe von H₂O und O₂ zu den entsprechenden Aldehyden, Ammoniak und H₂O₂ ab. Als letztes Beispiel eines ROS produzierenden Enzyms sei die Acyl-CoA Oxidase genannt, die Elektronen direkt auf Sauerstoff transferiert, so dass ebenfalls H₂O₂ entsteht (Keller et al. 1993).

Die entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies haben für die Zelle verschiedene Bedeutungen. Auf der einen Seite erfüllen sie physiologische Aufgaben, indem sie als Signalmoleküle eine Vielzahl zellulärer Funktionen beeinflussen (Übersicht in (Allen & Tresini 2000)). Sie spielen z.B. eine Rolle bei der zellulären Genexpression, da sie an der Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. Weiterhin regulieren und beeinflussen sie das zelluläre Redox-Gleichgewicht und nehmen so Einfluss auf protektive Strategien der Zelle. Auf der anderen Seite besitzen ROS als hochreaktive Moleküle ein großes Potential, um die Zelle zu schädigen. Als zelluläre Noxen verursachen sie verschiedene oxidative Modifikationen zellulärer Bestandteile. Sowohl Proteine und Lipide als auch Nukleinsäuren können geschädigt werden, so dass vielfältige Störungen zellulärer Funktionen entstehen. Es kommt z.B. zur Peroxidation von Lipiden zellulärer Membranen, zu Einzel-Strang-DNS-Brüchen, zu DNS-Protein-Verknüpfungen oder zum Verlust von Sulfhydrylgruppen in Proteinen (Yaar & Gilchrest 2003).

Um zelluläre Bestandteile vor dem schädigenden Potential reaktiver Sauerstoffspezies zu schützen, existieren in der Zelle sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Schutzsysteme, die für die Regulation des Redox-Gleichgewichts der Zelle unerlässlich sind. Als enzymatische Schutzsysteme dienen der Zelle mehrere antioxidative Enzyme, die an der intrazellulären Abwehr von oxidativem Stress beteiligt sind (Heffner & Repine 1989). Die Superoxiddismutase (SOD) beispielsweise katalysiert die Disproportionierung von Superoxid (McCord & Fridovich 1969):

$2 \operatorname{O}_2 \bullet^- + 2 \operatorname{H}^+ \to \operatorname{H}_2 \operatorname{O}_2 + \operatorname{O}_2$

Das bei dieser Reaktion entstehende H_2O_2 wird von der Katalase (CAT) und der Glutathionperoxidase (GPX) weiter detoxifiziert. Die Katalase katalysiert die Disproportionierung von H_2O_2 zu H_2O und O_2 :

$2 \; \mathrm{H_2O_2} \rightarrow 2\mathrm{H_2O} + \mathrm{O_2}$

während die Glutathionperoxidase die Reduktion von H_2O_2 katalysiert (Koolman & Röhm 2003). Wie in Abb. 1.2 gezeigt, bildet die Glutathionperoxidase zusammen mit der Glutathion-Reduktase (GR) den so genannten 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.



Als nicht enzymatische Schutzsysteme in der Zelle fungieren antioxidative Substanzen wie z.B. Vitamin C oder Vitamin E. Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein wasserlöslicher Radikalfänger, der OH• und andere Radikale detoxifizieren kann (Abb. 1.3).



Vitamin E (α -Tocopherol) dagegen ist ein lipophiles Antioxidanz, das ungesättigte Membranlipide vor der Oxidation schützen kann (Stryer 1999).

Unter physiologischen Bedingungen sollten die enzymatischen und nicht-enzymatischen Schutzmechanismen der Zelle ein Gleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Prozessen aufrechterhalten. Dieses Gleichgewicht kann jedoch sowohl von endogenen als auch von exogenen Einflüssen gestört werden, was bei einem Überfluss an Oxidanzien zu oxidativem Stress in der Zelle führen kann.

1.2 Die Bedeutung von oxidativem Stress und mtDNS-Mutationen für Alterungsprozesse

Die Untersuchung von Alterungsprozessen ist in der internationalen Forschung immer wichtiger geworden. Die hohe Relevanz dieses Forschungsschwerpunktes liegt in der demographischen Entwicklung der Gesamtbevölkerung begründet. Die durchschnittliche Lebenserwartung des Menschen ist im vergangenen Jahrhundert immer weiter gestiegen, so dass der Anteil alter Menschen in der Gesamtpopulation immer weiter zunimmt (Krämer & Schikowski 2006). Diese Entwicklung macht nicht nur eine therapeutische, sondern auch eine präventive Intervention im Alterungsprozess und alterungsassoziierten pathologischen Veränderungen unerlässlich.

Vorraussetzung für eine erfolgreiche Intervention und die Entwicklung präventiver Maßnahmen ist eine genaue Analyse der dem Alterungsprozess zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Bei der Analyse dieser Mechanismen ist die Bedeutung von ROS für das Altern ein wichtiger Aspekt. Die Beteiligung von oxidativem Stress in Alterungsprozessen konnte bereits mehrfach bestätigt werden (Beckman & Ames 1998a; Finkel & Holbrook 2000). ROS sind, wie bereits erläutert, als Signalmoleküle aber auch als zelluläre Noxe für die Zelle von großer Bedeutung. Die mitochondriale Theorie des Alterns geht davon aus, dass letztlich eine Akkumulation zumeist oxidativer Schäden in der DNS der Mitochondrien Grundlage des Alterns ist (Harman 1956). Im Vergleich zur nukleären DNS besitzt die mitochondriale DNS eine mehr als 10-fach höhere Mutationsrate (Wallace 1994; Wallace 1995; Brown et al. 1979), was vor allem durch ihre unmittelbare Nachbarschaft zur Atmungskette der Mitochondrien erklärbar ist (Sastre et al. 2000). Dieser Effekt wird durch fehlende Histone an der mitochondrialen DNS weiter verstärkt (Shigenaga et al. 1994). Außerdem können in der mtDNS entstandene Schäden nur durch ein eingeschränktes Reparatursystem repariert werden, da in den Mitochondrien keine Enzyme zur Nukleotid-Exzisions-Reparatur vorhanden sind. Durch Mutationen der mtDNS, insbesondere durch Proteinen Deletionen, gehen Informationen für die Expression der von Atmungskettenkomplexe verloren. Daher können als Folge von mtDNS-Mutationen defekte Atmungsketten an der inneren Mitochondrienmembran entstehen. Diese können wiederum eine vermehrte Elektronen-Freisetzung und somit die Bildung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies bewirken. Es wird postuliert, dass diese ROS wiederum Schäden an der

mtDNS verursachen wodurch sich dieser Vorgang intern im Sinne eines positiven Rückkopplungskreises ("Teufelskreis") immer weiter verstärkt (Berneburg *et al.* 1999b).

Die von der mitochondrialen Theorie des Alterns postulierte Bedeutung von mtDNS-Mutationen im Alterungsprozess wird bereits durch mehrere Befunde unterstützt. Es ist z.B. bekannt, dass mtDNS-Mutationen in gealtertem Gewebe angereichert sind, was darauf hinweist, dass das Vorkommen von mtDNS-Mutationen für den Alterungsprozess von Bedeutung ist (Cortopassi & Arnheim 1990; Chen et al. 1995; Simonetti et al. 1992). Der maximale Gehalt mutierter mtDNS-Moleküle beträgt in der Regel unter 1%, obwohl z.B. im gealterten Gehirn auch 10% bis 14% gefunden wurden (Corral-Debrinski et al. 1992) und (Cortopassi et al. 1992). Ein assoziativer Zusammenhang zwischen mtDNS-Mutagenese und Alterungsprozessen konnte auch experimentell mit Hilfe von Mausmodellen bestätigt werden (Trifunovic et al. 2004; Kujoth et al. 2005). Mäuse, die eine "proof-reading"-defiziente mtDNS-Polymerase exprimierten, besaßen mehr mtDNS-Mutationen und eine verkürzte Lebensspanne. Auch konnten bei diesen Mäusen frühzeitig Alterungsphänomene beobachtet werden wie z.B. Gewichtsverlust, Haarausfall, Osteoporose oder Herzvergrößerungen. Nicht zuletzt wird die von der mitochondriale Theorie des Alterns postulierte Bedeutung von mtDNS-Mutationen auch durch so genannte "mitochondriale Erkrankungen" gestützt. Diese Krankheitsbilder sind auf Mutationen der mtDNS zurückzuführen und zeigen phänotypisch unter anderem verschiedene mit dem Altern assoziierte Symptome wie Muskelschwäche, neurologische Probleme, Demenz, Herzprobleme oder sensineurale Probleme (Taubheit, Blindheit) (Zeviani & Di Donato 2004).

Für die von der mitochondrialen Theorie des Alterns postulierte Bedeutung von ROS im Alterungsprozess gibt es ebenfalls bereits mehrere Hinweise. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Akkumulierung von oxidativen Schäden mit Alterungsprozessen assoziiert ist (Miwa & Brand 2003). Weiterhin wurde die Beteiligung von ROS im Alterungsprozess experimentell durch Beobachtungen gestützt, die zeigten, dass die Inkubation von Zellen mit moderaten, subletalen H₂O₂-Konzentrationen zu Seneszenz-ähnlichen Phänotypen führte (Chen & Ames 1994). Analog dazu verlängerte sich auch die zelluläre Lebensspanne von dermalen Fibroblasten *in vitro*, wenn diese unter niedrigen Sauerstoff-Bedingungen kultiviert wurden (Packer & Fuehr 1977). Auch die Lebenserwartung von Mäusen, die eine in die Mitochondrien gerichtete Katalase überexprimierten, nahm zu (Schriner *et al.* 2005).

Der mitochondrialen Theorie des Alterns entsprechend spielen daher Untersuchungen zum Kausalzusammenhang zwischen mtDNS-Mutationen, oxidativem Stress und Alterungsprozessen eine zentrale Rolle in der molekularen Alternsforschung. Obwohl bereits mehrere Studien die Bedeutung von mtDNS-Mutationen und oxidativem Stress für verschiedene Alterungsphänomene zeigen konnten, sind die mechanistischen Grundlagen dieses Zusammenhangs noch nicht geklärt.

1.3 Mitochondriale Erkrankungen - das Kearns-Sayre-Syndrom

Der Begriff "mitochondriale Erkrankung" bezeichnet die klinischen Symptome, die mit Störungen der oxidativen Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran assoziiert sind. Diese werden meistens durch Mutationen der mtDNS verursacht (Zeviani & Di Donato 2004). 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 (DiMauro & Schon 2003; Zeviani & Carelli 2003).

Außer den stark Energie verbrauchenden Muskeln und Nerven nutzen auch alle anderen Gewebe des Körpers die oxidative Phosphorylierung, so dass die Symptome mitochondrialer Erkrankungen extrem heterogen sind und letztlich alle Organe bzw. Gewebe betreffen können (Munnich et al. 1992). Die verschiedenen Phänotypen der mit Mutationen der mtDNS assoziierten Krankheiten werden durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst. Es spielen z.B. die Art der Mutation, der Anteil mutationstragender mtDNS-Moleküle und die von der Mutation betroffenen Gene eine Rolle. Aber auch die Verteilung der mutationstragenden Moleküle in den verschiedenen von der mitochondrialen Energieversorgung unterschiedlich stark abhängigen Geweben ist von Bedeutung (Zeviani & Di Donato 2004). Außerdem kann eine bestimmte Mutation vor unterschiedlichem mitochondrialen und nukleären Hintergrund verschiedene Auswirkungen haben. Direkte molekulare bzw. zelluläre Mechanismen, die eine gegebene mitochondriale Mutation mit einem bestimmten klinischen Phänotyp verknüpfen, sind daher noch weitestgehend unbekannt (Zeviani & Carelli 2003; Rotig et al. 1995). Man geht jedoch davon aus, dass bei Deletionen der mtDNS die Anzahl deletierter Moleküle einen wesentlich größeren Einfluss auf die klinischen Symptome hat als Größe oder Position der Deletion (Zeviani et al. 1988).

Ein wichtiges Merkmal mitochondrialer Erkrankungen, die auf Mutationen der mtDNS zurückzuführen sind, ist die Heteroplasmie (Kleinle *et al.* 1997; Rotig *et al.* 1990). Heteroplasmie bedeutet, dass der mitochondriale Genotyp aus zwei oder mehr verschiedenen mtDNS-Molekülen zusammengesetzt ist, d.h. "full-lenght"-mtDNS und deletierte mtDNS-Moleküle ko-existieren nebeneinander. Es wird vermutet, dass ein Schwellenwert die phänotypische Expression beeinflusst (Jenuth *et al.* 1997). Ab einem bestimmten Anteil mutierter mtDNS-Moleküle können die mit der Mutation assoziierten Defekte nicht mehr von der ko-existierenden Wildtyp mtDNS komplimentiert werden (Thorburn & Dahl 2001). Die

Höhe des Schwellenwerts liegt dabei vermutlich zwischen 50% und 90% (Wallace 1994), (Poulton 1992) und (Chomyn *et al.* 1991), was sich signifikant von dem in gealterten Geweben gefundenen Anteil mutierter mtDNS von unter 1% unterscheidet (Cortopassi *et al.* 1992).

Die mit mitochondrialen Erkrankungen assoziierten Mutationen der mtDNS können in "large scale rearrangements" und Punkt-Mutationen unterteilt werden. Während die "large scale rearrangements" meistens sporadisch auftreten und vermutlich auf somatische Mutationen in einem frühen Entwicklungsstadium zurückzuführen sind, werden die meisten Punkt-Mutationen maternal vererbt (Puoti *et al.* 2003). Eine häufige Form der "large scale rearrangements" sind die mtDNS-Deletionen, die in Größe (1,3 kb - 8 kb) und Position variieren. Die Position wird oft durch "direct repeats" an den Bruchstellen bestimmt (Johns *et al.* 1989). Durch die Deletionen können jeweils mehrere Gene sowohl für Proteine der Atmungskette als auch für mitochondriale tRNSs und rRNSs verloren gehen. Eine besonders häufig auftretende mtDNS-Deletion, die auch als repräsentativer Biomarker für die Integrität des mitochondrialen Genoms gilt, ist die in Abb. 1.4 dargestellte Common Deletion (Schon *et al.* 1989; Shoffner *et al.* 1989; Porteous *et al.* 1998), die mittels Real-Time-PCR quantifizierbar ist (Koch *et al.* 2001).



Diese 4977 bp große Deletion entsteht zwischen zwei "direct repeats" von 8469 bp bis 13447 bp. Es kommt zu einem Verlust von mehreren Genen, die für Proteine der oxidativen Phosphorylierung und mitochondriale tRNSs kodieren (4 Proteine des Komplex I der Atmungskette, 1 Protein des Komplex IV, zwei Proteine des Komplex V und fünf tRNSs). 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). Dies sind die chronisch progressive externe Ophthalmoplegie (CPEO), das Pearson Syndrom (PS) und das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS).

Bei der chronisch progressiven externen Ophthalmolegie kommt es zu einer Lähmung der Augenmuskulatur ("Ptosis") und teilweise auch zu Problemen der Herzmuskulatur. Diese Krankheit beginnt erst relativ spät im Alter von 15-40 Jahren und ist dann mit einer progredienten Verschlimmerung der Symptomatik verbunden (Zeviani & Di Donato 2004).

Das Pearson Syndrom ist eine seltene pädiatrische Multiorganerkrankung, die bereits im Säuglingsalter einsetzt (Kleinle *et al.* 1997; Rotig *et al.* 1995; Rotig *et al.* 1990) und meistens vor dem dritten Lebensjahr zum Tod der Patienten führt (Simonsz *et al.* 1992). Gekennzeichnet ist diese Krankheit vor allem durch eine sideroblastische Anämie und eine exokrine Pankreasinsuffizienz.

Das Kearns-Sayre-Syndrom ist ebenfalls eine progressive Multiorganerkrankung, die vorwiegend post-mitotische Gewebe wie z.B. das Nervensystem, das Herz oder die Skelettmuskulatur betrifft (Puoti et al. 2003). Als Leitsymptome gelten die ebenfalls bei der **CPEO** beobachtete Lähmung der äußeren Augenmuskulatur ("Ptosis") sowie 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). Es wurde bereits mehrfach beobachtet, dass Kinder, die im Säuglingsalter am Pearson Syndrom erkrankten, im Laufe der Kindheit eine andere Symptomatik entwickelten, die dann dem KSS zugeordnet wurde (Simonsz et al. 1992; Rotig et al. 1995). Obwohl dieselben "large scale rearrangements", wie z.B. 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 (Holt et al. 1989).

Eine ursächliche Therapie mitochondrial assoziierten Krankheiten ist noch nicht bekannt. Es gibt allerdings eine Reihe unterstützender Maßnahmen, wie Nahrungssupplementierung, operative Korrigierung von Ptosis, Behandlung von Krämpfen oder Laktat-Azidose (Zeviani & Di Donato 2004), die Symptome mitochondrialen Erkrankungen lindern können.

1.4 Haut

Die menschliche Haut ist mit einer Oberfläche von 1,5 m² bis 2 m² eines der größten Organe des Menschen (Jung 1998). Neben Atem- und Stoffwechselfunktion erfüllt sie als äußerste Hülle des menschlichen Körpers auch eine wichtige Schutzfunktion gegenüber diversen Umwelteinflüssen.

Die Haut ist morphologisch in verschiedene übereinander gelagerte Zellschichten unterteilt, die Subcutis (Unterhaut), die bindegewebsartige Dermis (Lederhaut) und die Epidermis (Oberhaut) (Abb. 1.5).



Die unterste Hautschicht ist die Subcutis, in der Fettzellen in ein lockeres Bindegewebe eingelagert sind. Dieses so genannte Unterhautfettgewebe dient sowohl als Energiespeicher der Haut als auch der Wärmeisolierung (Faller & Schünke 1999).

Über dem Unterhautfettgewebe liegt die Dermis, die für Elastizität, Geschmeidigkeit und Dehnbarkeit der Haut verantwortlich ist (Chu *et al.* 2003). Die Dermis schützt die Haut vor mechanischer Verletzung, bindet Wasser, hilft bei der Thermo-Regulierung und beinhaltet Rezeptoren für sensorische Reize. Kollagene und elastische Fasern sind hier netzartig zum stützenden Bindegewebe der Haut verwoben. In dieses sind sowohl Blut-, Lymphgefäße und Nervenfasern als auch Bindegewebszellen und Zellen des Immunsystems eingebettet (Faller & Schünke 1999). Die extrazelluläre Matrix des Bindegewebes ist eine hoch dynamische Struktur, die sowohl mechanisch als auch in ihrer synthetischen Zusammensetzung auf ihre Umgebung reagieren kann (Sorrell & Caplan 2004).

Die von den Fibroblasten synthetisierten Kollagene sind die wichtigsten Strukturproteine in der extrazellulären Matrix (Heckmann 1999) und bilden mit ca. 75% die Hauptkomponente der Dermis (Burgeson & Nimni 1992). Von den heute mehr als 20 verschiedenen Kollagen-Typen ist Kollagen Typ 1 mit 80% – 90% das am häufigsten vorkommende Kollagen (Chu *et al.* 2003). Charakteristisch für die Kollagene ist eine Tripelhelix, die jeweils aus drei Polypeptidketten (α -Ketten) aufgebaut ist. Diese besitzen eine typische repetitive Aminosäure-Sequenz (Glycin-X-Y mit X = meist Prolin und Y = meist Hydroxyprolin), die für die Stabilität der Tripelhelix entscheidend ist (Heckmann 1999). Nach Sekretion der Kollagene in den extrazellulären Raum orientieren sich die Moleküle in verschiedenen Mustern. Eine Quervernetzung zwischen den Kollagenfasern bietet die nötige Stabilität der extrazellulären Matrix.

Die Hauptzellpopulation der Dermis bilden die langlebigen Fibroblasten, die in der extrazellulären Matrix verankert sind (Chu et al. 2003). Die Hauptaufgabe dieser Zellen ist die Synthese, Organisation und Degradation der extrazellulären Matrix. Sie synthetisieren sowohl Strukturproteine wie Kollagen, Elastin, Fibronektin und Laminin als auch Grundsubstanzen wie z.B. Proteoglykane (Heckmann 1999). 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 (MMPs) bezeichnet (Heckmann 1999). Weiterhin spielen die Fibroblasten eine wichtige Rolle bei der Integration von extrazellulären Signalen über zellmembranständige Rezeptoren. Diese so genannten Integrine ermöglichen eine Regulation der Syntheseleistung der Fibroblasten durch die Zusammensetzung und Dichte von Bindegewebsproteinen der extrazellulären Matrix (Heckmann 1999). Für eine regulierte Produktion, Organisation und Degradation der extrazellulären Matrix kommunizieren die Fibroblasten sowohl untereinander und mit anderen Zell-Typen der Haut (z.B. mit Keratinozyten aus der Epidermis) als auch mit der extrazellulären Matrix selbst in reziproker Art und Weise. 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 (Jordana et al. 1994). Fokale Adhäsionspunkte an der Membran der Fibroblasten ermöglichen eine Kommunikation zwischen dem Zytoskelett der Zellen, transmembranen Proteinen wie den Integrinen und Proteinen der extrazellulären Matrix wie Fibronektin, Thrombospondin, Laminin oder Kollagen.

Außer den Fibroblasten sind noch Makrophagen, Mastzellen und im Rahmen einer Immunantwort auch Lymphozyten oder Leukozyten in der Dermis der Haut zu finden (Chu et

al. 2003). Makrophagen sind immunologisch aktive Zellen, die abgestorbene Zellen sowie anfallende Abbaustoffe wie Melanin, Fette oder Proteine phagozytieren (Heckmann 1999). Die in der gesamten Dermis verstreuten Mastzellen vermitteln allergische und entzündliche Reaktionen, wofür sie unter anderem Histamin enthalten (Heckmann 1999).

Über der Dermis befindet sich die Basalmembran der Haut, die die Epidermis mit der Dermis verankert (Burgeson & Christiano 1997).

Die über der Basalmembran liegende äußerste Hautschicht ist die Epidermis, ein mehrschichtiges Plattenepithel, das sich kontinuierlich erneuert (Chu et al. 2003). Hier bilden die Keratinozyten mit mind. 80% die Hauptzellpopulation. Die Keratinozyten besitzen nur eine relativ kurze Lebensdauer von durchschnittlich 50 Tagen (Jung 1998). In dieser Zeit wandern sie von der innersten epidermalen Schicht immer weiter nach außen, wo sie schließlich in Form von Hornschuppen abgestoßen werden ("Keratinisation") (Faller & Schünke 1999). Während dieses Vorgangs findet eine Differenzierung der Keratinozyten statt, so dass die Epidermis je nach Differenzierungsgrad der Keratinozyten in verschiedene Zellschichten unterteilt wird (Chu et al. 2003). Die innerste epidermale Schicht ist die so genannte Basalschicht ("Stratum basale"). Hier teilen sich die Keratinozyten kontinuierlich. Jeweils eine der entstehenden Tochterzellen wandert zur Oberfläche der Haut, während die andere in der Basalschicht verbleibt. An die Basalschicht schließt die so genannte Stachelzellschicht ("stratum spinosum") an, die ihren Namen der Stachel-artigen Form der Keratinozyten verdankt. Über der Stachelzellschicht liegt die so genannte Körnerschicht ("stratum granulosum") in der bereits die Apoptose der Keratinozyten eingeleitet wird. Die letzte äußerste Zellschicht der Epidermis ist das Stratum Corneum ("Hornschicht"), das aus fest gepackten kernlosen Zellen besteht. Diese Schicht bietet der Haut einen mechanischen Schutz gegenüber der Umwelt und stellt eine Barriere gegen Wasserverlust oder das Eindringen von löslichen Umweltsubstanzen dar (Nemes & Steinert 1999).

Außer den Keratinozyten sind in der Epidermis noch Merkel-Zellen, Melanozyten und Langerhans-Zellen vertreten (Chu *et al.* 2003). Die Merkel-Zellen fungieren als Mechanorezeptoren und sind daher vorwiegend an empfindlichen Hautstellen wie z.B. an den Fingerspitzen zu finden (Faller & Schünke 1999). Die Melanozyten sind die Pigmentzellen der Haut, die Melanin-Pigmente synthetisieren, die als Melanosomen an die umgebenden Keratinozyten abgegeben werden (Faller & Schünke 1999). Die Langerhans-Zellen gehören zum Immunsystem der Haut, wo ihre Hauptaufgabe darin besteht, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und T-Zellen zu präsentieren (Faller & Schünke 1999).

1.5 Hautalterung

Wie jedes Organ des menschlichen Körpers unterliegt auch die Haut einem kontinuierlichen genetisch bedingten Alterungsprozess, dem vielfältige molekulare Mechanismen zugrunde liegen. Im Gegensatz zu anderen Organen ist die Haut als äußerste Schutzhülle des Körpers zusätzlich einer Vielzahl von exogenen Umwelteinflüssen ausgesetzt, die ebenfalls zum Alterungsprozess der Haut beitragen können. Man unterscheidet daher zwischen genetisch bedingter intrinsischer Hautalterung und durch exogene Noxen verursachter extrinsischer Hautalterung (Krutmann & Diepgen 2003). Dabei ist vor allem das ultraviolette Licht des Sonnenspektrums eine wichtige Noxe, die eine vorzeitige Alterung der Haut verursachen kann ("Lichtalterung") (Yaar & Gilchrest 2003). Die Prozesse der intrinsischen und extrinsischen Hautalterung laufen parallel ab und sind morphologisch oftmals nicht eindeutig voneinander zu trennen. Dennoch weisen die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen durchaus Unterschiede auf (Berneburg *et al.* 1999a).

Zur Untersuchung von Alterungsprozessen stellt die Haut ein ausgesprochenes gutes Modellsystem dar, da bereits äußerlich deutliche Zeichen von Hautalterung erkennbar sind (Krämer & Schikowski 2006). Makroskopisch sichtbare Alterungserscheinungen sind z.B. Falten oder Pigmentflecken, die leicht mittels bildgebender Verfahren dokumentiert werden können. Gealterte Haut erscheint dünner und schlaffer als junge Haut und leichter verwundbar (Krämer & Schikowski 2006). Trockenheit und Rauheit sind weitere charakteristische Merkmale gealterter Haut (Yaar & Gilchrest 2003). Die sensorische Wahrnehmung der Haut 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 6 Tage, bei jungen Erwachsenen nur 3 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 & Gilchrest 2003).

Zusätzlich zu diesen klinisch und histologisch sichtbaren Alterungserscheinungen sind auch verschiedene molekulare Biomarker bekannt, deren Veränderung ein Altern der Haut kennzeichnet. Eine Abnahme des Kollagengehalts z.B. ist im Bindegewebe 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 (Sell et al. 1996; Gerstein et al. 1993). Die Abnahme des Kollagengehalts ist zum einen auf eine verminderte Kollagenneusynthese, zum anderen auf einen verstärkten Kollagenabbau zurückzuführen (Yaar & 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 (Yaar & Gilchrest 2003) verursacht den verstärkten Abbau der extrazellulären Matrix. Dies wiederum trägt zu den bereits erläuterten klinisch und histologisch sichtbaren Veränderungen bei, die für die gealterte Haut charakteristisch sind (Krutmann & Diepgen 2003). Im Zusammenhang mit der Familie der MMPs ist es wichtig, auch die Regulation der für diese Enzymgruppe spezifischen Inhibitoren, der so genannten "tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinases" (TIMPs) zu berücksichtigen. Verstärkend zur Regulation der MMPs im Alterungsprozess konnte eine Abregulierung der TIMPs beobachtet werden (Khorramizadeh et al. 1999). Als weiterer zellulärer Biomarker im Prozess der Alterung gilt die Integrität des mitochondrialen Genoms. Es ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass gealterte Haut im Vergleich zu junger Haut einen erhöhten Anteil an Mutationen im mitochondrialen Genom aufweist (Yang et al. 1994). Auch eine Akkumulation oxidierter Proteine im Alterungsprozess ist bereits beobachtet worden, die unter anderem auf eine Abnahme der Proteasom-Aktivität zurückzuführen ist (Sander et al. 2002; Widmer et al. 2006).

1.6 Hautäquivalentmodelle als *in vitro*-Modelle der dermatologischen Forschung

Der Einsatz dreidimensionaler, organotypischer Kulturen zur Untersuchung gewebsspezifischer Eigenschaften hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen (Schmeichel & Bissell 2003). So genannte Hautäquivalentmodelle waren einige der ersten Beispiele für die Verwendung organotypischer Kulturen (Bell et al. 1979; Bell et al. 1983; Asselineau & Prunieras 1984a). Neben einem grundsätzlichen Verständnis der biologischen Funktionen der Haut ermöglichen diese Hautäquivalentmodelle das Testen von Oberflächensubstanzen und stellen zusätzlich eine Quelle für Hautersatz dar (Sorrell & Caplan 2004). Im Gegensatz zu Zellkulturen humaner Hautzellen, die als Monolayer kultiviert werden, stellen Hautäquivalentmodelle ein hervorragendes dreidimensionales Homolog zur Humanhaut dar. Somit entsteht eine attraktive Alternative zu Tiermodellen oder mit ethischen Limitationen verbundenen Untersuchungen an menschlicher Haut in vivo. Zusätzlich können humane Hautäquivalente durch die Verwendung genetisch veränderter Zellen modifiziert werden, wodurch eine Vielzahl weiterer Untersuchungsmöglichkeiten entsteht (Arnaudeau-Begard et al. 2003; Bernerd et al. 2001; Bernerd et al. 2005).

Für eine Hautrekonstruktion *in vitro* wird zunächst die Dermis der Haut nachgebildet, indem dermale humane Fibroblasten in ein Typ I Kollagengel eingesät werden. Auf diese dermale Rekonstruktion können in einem zweiten Schritt humane epidermale Keratinozyten aufgebracht werden, die durch Proliferation und Differenzierung an der Luft-Flüssigkeitsgrenze die epidermale Schicht des Vollhautäquivalentmodells bilden (Asselineau & Prunieras 1984b) Abb. 1.6 zeigt einen Querschnitt durch normale menschliche Haut und einen Querschnitt durch ein Vollhaut-Äquivalentmodell, in denen deutlich das dermale und das epidermale Kompartiment der Haut zu erkennen sind (Duval *et al.* 2003).



Querschnitt [Quelle: (Duval et al. 2003)]

Für molekulare oder biochemische Untersuchungen von dermalen Fibroblasten wird anstelle eines Vollhautäquivalentmodells oftmals ein dermales Äquivalentmodell verwendet, das nur 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.

Bei der Synthese dermaler Hautäquivalente unterscheidet man zwischen "nicht kontrahierenden" und "kontrahierenden" Äquivalenten (Übersicht in (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.

Bei den kontrahierenden Äquivalenten dagegen ist das Kollagengel nicht an der Zellkulturschale fixiert. Es kommt zu einem Umbau der Kollagenfasern durch die eingesäten Fibroblasten, der zu einer Verringerung des Durchmessers des Kollagengels führt. Dieser als "Kontraktion" bezeichnete Vorgang entspricht einem umfassenden Matrixumbau bei dem durch Interaktion mit den Fibroblasten eine dichtere Anordnung der Kollagenfasern entsteht (Bell *et al.* 1979). Auch wenn die genauen Mechanismen, die diesem Prozess zugrunde liegen noch nicht vollständig geklärt sind, gibt es bereits eine Vielzahl von Hinweisen, die die Bedeutung verschiedener zellulärer Bestandteile während der Kontraktion darlegen. Es

konnte z.B. gezeigt werden, dass ROS für den Kontraktionsprozess von Bedeutung sind, da diese die Kontraktion eines dreidimensionalen Kollagengels durch mesangiale Zellen der Niere stimulieren (Zent *et al.* 1999).

Auch die Matrix degradierenden MMPs sind für den Umbau des dreidimensionalen Kollagengels während der Kontraktion unerlässlich. Eine Inhibition dieser Enzymgruppe verhindert die Kontraktion des Kollagengels (Scott *et al.* 1998).

Eine weitere wichtige Rolle beim Matrixumbau während der Kontraktion dreidimensionaler Hautäquivalentmodelle spielen die Integrine als Oberflächenrezeptoren der Fibroblasten. Integrine bilden die Hauptklasse der Membranrezeptoren der eingesäten Fibroblasten und ermöglichen einen Dialog zwischen den Zellen und der extrazellulären Matrix (Übersicht in (Hynes 1992)). Sie bilden eine Familie aus mind. 21 verschiedenen heterodimeren transmembranen Oberflächenrezeptoren, die jeweils aus einer α- und einer β-Untereinheit bestehen. Beide Untereinheiten besitzen eine große extrazelluläre Domäne, eine Membrandurchspannende Domäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne. Die extrazellulären Domänen der beiden Untereinheiten bilden zusammen die Bindestelle für extrazelluläre Matrixproteine, während die zytoplasmatischen Domänen über die Bindung intrazellulärer Proteine wie Talin, Vinkulin oder α-Aktinin mit dem Aktin-Zytoskelett der Fibroblasten interagieren. Die transmembrane Form der Integrinrezeptoren ermöglicht somit eine Verbindung zwischen externen Kollagenfasern und dem internen Zytoskelett der Fibroblasten. Auf diese Weise können Informationen über die Umgebung, die für eine Kontraktion wichtig sind, in die Zelle transportiert werden (Langholz et al. 1995). Es konnte bereits gezeigt werden, dass für die Kontraktion eines dreidimensionalen Typ I Kollagen-Gels die $\alpha 2\beta$ 1-Integrine wichtig sind (Klein *et al.* 1991; Jenkins *et al.* 1999).

Die Lysyloxidase (LOX) ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung für den Kontraktionsprozess, da eine Inhibition dieses Enzyms eine Kontraktion verlangsamt (Woodley *et al.* 1991). *In vivo* wird die LOX von den dermalen Fibroblasten der Haut synthetisiert und in die umgebende extrazelluläre Matrix sezerniert, wo sie die Quervernetzung von Kollagen- und Elastinfasern initiiert (Lucero & Kagan 2006). Durch die LOX-katalysierte oxidative Deaminierung von Lysin- und Hydroxylysin-Seitenketten der Kollagene oder Elastine entstehen zunächst reaktive Aldehyde, die anschließend Kondensationsprodukte bilden, so dass es zu intra- und intermolekularen Verknüpfungen der Kollagen- bzw. Elastinketten kommt. Die Cu²⁺-abhängige LOX trägt somit entscheidend zur Stabilität der extrazellulären Matrix durch Quervernetzung von Kollagen- und Elastinfasern bei. Die essentielle physiologische Bedeutung die LOX zukommt, wurde vor allem durch die

Generierung von LOX-defizienten Mäusen sowie durch Applikation des spezifischen Inhibitors BAPN ersichtlich. Zu den phänotypischen Manifestationen gehören vor allem Deformierung der Knochen, Dislokation der Gelenke, Strukturschwäche von Knorpel und Haut sowie Ruptur von Blutgefäßen (Maki *et al.* 2005). Dagegen ist eine erhöhte LOX-Aktivität mit fibrotischen Veränderungen in Organen wie Leber, Niere und Lunge assoziiert (Counts *et al.* 1981) und konnte auch in Sklerodermie-Patienten nachgewiesen werden. Auch bei der Wundheilung ist LOX von Bedeutung, wie mit Hilfe von Experimenten an Rattenhaut beobachtet werde konnte (Fushida-Takemura *et al.* 1996).

Die Expression von LOX wird durch die Transkriptionsfaktoren TGF- β 1 ("transforming growth factor β 1") oder Hif1 ("hypoxia inducible factor 1") reguliert. Hif1, der für die zelluläre Genregulation unter hypoxischen Bedingungen bzw. bei oxidativem Stress von Bedeutung ist (Erler *et al.* 2006), besteht aus einer Sauerstoff-sensitiven Hif1 α - und einer konstitutiv aktiven Hif1 β -Untereinheit. Es ist bereits bekannt, dass Hif1 durch mitochondriale reaktive Sauerstoffspezies stabilisiert wird (Sanjuan-Pla *et al.* 2005). Diese verhindern den Abbau der sensiblen α -Untereinheit, so dass diese akkumulieren kann und eine Bildung des heterodimeren Hif1-Komplex möglich ist.

Dem Fibroblasten vermittelten Umbau eines dreidimensionalen Kollagengels während der Synthese eines kontrahierenden dermalen Hautäquivalents liegt demnach ein Zusammenspiel verschiedener zellulärer Komponenten zugrunde, die eine erfolgreiche Kontraktion entscheidend beeinflussen.

2 Wissenschaftliche Fragestellung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Relevanz mitochondrialer Deletionen für die Hautalterung. Da es während dem Alterungsprozess zu einer Akkumulation von mtDNS-Mutationen kommt, wurde postuliert, dass diese kausal am Alterungsprozess beteiligt sind. Obwohl viele assoziative Hinweise diese Hypothese unterstützen, ist es bis jetzt nicht gelungen, einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen mtDNS-Mutationen und alterungsassoziierten Veränderungen darzustellen.

Ziel dieser Arbeit war daher, den postulierten kausalen Zusammenhang zwischen mtDNS-Mutationen und Alterungsprozessen zu überprüfen und zu analysieren, wie zelluläre Mechanismen, die von entscheidender Bedeutung für den Alterungsprozess von Zellen sind, durch Deletionen im mitochondrialen Genom beeinflusst werden.

Dafür sollten zunächst die zellulären Eigenschaften humaner dermaler Fibroblasten von Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom analysiert werden. Diese mitochondriale Erkrankung ist auf große Deletionen der mtDNS zurückzuführen, so dass die isolierten Fibroblasten bereits einen konstitutiv hohen Gehalt einer bestimmten mitochondrialen Mutation aufwiesen.

Zusätzlich sollte ein dermales Hautäquivalentmodell etabliert werden, in dem sich die Fibroblasten in einem dreidimensionalen Kollagengel, d.h. in einer der natürlichen Situation der Haut ähnlichen Umgebung befinden.

Die Modifikation dieses Modellsystems durch die Einsaat der mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten ermöglicht es, den Einfluss mitochondrialer Mutationen auf das Verhalten von Zellen in einer ihrer natürlichen Situation ähnlichen Umgebung zu analysieren und dadurch Hinweise auf den Zusammenhang zwischen Integrität des mitochondrialen Genoms und Hautalterung zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Humane dermale Fibroblasten

Zellen	Areal der	Alter des	Geschlecht des	Herkunft der Zellen	Besonderheit
	Hautbiopsie	Spenders	Spenders		
G1490/96	Arm	10 Jahre	weiblich	Diese Fibroblasten	Spender mit
(KSS96)				wurden	Kearns-Sayre-
				freundlicherweise von	Syndrom:
				Prof. Wilichowski von	positiv für
G1261/95	Oberschenkel	9 Jahre	weiblich	der Universität	Common
(KSS95)				Göttingen zur	Deletion
				Verfügung gestellt	
F102	Vorhaut	8 Jahre	männlich	Isolation der	keine
				Fibroblasten in	
F107	Vorhaut	7 Jahre	männlich	unserem Labor	

3.1.2 Zusammensetzung von Zellkultur-Medien

Nährmedium für humane dermale Fibroblasten	500 ml DMEM
	1% Antibiotika/Antimykotika
	1% L-Glutamine
	1% Natriumpyruvat
	200 µM Uridin
	10% hitzeinaktiviertes FCS
Synthesemedium 1	17.6 ml MEM (10x)
(Synthese dermaler Hautäquivalente)	5 10 ml NaHCO (75%)
(Synanese dermater madaquivalence)	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	50 ml MEM (25 mM Hepes)
(Synthese dermaler Hautäquivalente)	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	3,22 ml Synthesemedium 1
(Synthese dermaler Hautäquivalente)	0,63 ml FCS
	0,35ml NaOH (0,1 N)
	0,2 ml Synthesemedium 2

3.1.3 Zellkultur-Zusätze und Reagenzien

Antibiotika/Antimykotika	Invitrogen (Karlsruhe)
Kollagenase	Sigma (Taufkirchen)
Kollagen, Typ1 (~5 mg/ml)	Symatese Biomatériaux (Chaponost, France)
DCFDA	Sigma (Taufkirchen)
DMEM High Glucose	PAA Laboratories GmbH (Cölbe)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva (Heidelberg)
DPBS (-CaCl ₂ , - MgCl ₂)	Invitrogen (Karlsruhe)
Einbettmedium für Gefrierschnitte	Leica Microsystems Nussloch GmbH
	(Heidelberg)
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen (Karlsruhe)
Gitter zur Kultur von Hautäquivalenten	CSE Company, France
(Edelstahl, äußerer Ø 30 mm, Höhe 5 mm)	
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
MEM (10x)	Biochrom KG (Berlin)
MEM (25 mM Hepes)	Invitrogen (Karlsruhe)
MitoSox	Invitrogen (Karlsruhe)
NaHCO ₃	Invitrogen (Karlsruhe)
NaOH	Sigma (Taufkirchen)
Natriumpyruvat	Invitrogen (Karlsruhe)
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom KG (Berlin)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG (Berlin)
Sauerstoffindikator Resacorin	Oxoid, Hampshire, UK
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Uridin	Sigma (Taufkirchen)

Alle weiteren Substanzen wurden ebenfalls im höchsten Reinheitsgrad von den Firmen Sigma (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Sämtliche Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt und für die Verwendung in der Zellkultur steril filtriert.

3.1.4 Kit-Systeme

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen TM (Heidelberg)
cDNA-Synthese:	
M-MLV Reverse Transcriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Random Primers	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP Set	Invitrogen (Karlsruhe)
RNase OUT TM	Invitrogen (Karlsruhe)
Nucleo Spin RNA 2	Macherey-Nagel (Düren)
Nucleo Spin RNA/Protein	Macherey-Nagel (Düren)
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG	Invitrogen (Karlsruhe)
Qiamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)

3.1.5 Antikörper und Färbelösungen

Monoklonaler Antikörper CD49b	Acris Antibodies GmbH (Hiddenhausen)
(Integrin α2, Klon AK7, Maus IgG1)	
Monoklonaler Antikörper CD29	Acris Antibodies GmbH
(Integrin β1, Klon 4B7R, Maus IgG1)	(Hiddenhausen),
FITC Ratte, anti-Maus (IgG1, A85-1)	BD Pharmigen TM (Heidelberg)
Vimentin-Antikörper (Klon V9, IgG ₁ ,)	Dako Cytomation
	(Hamburg)
LSAB 2 System-AP	Dako Cytomation
	(Hamburg)
Propidiumjodid	Sigma (Taufkirchen)

3.2 Zellkultur Methoden (Monolayer)

3.2.1 Isolation humaner dermaler Fibroblasten

Primäre dermale Fibroblasten (NHF) wurden aus humaner Vorhaut wie von Berneburg *et al.* 1999 beschrieben, isoliert.

3.2.2 Kultivierung humaner dermaler Fibroblasten im Monolayer

Humane dermale Fibroblasten wurden als Monolayer-Kulturen auf Plastik-Gewebekulturflaschen (75 cm²) in einer Wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO2 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 kultiviert wurden, die konstitutiv hohe Deletionen in ihrer mitochondrialen DNS 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 25 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 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung bei 37°C in 5-10 Minuten vom Plastikboden der Zellkulturflasche abgelöst. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von 10 ml Nährmedium inaktiviert und die abgelösten Zellen im Verhältnis 1:4 in neue Kulturflaschen ausgesät. In diesen wurden die mit der nächst höheren Passagenzahl gekennzeichneten Fibroblasten weiterkultiviert.

3.2.3 Kryokonservierung und Rekultivierung humaner dermaler Fibroblasten

Für eine Langzeitlagerung humaner dermaler Fibroblasten in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen zunächst bis zur Konfluenz kultiviert und mittels Trypsin-EDTA-Lösung von der Gewebekulturflasche abgelöst (s. 3.2.2). Anschließend wurden die abgelösten Zellen bei 200 g für 5 Minuten pelletiert, in jeweils 1 ml Einfriermedium (Nährmedium + 10% DMSO) resuspendiert und in Einfrierröhrchen überführt. Diese wurden dann in speziellen mit Isopropanol gefüllten Einfrierdosen bei -80°C eingefroren und nach ca. 24 Stunden zur Langzeitkonservierung in flüssigen Stickstoff überführt.

Für die Rekultivierung wurden die eingefrorenen Zellen auf Raumtemperatur erwärmt, in 30 ml frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Gewebekulturflasche (75 cm²) ausgesät. Ein Mediumswechsel erfolgte nach 16 Stunden.

3.2.4 Bestimmung der Zellzahl humaner dermaler Fibroblasten

Zur Bestimmung der Anzahl humaner dermaler Fibroblasten in einer Zellsuspension wurde eine Neubaur-Zählkammer verwendet. Um tote Zellen zu markieren, wurden die Zellen zunächst mit Trypanblau gefärbt. Dieser Farbstoff kann durch die nicht mehr intakte Zellmembran toter Zellen diffundieren, die somit im Mikroskop blau erscheinen, während lebende Zellen aufgrund ihrer intakten Zellmembran ungefärbt bleiben. Aus einer Fläche von 1 cm² und einer Höhe von 10 µm ergibt sich ein Volumen von 0,1 µl für ein Eckquadrat der Neubaur-Zählkammer. Unter Berücksichtigung der Trypanblau-Verdünnung errechnet sich daher die Anzahl Zellen pro ml Zellsuspension wie folgt:

Anzahl gezählter Zellen pro Eckquadrat * Verdünnungsfaktor * 10.000 = Zellzahl/ml Zellsuspension

3.3 Zellkultur Methoden (dermale Hautäquivalente)

3.3.1 Synthese von dermalen Hautäquivalenten

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

Humane dermale Fibroblasten wurden wie in 3.2.2 beschrieben bis zur Konfluenz kultiviert und mittels Trypsin-EDTA-Lösung von der Gewebekulturflasche abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl und Pelletierung der Zellen bei 200 g für 5 Minuten wurden die Fibroblasten in Synthesemedium 2 (3.1.2) resuspendiert (2 Mio. Zellen/ml) und während des weiteren Vorgangs auf Eis gelagert. Von dieser Zellsuspension wurden 0,5 ml mit 4,4 ml Synthesemedium 3 und 1,9 ml Kollagen vorsichtig in einem 50 ml Erlenmeyerkolben gemischt und in eine mit Synthesemedium 3 benetzte Zellkulturschale (Ø 60 mm) überführt. Innerhalb der nächsten 4 Tage erfolgte die Kontraktion der dermalen Äquivalente bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre im Brutschrank.

3.3.1.1 Synthese dermaler Hautäquivalente unter anoxischen Bedingungen

Zur Synthese dermaler Hautäquivalente unter anoxischen Bedingungen wurde eine Anoxiekammer (IUL Instruments GmbH, Königswinter) verwendet, in der eine Sauerstofffreie Atmosphäre vorliegt (10% Wasserstoff, 10% Kohlendioxid, 80% Stickstoff). Um auch den in den Zellen vorhandenen Sauerstoff zu entfernen, wurden die Fibroblasten vor Beginn der Synthese 48 Stunden in der Anoxiekammer kultiviert. Das hierfür verwendete Fibroblasten-Nährmedium wurde zunächst 2 Stunden entgast und dann 12 Stunden in der Anoxiekammer äquilibriert.

Die Synthese der Hautäquivalente mit den so vorbehandelten Fibroblasten wurde analog zur Synthese mit den Kontrollzellen wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt. Dafür wurden sämtliche Medien wie oben erläutert entgast und in der Anoxiekammer vorinkubiert. Die Resuspendierung der gezählten und pelletierten Fibroblasten, die Mischung der Zellsuspension mit dem Kollagen und der anschließende viertägige Kontraktionsvorgang fanden unter Ausschluss von Sauerstoff in der Anoxiekammer statt.

3.3.1.2 Synthese dermaler Hautäquivalente bei Zugabe des Antioxidanz PBN

Um die Kontraktion dermaler Hautäquivalente bei Anwesenheit eines Antioxidanz zu untersuchen wurde die Synthese analog zur Synthese mit den Kontrollzellen wie unter 3.3.1 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurde dem Synthesemedium 3 vor Zugabe von Fibroblasten und Kollagen 10 mM N-tert-Butyl- α -phenylnitrone (PBN) als Antioxidanz zugesetzt.

3.3.1.3 Synthese dermaler Hautäquivalente bei Zugabe des LOX-Inhibitors BAPN

Zur Synthese dermaler Hautäquivalente unter Zugabe des LOX-Inhibitors BAPN wurden die Zellen vor Beginn der Synthese 36 Stunden mit 10 mM BAPN vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Synthese der Hautäquivalente mit den vorbehandelten Fibroblasten analog zur Synthese mit den Kontrollzellen wie unter 3.3.1 beschrieben, wobei dem Synthesemedium 3 vor Zugabe von Fibroblasten und Kollagen ebenfalls 10 mM BAPN zugesetzt wurde.

3.3.2 Bestimmung der Kontraktionsfähigkeit humaner Fibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel

Um die Kontraktionsfähigkeit humaner dermaler Fibroblasten im dermalen Äquivalent zu bestimmen, wurde der Durchmesser des Kollagengels während des viertägigen Kontraktionsvorgangs zunächst stündlich und danach täglich mit einem Lineal vermessen. Da das dermale Äquivalent näherungsweise kreisförmig ist, wurde die Fläche des Äquivalents wie folgt berechnet:

Fläche des Äquivalents $[cm^2] = \pi * r^2$

Zusätzlich wurde die Größe der Äquivalente zum jeweiligen Zeitpunkt mittels Digitalfotografie protokolliert.

3.3.3 Kultivierung dermaler Hautäquivalente

Nach Abschluss des Kontraktionsvorgangs der dermalen Äquivalente an Tag 4 ist eine Kultivierung für mind. 3 weitere Wochen möglich. Dafür wurde das Hautäquivalent mittels Pinzette und Plastikschaber vorsichtig auf ein Edelstahlgitter überführt, das in einer neuen Zellkulturschale (Ø 60 mm) platziert wurde. Durch Zugabe von Nährmedium bis zum Rand des Gitters (8 ml) wurden die Fibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel mit Nährstoffen versorgt. Ein Mediumswechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

3.3.4 Isolierung der Fibroblasten aus dem dermalen Hautäquivalent

Die Isolierung humaner dermaler Fibroblasten aus dem dreidimensionalen Kollagengel eines dermalen Hautäquivalents erfolgte in einem Kollagenaseverdau. Dafür wurden die dermalen Hautäquivalente mit PBS gewaschen und in 1 ml einer Kollagenase-Lösung (2 mg/ml in PBS) für 30 min bei 37°C und 600 rpm 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.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus humanen dermalen Fibroblasten

Zur Isolierung von DNS oder RNS aus Monolayer-Fibroblasten wurden die Zellen wie unter 3.2.2 beschrieben mit Trypsin/EDTA von der Gewebekulturflasche abgelöst und bei 200 g für 5 min pelletiert. Anschließend wurden die Zell-Pellets bei -80°C bis zur Isolation der Nukleinsäuren gelagert.

Zur Isolierung von DNS oder RNS aus den Fibroblasten eines dermalen Hautäquivalents wurde das Äquivalent zunächst mit PBS gewaschen und mit Hilfe einer sterilen Präparations-Schere in mehrere Stücke zerkleinert. Diese wurden dann in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Isolierung bei -80°C gelagert.

3.4.1.1 DNS-Isolierung aus Monolayer-Fibroblasten

Für die Isolierung von Gesamt-DNS aus humanen dermalen Fibroblasten wurde das "QIAmp DNA Mini Kit" der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

3.4.1.2 RNS-Isolierung aus im Monolayer kultivierten Fibroblasten

Die Isolierung der RNS aus humanen dermalen Fibroblasten erfolgte mit Hilfe des "Nucleo Spin RNA 2 Kit" der Firma Macherey und Nagel (Düren). Die einzelnen Isolations- und Reinigungsschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.
3.4.1.3 Isolierung von DNS aus Fibroblasten eines dermalen Äquivalents

Die Isolierung von Gesamt-DNS aus den Fibroblasten eines Äquivalents erfolgte mit Hilfe des "QIAmp DNA Mini Kits" (Qiagen). Die einzelnen vom Hersteller empfohlenen Isolations- und Reinigungsschritte wurden dabei wie folgt modifiziert:

Nach Zugabe von 200 μ l ATL-Puffer und 40 μ l Proteinase K zu dem auf Raumtemperatur erwärmten Äquivalent erfolgte die Lyse der Zellen und der Verdau des Kollagengels über Nacht bei 56°C im Schüttelinkubator (600 rpm). Als nächstes wurden 200 μ l AL-Puffer zugegeben und nach gründlichem Vortexen für weitere 10 min bei 70°C und 600 rpm inkubiert. Zur Fällung der DNS wurde die Zelllösung mit 200 μ l 100%-igem Ethanol gemischt, auf eine "QIAmp Spin Säule" überführt und bei 6800 g für 1 min zentrifugiert. Abschließend wurde die DNS zweimal mit je 500 μ l AW1-Puffer (6800 g, 1 min) und zweimal mit je 500 μ l AW2-Puffer (20800 g, 3 min) gewaschen und mit 80 μ l AE-Puffer eluiert (6800 g, 1 min). Die Lagerung der eluierten DNA erfolgte kurzfristig bei +4°C und langfristig bei -20°C.

3.4.1.4 Isolierung von RNS aus Fibroblasten eines dermalen Äquivalents

Zur Isolierung von RNS aus den Fibroblasten eines dermalen Äquivalents wurde das "Nucleo Spin RNA/Protein Kit" der Firma Macherey-Nagel wie folgt verwendet:

Nach Zugabe von 350 µl RP1-Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol wurde das Äquivalent bis zum Erhalt eines viskosen Lysats gevortext. Um die Viskosität des Lysats zu reduzieren wurde dies in eine "NucleoSpin Filter Unit" überführt und bei 6800 g für 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Lysat vorsichtig mit 350 µl 70%-igem Ethanol gemischt, in eine "NucleoSpin RNA/Protein Säule" überführt und bei 12900 g für 1 min zentrifugiert. Um Salzrückstände von der Säule zu entfernen wurde diese mit 350 µl MDB-Puffer gewaschen (12900 g, 1 min). Es erfolgte eine Inkubation mit 95 µl der DNAse-Reaktionsmischung (10 µl DNase I + 90 µl DNase-Reaktionspuffer) für 15 min bei Raumtemperatur, um ebenfalls auf der Säule gebundene DNS zu entfernen. Abschließend wurde die auf der Säule gebundene RNS mit 200 µl RA2-Puffer (12900 g, 1 min), 600 µl RA3-Puffer (12900 g, 1 min) und 250 µl RA3-Puffer (12900 g, 2 min) gewaschen. Die Lagerung der in 40 µl Wasser eluierten RNS (12900 g, 1 min) erfolgte bei -80°C.

3.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS und RNS

Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer aromatischen Basen im UV-Bereich absorbieren, wurde eine photometrische Konzentrationsbestimmung von DNS bzw. RNS durchgeführt (Fechter *et al.* 1998). 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 DNS einer Konzentration von 50 μ g/ml und bei einzelsträngiger RNS 40 μ g/ml, so dass sich die Konzentrationen folgendermaßen berechnen:

 $OD_{260} * 50 * Verdünnungsfaktor = dsDNS-Konzentration [µg/ml]$ $OD_{260} * 40 * Verdünnungsfaktor = RNS-Konzentration [µg/ml]$

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 DNS zwischen 1,7 und 2 liegen, bei RNS-Proben bei ~1,8.

3.4.3 Synthese von komplementärer DNS (cDNS)

Die aus humanen dermalen Fibroblasten isolierte RNS wurde mit M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) Reverser Transkriptase und Zufalls-Hexamer-Primern wie folgt in cDNS umgeschrieben:

Zunächst wurden folgende Reaktionskomponenten in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß für 5 min bei 65°C inkubiert: 2 μ l Random Primer (50 μ M)

2 µl dNTPs (10 mM)

20 µl RNS (200 ng)

Nach Zugabe der folgenden Komponenten erfolgte eine weitere Inkubation für 2 min bei37°C:8 μl "5x First Strand Puffer"4 μl DTT (0,1 M)

2 μl "RNAse Out" Abschließend wurden 2 μl der M-MLV-Reversen Transkriptase zugegeben und wie folgt inkubiert: 25°C, 10 min 37°C, 50 min 70°C, 15 min

Die transkribierte cDNS wurde kurzfristig bei +4°C und langfristig bei -20°C gelagert.

3.4.4 Real-Time-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction) ist ein 1984 von Kary Mullis entwickeltes zyklisches Verfahren zur exponentiellen Amplifikation einer spezifischen DNS-Sequenz, die von zwei bekannten Sequenzabschnitten flankiert ist (Mullis *et al.* 1992).

Bei der Real-Time-PCR wird im Vergleich zur herkömmlichen PCR die Menge der amplifizierten doppelsträngigen DNS nach jedem Amplifikationszyklus visualisiert. Dies geschieht mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes wie z.B. SYBR Green[™], der sequenzunspezifisch an doppelsträngige DNS bindet. Der Vergleich der für verschiedene Amplifikationen entstehenden sigmoidalen Fluoreszenzkurven erlaubt eine Aussage über die jeweils vorhandene Ausgangsmenge der Transkripte. Für diesen Vergleich wird der so genannte Cycle-Threshold (CT) innerhalb der exponentiellen Amplifikationsphase festgelegt. Als Qualitätskontrolle der entstandenen PCR-Produkte dient die nach beendeter Amplifikation detektierte Schmelzkurve der entstandenen Amplifikate. Zur Analyse mittels Real-Time-PCR wurde ein TaqMan 7000 Cycler der Firma Applied Biosystems (Schweiz) verwendet. 3.4.4.1 Bestimmung der Genexpression mittels semi-quantitativer Real-Time-PCR

Zur Bestimmung der relativen Genexpression bestimmter Gene wurde zunächst die Gesamt-RNS der Zellen isoliert (3.4.1) und in cDNS umgeschrieben (3.4.3). Die relative Quantifizierung verschiedener Transkripte auf cDNS-Ebene erfolgte anschließend wie folgt in einer Real-Time-PCR:

1x PCR-Ansatz	
H ₂ O	7,5 µl
SYBR Green [™] with ROX	12,5 µl
Primer forward (10 µM)	1 μl
Primer reverse (10 µM)	1 μl
cDNS (3.4.3)	3 µl

PCR-Program	n		
Denaturierung	94°C	20 sec	
Hybridisierung	45 Zyklen	sec	
Elongation J		sec	

Als intrazelluläres Referenzgen wurde das 18S-rRNS-Gen verwendet, das 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

$$= 2^{-\left[\left(CT_Gen X_{Probe A} - CT_18s_{Probe A}\right) - \left(CT_Gen X_{Probe B} - CT_18s_{Probe B}\right)\right]}$$

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

Hifla fwd.	ACT GGT GGC TCA CTA CCT AA
Hifla rev.	CTG TCT GTG ATC CAG CAT TA
LOX fwd.	ACA TCC TGT GAC TAT GGC TAC C
LOX rev.	CTG GGG TTT ACA CTG ACC TTT A
MMP1 fwd.	GAT GAA AGG TGG ACC AAC AAT TT
MMP1 rev.	CCA AGA GAA TGG CCG AGT TC
TIMP1 fwd.	TCG TGG CTC CCT GGA ACA
TIMP1 rev.	CCA ACA GTG TAG GTC TTG GTG AAG
18sRNS fwd.	GCC GCT AGA GGT GAA ATT CTT G
18sRNS rev.	CAT TCT TGG CAA ATG CTT TCG

3.4.4.2 Bestimmung des Gehalts der mitochondrialen Common Deletion mittels quantitativer Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der Common Deletion im mitochondrialen Genom erfolgte, wie in Koch *et al.*, 2001 beschrieben mittels quantitativer Real-Time-PCR:

1x PCR-Ansatz	
H ₂ O	1,75 µl
Sybr Green with ROX	13 µl
Primer forward (10 µM)	0,125 µl
Primer reverse (10 µM)	0,125 µl
DNS (100 ng/10 µl)	10 µl

PCR-Programm			
	50°C	2 min	
Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	⊅ 5°C	15 sec	
Hybridisierung	6 ^{60°} 50 Zykl	len	
Elongation	-wä		ens

Um die mitochondriale Deletion in Relation zur Gesamtzahl der vorhandenen mtDNS Moleküle zu bestimmen wird zusätzlich ein Stück mtDNS als "interner Standard" aus einer Region amplifiziert, die sich durch hohe Stabilität auszeichnet. Die absolute Anzahl der deletierten bzw. der gesamten mtDNS 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 Real-Time-PCR eingesetzt:

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

3.5 Biophysikalische Methoden

3.5.1 Messung reaktiver Sauerstoffspezies in lebenden Zellen

Für die Messung reaktiver Sauerstoffspezies im Zytosol bzw. in und an den Mitochondrien wurde ein FluoroMax-1/2-Spektralfluorimeter (SPEX Instruments SA, Grasbrunn) verwendet.

3.5.1.1 Bestimmung des oxidativen Status im Zytosol einer Zelle

Die Anwendung von 2`,7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat (DCFDA) erlaubt eine Aussage über den oxidativen Status der Zelle (Halliwell & Whiteman 2004). Wie in Abb. 3.1 gezeigt, akkumuliert das zellpermeable DCFDA im Zytosol der Zelle wo es durch Esterasen zu 2`,7`-Dichlorodihydrofluorescein (Dichlorofluorescin, DCFH) hydrolisiert wird. Anschließend erfolgt die Oxidation von DCFH durch zelluläre reaktive Sauerstoffspezies zum fluoreszierenden 2`,7`-Dichlorofluorescein (DCF), dessen Fluoreszenz bei 534 nm gemessen wird und als zytosolischer Marker für oxidativen Stress gilt.



Humane dermale Fibroblasten wurden zunächst in 24-well-plates wie unter 3.2.2 beschrieben bis zur Konfluenz kultiviert. Anschließend wurden die mit PBS gewaschenen Fibroblasten mit 100 μ M DCFDA in PBS versetzt (500 μ l/well). Die Fluoreszenz des durch Oxidation entstehenden DCF wurde über 30 min im Flurometer bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einer Emissionswellenlänge von 534 nm gemessen.

3.5.1.2 Bestimmung des oxidativen Status in und an den Mitochondrien einer Zelle

Der oxidative Status in und an den Mitochondrien der Zelle wurde mit Hilfe von MitoSox ermittelt, ein Reagenz, das auf die Mitochondrien der lebenden Zelle gerichtet ist und dort spezifisch mit Superoxidradikalanionen reagiert.

In 24-well-plates bis zur Konfluenz kultivierte Fibroblasten wurden mit PBS gewaschen und mit 5 μ M MitoSox in PBS (100 μ l/well) für 10 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde die Fluoreszenz des oxidierten MitoSox bei 580 nm mit einer Anregungswellenlänge von 510 nm im Flurometer detektiert.

3.5.2 Durchflusszytometrische Analyse

Bei der Durchflusszytometrie werden die zu untersuchenden Zellen zunächst mit einem spezifischen Fluorochrom markiert und anschließend in einem Durchflusszytometer (FACScaliburTM-Durchlusszytometer, Becton Dickinson, San Jose, USA) mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm bestrahlt. Dieses regt die Fluorochrome zur Emission an, die dann quantifiziert wird. Zusätzlich werden Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht detektiert, die Informationen über Zellgröße bzw. Zellgranularität liefern. Die Auswertung der am Durchflusszytometer erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der Programme CELLquestTMund WinMDITM.

3.5.2.1 Färbung der Integrinrezeptoruntereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Integrin-Oberflächenrezeptoren humaner dermaler Fibroblasten wurden 500.000 Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert und für 10 min bei 4°C mit dem spezifischen Erstantikörper (1 μ g) inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml PBS wurden die Zellen bei 200 g für 5 min pelletiert und erneut in 100 μ l PBS resuspendiert. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1 μ g) erfolgte ebenfalls bei 4°C für 10 min und wurde durch Zugabe von 4 ml PBS und Pelletierung der Zellen (200 g, 5 min) beendet. Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die pelletierten gefärbten Zellen in 300 μ l PBS resuspendiert.

3.5.2.2 Bestimmung der Zellvitalität mittels Annexin V-PI-Färbung

Die Färbung von Zellen mit Annexin V-FITC ermöglicht eine Aussage über die Viabilität der Zellen. Charakteristisch für das apoptotische Programm einer Zelle ist der Verlust der Asymmetrie der Plasmamembran. Das Phospholipid Phosphatidylserin (PS) wird in einem frühen Stadium der Apoptose von der inneren zur äußeren Membranseite transloziert, wo es eine Bindung mit Annexin V, einem Phospholipid-Bindeprotein, eingehen kann. Die Kopplung von Annexin V an das Fluorochrom FITC ermöglicht daher eine durchflusszytometrische Detektion apoptotischer Zellen. Die gleichzeitige Färbung der Zellen mit Propidiumjodid erlaubt zusätzlich eine Unterscheidung von früh- und spät-apoptotischen Zellen, da eine Färbung der Zellen mit Propidiumjodid erst nach Permeabilisierung der Zellen mit Propidiumit und spät-apoptotischen Zellen, von Birter and Permeabilisierung der Zellen sowohl mit Annexin V als auch mit Propidiumjodid gefärbt werden.

Zur Detektion der Zellviabilität durch Annexin V-FITC-PI-Färbung wurde das "Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I" der Firma BD PharmingenTM gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die mit PBS gewaschenen Zellen wurden gezählt und in 100µl 1x Binde-Puffer resuspendiert (1 Mio. Zellen/ml). Die Färbung erfolgte mit 5 µl Annexin V-FITC und 5 µl Propidiumjodid in einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach Zugabe von 400 µl 1x Binde-Puffer kann die Viabilität der Zellen anschließend innerhalb einer Stunde durchflusszytometrisch analysiert werden.

3.6 Histochemische Methoden

3.6.1 Immunochemische Färbung von Gefrierschnitten

3.6.1.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten eines dermalen Hautäquivalents wurde mit Hilfe einer sterilen Präparationsschere ein kleines Stück aus der Mitte des mit PBS gewaschenen Äquivalents herausgeschnitten. Anschließend wurde das Äquivalent mit Einbettmedium umgeben, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryotoms (Leica CM3050 S Cryostat) wurden 6 µm dicke Querschnitte des dermalen Hautäquivalents angefertigt. Nach Fixierung der auf einen Objektträger überführten Gefrierschnitte durch Inkubation in eiskaltem Aceton für 10 min bei -20°C konnten die Schnitte bis zur weiteren Verwendung bei +4°C gelagert werden.

3.6.1.2 Färbung von Vimentin an Gefrierschnitten dermaler Äquivalente

Zur Qualitätskontrolle dermaler Hautäquivalente erfolgte die Analyse von Zelldichte und Verteilung der Fibroblasten im Äquivalent durch Anfärbung von Vimentin, einem Protein im Zytoskelett der Fibroblasten. Die Färbung wurde immunochemisch an Gefrierschnitten dermaler Äquivalente durchgeführt. Vor Beginn der Vimentin-Färbung wurden die bei +4°C gelagerten Gefrierschnitte kurz bei Raumtemperatur getrocknet und dann zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Nach Inkubation mit dem spezifischen gegen Vimentin gerichteten Erst-Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur wurden die Gefrierschnitte wiederum zweimal für je 10 min mit PBS gewaschen. Die Visualisierung des Erstantikörpers erfolgt mit dem LSAB2-System (Dako Cytomation) entsprechend den Herstellerangaben. Dieses System besteht aus drei aufeinander folgenden Inkubationsschritten von jeweils 10 min. Nach der ersten Inkubation mit dem biotinylierter Zweitantikörper erfolgt als zweites eine Inkubation mit Streptavidin-gekoppelter alkaliner Phosphatase, die das im dritten Inkubationsschritt zugegebene Substratchromogen zum roten Fuchsin umsetzt. Zur Gegenfärbung der Zellkerne

der Fibroblasten wurden die Gefrierschnitte für 3 min bei Raumtemperatur mit Propidiumjodid gefärbt und erneut zweimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Gefrierschnitte mit Eindeckelmedium überschichtet und die Färbung mit Hilfe eines Mikroskops (Olympus BX60) detektiert.

4 Ergebnisse

4.1 KSS-Fibroblasten unterscheiden sich genetisch, physiologisch und morphologisch von Kontroll-Fibroblasten

Der Zusammenhang zwischen mitochondrialen DNS-Mutationen, oxidativem Stress und alterungsassoziierten zellulären Veränderungen wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von mtDNS geschädigten Fibroblasten untersucht. Dafür wurden Fibroblasten von Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom charakterisiert, einer mitochondrialen Erkrankung, die mit dem Auftreten von mtDNS-Deletionen assoziiert ist. Als Kontroll-Zellen wurden Fibroblasten von gesunden, altersgleichen Spendern verwendet.

4.1.1 KSS-Fibroblasten besitzen einen konstitutiv höheres Gehalt an Common Deletion als Kontroll-Fibroblasten

Um die Integrität des mitochondrialen Genoms in KSS- und Kontroll-Fibroblasten zu analysieren, wurde exemplarisch der Gehalt der mitochondrialen Common Deletion bestimmt, die als Biomarker für das Vorhandensein von weiteren mtDNS-Deletionen gilt. Die KSS-Fibroblasten zeigten in ihrer mitochondrialen DNS einen intrinsisch hohen Gehalt dieser mtDNS-Deletion, wie mittels quantitativer Real-Time-PCR überprüft wurde.

Abb. 4.1.A zeigt den auf die gesamte mtDNS bezogenen prozentualen Anteil Common Deletion tragender mtDNS-Moleküle der von zwei KSS-Patienten isolierten Fibroblasten (KSS95 und KSS96). Während der Kultivierung dieser Fibroblasten im Monolayer war zu Beginn eine deutliche Reduktion des Deletionsgehalts zu erkennen. In Passage 4 trugen durchschnittlich 3,7% (KSS95) bzw. 12,8% (KSS96) der gesamten mtDNS-Moleküle die Common Deletion, während in Passage 11 nur noch ein Gehalt von durchschnittlich 0,8% (KSS95) bzw. 1,2% (KSS96) quantifizierbar war. Dies entsprach einer Abnahme der Common Deletion tragenden mtDNS-Moleküle um 78,4% (KSS95) bzw. 90,6% (KSS96). Im Gegensatz zu dieser initial starken Reduktion des Deletionsanteils fand im weiteren Verlauf der Kultivierung nur noch eine Reduktion der quantifizierten mtDNS-Deletion um 37,5% (KSS95) bzw. 66,7% (KSS96) statt. In Passage 18 besaßen demnach durchschnittlich 0,5% (KSS95) bzw. 0,4% (KSS96) der mtDNS-Moleküle die Common Deletion. Im Gegensatz zu diesem konstitutiv hohen Anteil Common Deletion tragender mtDNS-Moleküle bei KSS-Fibroblasten war in den Kontroll-Fibroblasten von gesunden, altersgleichen Spendern nur ein geringer Basislevel der Common Deletion vorhanden (Abb. 4.1.B). Unabhängig von der Passage trugen durchschnittlich weniger als zwei von einer Million mtDNS-Molekülen diese mtDNS-Deletion. Damit unterschied sich der in den Kontroll-Fibroblasten detektierte Basisgehalt der Common Deletion um den Faktor 10⁴ von dem in KSS-Fibroblasten



4.1.2 KSS-Fibroblasten besitzen einen höheren Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies als Kontroll-Fibroblasten

Nachdem verschiedene Arbeiten eine Assoziation von mtDNS-Deletionen und gesteigertem oxidativen Stress nahe gelegt haben (Wei *et al.* 2001; Jou *et al.* 2005), wurde der oxidative Status der mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten im Vergleich zum oxidativen Status der Kontroll-Fibroblasten analysiert. Der Gehalt an ROS wurde zum einen in und an den Mitochondrien (MitoSox) und zum anderen im Zytosol (DCFDA) der Fibroblasten mittels

Fluoreszenzmessungen quantifiziert. Abb. 4.2 zeigt den Gehalt reaktiver Sauerstoffspezies in KSS-Fibroblasten als prozentuale Menge der in den Kontroll-Fibroblasten detektierten ROS. Sowohl in und an den Mitochondrien als auch im Zytosol wurden bei den KSS-Fibroblasten signifikant mehr reaktive Sauerstoffspezies detektiert als in den Kontroll-Fibroblasten. KSS-Fibroblasten sind somit im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten einem verstärkten oxidativen Stress ausgesetzt.



Abb. 4.2: Quantifizierung reaktiver Sauerstoffspezies in Kontroll- und KSS-Fibroblasten Die Quantifizierung erfolgte mit einem Flurometer nach Fluoreszenzfärbungen der Zellen mit MitoSox (A, Mitochondrien) und DCFDA (B, Zytosol); gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=4, **p<0,01); in jedem Experiment wurde die Fluoreszenz der Fibroblasten von zwei gesunden Spendern (F102, F107) und von zwei KSS-Patienten (KSS95, KSS96) über einen Zeitraum von 30 min detektiert

4.1.3 KSS-Fibroblasten unterscheiden sich in ihrer Morphologie von Kontroll-Fibroblasten

Es ist bekannt, dass sich *in vitro* gealterte Fibroblasten in ihrer Morphologie von jungen Fibroblasten unterscheiden (Hutter *et al.* 2004). Da der erhöhte Gehalt der mitochondrialen Common Deletion und die vermehrt detektierten ROS in den KSS-Fibroblasten auf einen seneszenten Phänotyp dieser Zellen hindeuten könnten, wurde ebenfalls die Morphologie dieser Zellen untersucht. Ein Vergleich der KSS-Fibroblasten mit Passagen-gleichen Kontroll-Fibroblasten wies deutliche Unterschiede auf. Abb. 4.3 zeigt das Zytoskelett der Zellen nach Färbung der Aktin- und Tubulinfasern. Während die Kontroll-Fibroblasten die für ihren Zelltyp charakteristische lang gestreckte spindelförmige Morphologie aufwiesen, waren die KSS-Fibroblasten deutlich größer und besaßen weniger der für Fibroblasten typischen Zellfortsätze.





Auch die Eigenfluoreszenz der KSS-Fibroblasten unterschied sich von der der Kontroll-Fibroblasten, wie durchflusszytometrisch analysiert wurde (Abb. 4.4). Sowohl bei 525 nm als auch bei 575 nm und 675 nm zeigten die KSS-Fibroblasten eine deutlich breitere Fluoreszenzverteilung, deren Maximum eine stärkere Fluoreszenzintensität belegt.



Zur genaueren Analyse der erhöhten Eigenfluoreszenz der KSS-Fibroblasten wurde weiterhin die Granularität der Zellen untersucht, da bereits bekannt ist, dass es in alternden Zellen zur Akkumulation von unlöslichem, fluoreszierendem Material kommen kann (Grune 2000; Yin 1996). Im Lichtmikroskop zeigten die KSS-Fibroblasten kleine Granula, die im Vergleich dazu in den Passagen-gleichen Kontroll-Fibroblasten nicht zu erkennen waren (Abb. 4.5.A). Auch eine durchflusszytometrische Analyse (Abb. 4.5.B) bestätigt, dass die Population der KSS-Fibroblasten deutlich mehr Zellen hoher Granularität enthält (Side Scatter) als die Population der Kontroll-Fibroblasten. Die stärkere Eigenfluoreszenz der KSS-Fibroblasten könnte also auf die erhöhte Granularität dieser Zellen zurückzuführen sein.



Fibroblasten; gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel (n=8)

4.2 Etablierung und Modifikation eines Modellsystems dermaler Hautäquivalente

Um den Zusammenhang zwischen mitochondrialen DNS-Mutationen, oxidativem Stress und alterungsassoziierten zellulären Veränderungen mit Hilfe von mtDNS-geschädigten Fibroblasten und gesunden Kontroll-Fibroblasten zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein dermales Hautäquivalentmodell verwendet. In diesem dreidimensionalen Modellsystem kontrahieren humane dermale Fibroblasten ein Kollagengel, in welchem sie anschließend in einer ihrer natürlichen Situation ähnlichen Umgebung für drei Wochen kultiviert werden können. Das hier verwendete dermale Hautäquivalentmodell wurde im Rahmen dieser Arbeit basierend auf den von L'Oréal in einer Kooperation bereitgestellten Techniken zunächst mit normalen humanen Fibroblasten in unserem Labor etabliert und anschließend durch den Einbau von KSS-Fibroblasten modifiziert.

4.2.1 Kontraktion und Kultivierung dermaler Hautäquivalente mit normalen humanen Fibroblasten

Zur Synthese dermaler Hautäquivalente wurden humane dermale Fibroblasten mit nativen Kollagenfasern gemischt, die sie dann zu einem dreidimensionalen Kollagengel umbauten. Während dieses Vorgangs fand eine Kontraktion des Kollagengels statt, die nach insgesamt vier Tagen abgeschlossen war (Abb. 4.6.A). Abb. 4.6.B zeigt exemplarisch ein dermales Äquivalent zu verschiedenen Zeitpunkten der Kontraktionsphase. Zu Beginn war das Kollagengel nahezu durchsichtig (0 h), aber im Verlauf der Kontraktion wurde es zunehmend undurchsichtiger (6 h), bis es schließlich vollkommen blickdicht war. Bereits innerhalb der ersten sechs Stunden reduzierte sich die Fläche des Kollagengels bei Verwendung normaler humaner Fibroblasten in einer initialen Kontraktionsphase von 19,6 cm² um durchschnittlich 27,6% auf $14,2 \pm 1,3$ cm². Nach vier Tagen war die Endgröße des Äquivalents erreicht, die mit $3,2 \pm 0,2$ cm² nur noch durchschnittlich 16,3% der Ausgangsgröße betrug.



Nach Abschluss des Kontraktionsvorgangs konnten die humanen dermalen Fibroblasten im dermalen Hautäquivalent für drei weitere Wochen kultiviert werden, wie anhand von histochemischen Färbungen überprüft wurde (Abb. 4.7). Die Färbung von Vimentin im Zytoskelett der Fibroblasten zeigte, dass über den untersuchten Zeitraum von drei Wochen keine Veränderungen in Zelldichte oder Zellverteilung detektiert werden konnten.





4.2.2 Kontraktion und Kultivierung dermaler Hautäquivalente mit mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten

Um die Bedeutung mitochondrialer Deletionen für die Hautalterung zu analysieren, wurde das etablierte Hautäquivalentmodell durch den Einbau von mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten modifiziert. Dafür wurde zunächst überprüft, ob derart geschädigte Fibroblasten überhaupt in der Lage sind, ein Typ I Kollagengel zu einem dermalen Äquivalent zu kontrahieren. Wie Abb. 4.8 zeigt, fand bei der Synthese dermaler Hautäquivalente auch bei **KSS-Fibroblasten** Einsaat Common Deletion tragender eine Kontraktion des dreidimensionalen Kollagengels innerhalb von vier Tagen statt. In einer initialen Kontraktionsphase von sechs Stunden reduzierte sich die Fläche der Kollagengele von 19,6 cm² um durchschnittlich 76,5% auf $4,6 \pm 0,2$ cm². Mit einer Größe von $2,6 \pm 0,2$ cm² betrug die Fläche der dermalen Äquivalente nach vier Tagen nur noch durchschnittlich 13,2% der Ausgangsgröße.





Auch bei Modifikation des dreidimensionalen Modellsystems dermaler Hautäquivalente durch den Einbau von KSS-Fibroblasten konnten diese nach Abschluss der Kontraktionsphase für drei weitere Wochen kultiviert werden, wie durch immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten nachgewiesen wurde. Abb. 4.9 zeigt die Färbung der Fibroblasten im Querschnitt des dermalen Äquivalents mit einem gegen Vimentin gerichteten Antikörper. Sowohl am Tag 4 nach Abschluss der Kontraktionsphase als auch nach einer Kultivierung der KSS-Fibroblasten für weitere drei Wochen war eine gleichmäßige Verteilung der Fibroblasten zu erkennen.



4.2.3 Der Gehalt der mitochondrialen Common Deletion bleibt während der Kultivierung von Fibroblasten im dermalen Äquivalent konstant

Da es möglich ist, ein dermales Hautäquivalent durch den Einbau von mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten zu modifizieren, ist dieses Modell ein geeignetes System, um die Bedeutung mitochondrialer Mutationen im Alterungsprozess zu untersuchen. Die Beständigkeit der mitochondrialen Mutation der Fibroblasten sowohl bei der Synthese als auch während der Kultivierung des Hautäquivalents ist dabei von entscheidender Bedeutung. Daher wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR überprüft, ob sich der Anteil Common Deletion tragender mtDNS-Moleküle beim Einbau der KSS-Fibroblasten bzw. während ihrer Kultivierung im dermalen Hautäquivalent ändert (Abb. 4.10.A). Ein Vergleich des Gehalts der mitochondrialen Common Deletion in den KSS-Fibroblasten vor Einbau in ein dreidimensionales Kollagengel (Tag 0) und nach Ende der Kontraktionsphase (Tag 4) zeigte, dass der Anteil deletierter mtDNS-Moleküle während einer dreiwöchigen Kultivierung der KSS-

Fibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel (Woche 1, Woche 2, Woche 3) änderte sich der Gehalt der Common Deletion im Vergleich zum Ausgangswert (Tag 0) nicht wesentlich. Dieser Befund zeigte einen deutlichen Unterschied zur Kultivierung der Fibroblasten im Monolayer, bei der eine deutliche Reduktion des Anteils Common Deletion tragender mtDNS-Moleküle quantifiziert wurde (Abb. 4.1.A).



± Standardabweichung (n=3)

Analog dazu wurde überprüft, ob auch der verhältnismäßig geringe Basislevel der Common Deletion, der in den Kontroll-Fibroblasten detektiert wurde (Abb. 4.1.B), während einer Kultivierung dieser Fibroblasten im dermalen Äquivalent konstant bleibt (Abb. 4.10.B).

Der Gehalt der mitochondrialen Common Deletion in den Kontroll-Fibroblasten vor Einbau in ein dreidimensionales Kollagengel (Tag 0) und nach Ende der Kontraktionsphase (Tag 4) zeigte auch hier keine signifikante Änderung. Ebenso ist während einer dreiwöchigen Kultivierung der Kontroll-Fibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel (Woche 1, Woche 2, Woche 3) keine wesentliche Änderung des Common Deletion Gehalts zu detektieren.

4.3 KSS-Fibroblasten kontrahieren ein Kollagengel schneller als Kontroll-Fibroblasten

Ein Vergleich der Synthese dermaler Äquivalente mit Kontroll-Fibroblasten von gesunden Spendern und Fibroblasten von altersgleichen Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom zeigte einen deutlichen Unterschied im Kontraktionsverlauf des dreidimensionalen Kollagengels. In Abb. 4.11.A ist der Kontraktionsverlauf dermaler Äquivalente mit Kontroll-Fibroblasten im Vergleich zum Kontraktionsverlauf mit Passagen-gleichen KSS-Fibroblasten dargestellt. Bereits nach zwei Stunden war ein signifikant gesteigertes Kontraktionsvermögen der KSS-Fibroblasten zu erkennen, das darüber hinaus auch an allen später untersuchten Zeitpunkten detektiert werden konnte. In einer initialen Kontraktionsphase von sechs Stunden reduzierte sich die Fläche der KSS-Äquivalente um durchschnittlich 80,4% auf $3,8 \pm 0,6$ cm², während die Äquivalente mit Kontroll-Fibroblasten sich mit $10,5 \pm 2,7$ cm² erst um durchschnittlich 46,4% der Ausgangsgröße verringert hatten. In Abb. 4.11.B ist die unterschiedliche Größe der dermalen Äquivalente mit Kontroll- bzw. KSS-Fibroblasten zum exemplarischen Zeitpunkt von sechs Stunden nach Kontraktionsbeginn dargestellt.



(B) Größe dermaler Äquivalente mit Kontroll- und KSS-Fibroblasten 6 h nach Kontraktionsbeginn; gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Äquivalent (n=8)

4.4 ROS haben einen Einfluss auf den Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten

KSS-Fibroblasten, die einen konstitutiv hohen Gehalt der mitochondrialen Common Deletion aufwiesen, kontrahierten ein dreidimensionales Kollagengel schneller als Kontroll-Fibroblasten von gesunden Spendern.

Es ist bekannt, dass Mutationen im mitochondrialen Genom mit einer vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies assoziiert sein können (Wei *et al.* 2001; Jou *et al.* 2005) und auch die hier verwendeten Common Deletion tragenden KSS-Fibroblasten waren im Vergleich zu normalen Kontroll-Fibroblasten einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt. Da bereits viele Signalprozesse charakterisiert wurden, an denen ROS beteiligt sind (Allen & Tresini 2000), ist es denkbar, dass der erhöhte oxidative Stress der KSS-Fibroblasten an ihrem stärkeren Kontraktionsvermögen beteiligt sein könnte. Dabei könnten ROS entweder direkt im Kontraktionsprozess wirksam werden oder aber zu einer veränderten Genexpression führen, die ihrerseits eine schnellere Kontraktion ermöglichen könnte. So konnte bereits gezeigt werden, dass ROS die Kontraktion eines dreidimensionalen Kollagengels durch mesangiale Nierenzellen stimulieren (Zent *et al.* 1999). Um zu überprüfen, ob die bei den KSS-Fibroblasten vermehrt detektierten ROS an ihrem schnelleren Kontraktionsvermögen im dreidimensionalen Kollagengel beteiligt sind, wurde die Synthese der dermalen Äquivalente unter anoxischen Bedingungen und unter Zugabe eines Antioxidanz durchgeführt.

4.4.1 Der Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten wird durch anoxische Bedingungen reduziert

Eine Möglichkeit zu untersuchen, inwieweit die bei den KSS-Fibroblasten vermehrt vorhandenen reaktiven Sauerstoffspezies an dem schnelleren Kontraktionsvermögen dieser Zellen im dreidimensionalen Kollagengel beteiligt sind, ist das Kontraktionsverhalten von KSS- und Kontroll-Fibroblasten unter atmosphärischen Normalbedingungen und unter anoxischen Bedingungen zu vergleichen. Dieser Vergleich zeigte, dass die Kontraktion sowohl bei den KSS-Äquivalenten als auch bei den entsprechenden Kontroll-Äquivalenten mit Kontroll-Fibroblasten durch den Ausschluss von Sauerstoff verlangsamt wurde. Abb. 4.12

zeigt exemplarisch sechs Stunden nach Kontraktionsbeginn die Größe eines KSS- und eines Kontroll-Äquivalents, das mit bzw. ohne Sauerstoff generiert wurde.



Sowohl mit als auch ohne Sauerstoff war die Kontraktion der KSS- Äquivalente schneller. Um jedoch eine Aussage darüber treffen zu können, ob sich dieser Kontraktionsunterschied durch den Ausschluss von Sauerstoff verändert, wurde die Größe der KSS-Äquivalente zum jeweiligen Zeitpunkt auf die Größe der Kontroll-Äquivalente im korrespondierenden Experiment normiert. Abb. 4.13 zeigt die prozentuale Größe der KSS-Äquivalente mit und ohne Sauerstoff. Bereits zwei Stunden nach Kontraktionsbeginn war die prozentuale Größe der KSS-Äquivalente mit Sauerstoff kleiner als die ohne Sauerstoff. Der innerhalb der ersten sechs Stunden deutlich sichtbare Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Äquivalenten ist somit unter anoxischen Bedingungen geringer. Dies deutet darauf hin, dass der bei den KSS-Fibroblasten detektierte erhöhte Gehalt an ROS am schnelleren Kontraktionsverhalten dieser Zellen im dreidimensionalen Kollagengel beteiligt ist.



Die Viabilität der Zellen unter anoxischen Bedingungen wurde mit Hilfe einer Annexin V -Propidiumjodid - Färbung überprüft. Dafür wurden die Fibroblasten am Tag 4 nach Ende der Kontraktion aus den mit und ohne Sauerstoff kontrahierten Äquivalenten mit Hilfe eines Kollagenaseverdaus isoliert und die Viabilität der Zellen durchflusszytometrisch überprüft. Abb. 4.14 zeigt den prozentualen Anteil überlebender Kontroll- bzw. KSS-Fibroblasten nach einer Kontraktion im dreidimensionalen Kollagengel mit bzw. ohne Sauerstoff. Der Anteil apoptotischer Zellen betrug bei den Kontroll- und KSS-Fibroblasten sowohl unter Normalbedingungen als auch unter anoxischen Bedingungen unter 15%, d.h. es ist kein Unterschied in der Viabilität von KSS- und Kontroll-Fibroblasten zu erkennen.





4.4.2 Der Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten wird durch Zugabe von PBN reduziert

Um den Befund zu untermauern, dass ROS das Kontraktionsvermögen von Fibroblasten in einem Typ 1 Kollagengel beeinflussen, wurde in einem zweiten experimentellen Ansatz die Kontraktion von Kontroll- und KSS-Fibroblasten in Gegenwart der antioxidativen Substanz N-tert-Butyl- α -phenylnitron (PBN) untersucht. Wie in Abb. 4.15 ersichtlich, wurde der Gehalt an ROS im Zytosol bei Zugabe dieser antioxidativen Substanz sowohl bei den Kontroll- als auch bei den KSS-Fibroblasten auf 77,0 ± 4,2% bzw. 69,7 ± 7,5% reduziert. Der oxidative Status der Zellen in bzw. an den Mitochondrien dagegen wurde durch Zugabe von PBN nicht beeinflusst.



Ein Vergleich der Synthese dermaler Äquivalente mit und ohne Zugabe von PBN zeigte sowohl bei den Kontroll- als auch bei den KSS-Äquivalenten eine Reduktion der Kontraktionsgeschwindigkeit. Abb. 4.16 zeigt exemplarisch die Größe der Äquivalente sechs Stunden nach Kontraktionsbeginn.



Um zu untersuchen, ob sich auch der Kontraktionsunterschied zwischen den Kontroll- und KSS- Äquivalenten bei Zugabe von PBN ändert, wurde wiederum die Größe der KSS-Äquivalente ohne bzw. mit PBN auf die Größe der Kontroll-Äquivalente im korrespondierenden Experiment normiert. Diese Darstellung der prozentualen Größe der KSS-Äquivalente zeigt, dass der Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Äquivalenten bei Zugabe von PBN geringer wurde (Abb. 4.17).



Abb. 4.17: Vergleich des Kontraktionsunterschieds zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten im dermalen Äquivalent mit und ohne Zugabe der antioxidativen Substanz PBN Gezeigt ist jeweils die prozentuale Größe der KSS-Äquivalente bezogen auf die Größe der Kontroll-Äquivalente ohne und mit PBN; pro Zeitpunkt sind jeweils Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt (n=3, *p<0,05, **p<0,01); in jedem Experiment wurden Fibroblasten von zwei KSS-Patienten (KSS95, KSS96) und von zwei gesunden Spendern (F102, F107) verwendet; pro Zelltyp wurde die Kontraktion von drei Äquivalenten ohne bzw. mit PBN detektiert

Demnach deutet die Synthese dermaler Äquivalente mit PBN ebenfalls darauf hin, dass der bei den KSS-Fibroblasten signifikant erhöhte ROS-Level am schnelleren Kontraktionsverhalten dieser Zellen im dreidimensionalen Kollagengel beteiligt ist.

4.5 Welcher molekulare Mechanismus liegt dem ROSvermittelten Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten zugrunde?

Die Beteiligung von ROS am schnelleren Kontraktionsvermögen mtDNS-geschädigter KSS-Fibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel wirft die Frage auf, welcher molekulare Mechanismus diesem Zusammenhang zugrunde liegt. Im Folgenden wurde daher untersucht, welche Faktoren das gesteigerte Kontraktionsvermögen der KSS-Fibroblasten vermitteln könnten.

4.5.1 KSS-Fibroblasten zeigen im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten keinen Unterschied in MMP1- oder TIMP1-Expression

Es wäre denkbar, dass eine ROS-vermittelte Regulation von Matrixmetalloproteinasen eine Rolle spielt, da bereits bekannt ist, dass MMPs für den Umbau der Matrix während des Kontraktionsprozesses unerlässlich sind (Scott *et al.* 1998). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zur Induktion der Kollagen Typ 1 degradierenden MMP1 führt (Schroeder *et al.* 2007). Daher wurde die Expression von MMP1 und dem spezifischen MMP1-Inhibitor TIMP1 bei Kontroll- und KSS-Fibroblasten analysiert. Abb. 4.18.A zeigt den relativen mRNS-Gehalt von MMP1 und TIMP1 von Monolayer-KSS-Fibroblasten bezogen auf die Expression dieser Gene in Monolayer-Kontroll-Fibroblasten. Weder die Expression von MMP1 und KSS-Fibroblasten. Weder die Expression von MMP1 und KSS-Fibroblasten. Weder die Expression von MMP1 noch die von TIMP1 zeigte eine unterschiedliche Expression auf mRNS-Ebene zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten. Weiterhin wurde der relative Gehalt von MMP1 im Überstand der Fibroblasten mittels ELISA detektiert (Abb. 4.18.B). Auch hier ist kein Unterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten erkennbar.



Abb. 4.18: Relative Expression von MMP1 und TIMP1 in Monolayer-Fibroblasten (A) gezeigt ist die relative mRNS-Expression von MMP1 und TIMP1 in Monolayer-Fibroblasten; nach Isolierung der RNS aus konfluenten Kontroll- und KSS-Fibroblasten wurde die relative Expression von MMP1 und TIMP1 auf mRNS-Ebene mittels semi-quantitativer Real-Time-PCR detektiert; als internes Referenzgen diente die 18sRNS; gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung (n=4); in jedem Experiment wurden Fibroblasten von zwei gesunden Spendern (F102, F107) und von zwei KSS-Patienten (KSS95, KSS96) verwendet; (B) gezeigt ist der relative Gehalt von MMP1 im Überstand von Monolayer-Fibroblasten wurde mittels ELISA detektiert; gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung (n=3); in jedem Experiment wurden Fibroblasten von zwei gesunden Spendern (F102, F107) und von zwei KSS-Patienten (KSS95, KSS96) verwendet

Da die Expression von MMPs eng mit der Umgebung der Zellen verbunden ist, kann sich die Expression von Monolayer-Fibroblasten von der Expression von Fibroblasten unterscheiden, die in ein dreidimensionales Kollagengel eingesät wurden. Daher wurde ebenfalls die mRNS-Expression von MMP1 und TIMP1 sowie der Gehalt von MMP1 im Überstand von Fibroblasten untersucht, die ein dreidimensionales Kollagengel kontrahierten. Auch sechs Stunden nach Kontraktionsbeginn, ein Zeitpunkt der phänotypisch große Unterschiede im Kontraktionsverhalten von KSS- und Kontroll-Äquivalenten zeigte, war keine Regulation von MMP1 oder TIMP1 zu erkennen (Abb. 4.19). Eine Beteiligung von MMP1 am ROS-vermittelten Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten ist daher unwahrscheinlich.



Abb. 4.19: Relative Expression von MMP1 und TIMP1 in Fibroblasten eines dermalen Äquivalents sechs Stunden nach Kontraktionsbeginn (A) gezeigt ist die relative mRNS-Expression von MMP1 und TIMP1 in Fibroblasten eines dermalen Äquivalents 6 h nach Kontraktionsbeginn; nach Isolierung der RNS aus Kontroll- und KSS-Fibroblasten eines dermalen Äquivalents wurde die relative Expression von MMP1 und TIMP1 auf mRNS-Ebene mittels semi-quantitativer Real-Time-PCR detektiert; als internes Referenzgen diente die 18sRNS; gezeigt ist jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung (n=4); in jedem Experiment wurden Fibroblasten von zwei gesunden Spendern (F102, F107) und von zwei KSS-Patienten (KSS95, KSS96) verwendet; (B) gezeigt ist der relative Gehalt von MMP1im Überstand von dermalen Äquivalenten 6 h nach Kontraktionsbeginn wurde mittels ELISA detektiert; gezeigt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3); in jedem Experiment wurden Fibroblasten von zwei gesunden Spendern (F102, F107) und von zwei KSS-Patienten (KSS95, KSS96) verwendet

4.5.2 KSS- und Kontroll-Fibroblasten besitzen eine vergleichbare Ausstattung der Integrinuntereinheiten α2 und β1

Für eine Umorganisation von Kollagenfasern im Kontraktionsprozess spielen ebenfalls Integrine als Oberflächenrezeptoren der Fibroblasten eine wichtige Rolle. Sie ermöglichen sowohl den Kontakt zwischen Fibroblasten und Kollagenfasern als auch die Kommunikation der Zellen untereinander. Zusätzlich fungieren sie als Sensoren, die die Zellen über den Spannungsstatus ihrer dreidimensionalen Umgebung informieren (Hynes 1992). Da bereits bekannt ist. dass bei der Kontraktion eines Typ I Kollagengels die Integrinrezeptoruntereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ beteiligt sind (Klein *et al.* 1991), wurde untersucht, ob eine bei KSSund Kontroll-Fibroblasten unterschiedliche Expression dieser Untereinheiten den ROS-vermittelten Kontraktionsunterschied dieser Zellen erklären könnte. Abb. 4.20 zeigt die durchflusszytometrisch detektierte Expression der beiden Untereinheiten bei Kontroll- und KSS-Fibroblasten. Unter Berücksichtigung der Eigenfluoreszenz der



ungefärbten Zellen war kein Unterschied in der Integrinexpression der beiden Untereinheiten $\alpha 2$ und $\beta 1$ detektierbar.

4.5.3 Eine erhöhte Lysyloxidase-Expression ist am gesteigerten Kontraktionsvermögen der KSS-Fibroblasten beteiligt

Die für die Quervernetzung von Kollagenfasern verantwortliche Lysyloxidase spielt für den Kontraktionsprozess eines dreidimensionalen Kollagengels ebenfalls eine wichtige Rolle. Es ist bereits bekannt, dass eine Inhibition dieses Enzyms die Kontraktion verlangsamt (Woodley *et al.* 1991). Um zu überprüfen, ob eine unterschiedliche Regulation von LOX am ROS-vermittelten schnelleren Kontraktionsvermögen von KSS-Fibroblasten beteiligt sein könnte, wurde daher die Expression der Lysyloxidase bei Kontroll- und KSS-Fibroblasten verglichen.

In Abb. 4.21 ist der relative mRNS-Gehalt von LOX von Monolayer-KSS-Fibroblasten bezogen auf die Expression des Gens in Monolayer-Kontroll-Fibroblasten ersichtlich. Der mRNS-Gehalt von LOX war in KSS-Fibroblasten deutlich erhöht.



Um zu untersuchen, ob die erhöhte mRNS-Expression des für die Quervernetzung der Kollagenfasern verantwortlichen Enzyms LOX am schnelleren Kontraktionsvermögen der KSS-Fibroblasten beteiligt ist, wurde die Synthese dermaler Äquivalente bei Zugabe des LOX-Inhibitors BAPN untersucht. Dabei wurden die behandelten Zellen zusätzlich zur Applikation von BAPN zum Kontraktionsmedium 36 Stunden mit dem LOX-Inhibitor vorinkubiert. Abb. 4.22 zeigt die prozentuale Größe der KSS-Äquivalente ohne bzw. mit BAPN nach Normierung auf die Größe der Kontroll-Äquivalente im korrespondierenden Experiment. Der Kontraktionsunterschied zwischen Kontroll- und KSS-Äquivalenten wurde bei Zugabe des LOX-Inhibitors BAPN deutlich geringer. Bereits zwei Stunden nach Kontraktionsbeginn betrug die Fläche der KSS-Äquivalente, die ohne BAPN synthetisiert wurden nur noch 59,1 \pm 7,3% der Fläche der Kontroll-Äquivalente, während die Fläche der KSS-Äquivalente bei Zugabe von BAPN zu diesem Zeitpunkt noch 89,2 \pm 4,0% der Fläche der Kontroll-Äquivalente bei Zugabe nach Kontroll-Äquivalente bei Zugabe kontroll-Äquivalente betrug. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die erhöhte LOX-Expression der KSS-Fibroblasten am ROS-vermittelten stärkeren Kontraktionsvermögen dieser Zellen im dreidimensionalen Kollagengel beteiligt ist.



Die Viabilität der mit BAPN vorinkubierten Kontroll- und KSS-Fibroblasten wurde im Durchflusszytometer durch Annexin-V-PI-Färbung überprüft (Abb. 4.23). Der Anteil apoptotischer KSS- bzw. Kontroll-Fibroblasten betrug auch bei einer Inkubation der Zellen mit BAPN für 36 Stunden unter 10%. Ein Unterschied in der Viabilität von KSS- und Kontroll-Fibroblasten ist somit nicht zu erkennen.



65

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der die Expression von LOX regulieren kann, ist der "hypoxia inducible factor 1" (Hif1), ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der für die Transkriptionsregulation sowohl unter hypoxischen Bedingungen als auch bei oxidativem Stress wichtig ist. In Abb. 4.24 ist die relative mRNS-Expression der Sauerstoff-sensitiven α -Untereinheit in KSS-Fibroblasten in Bezug zur Hif1 α -Expression der Kontroll-Fibroblasten dargestellt. Der mRNS-Gehalt von Hif1 α in KSS-Fibroblasten zeigte eine Aufregulation gegenüber der mRNS-Expression der Kontroll-Fibroblasten. Es ist somit denkbar, dass die verstärkte LOX-Expression in den KSS-Fibroblasten durch den Transkriptionsfaktor Hif1 reguliert wird.



5 Diskussion

Der Alterungsprozess, der durch morphologische, funktionale und biochemische Veränderungen auf Zell- und Organebene charakterisiert ist, ist zusätzlich mit dem Auftreten von mtDNS-Deletionen und einem erhöhten oxidativen Stress assoziiert. Ob und inwieweit eine kausale Verknüpfung zwischen diesen Befunden existiert, ist noch nicht geklärt.

Diese Arbeit beschäftigt sich daher mit der Untersuchung des Kausalzusammenhangs von mtDNS-Deletionen, oxidativem Stress und Alterungsphänotypen. Die vorliegenden Daten zeigen, dass ein mit mtDNS-Schädigung assoziierter, erhöhter oxidativer Stress kausal an der Veränderung zellulärer Eigenschaften beteiligt ist und liefern somit wichtige Hinweise bei der Analyse wie Veränderungen der mtDNS die Induktion von alterungsassoziierten Prozessen bewirken könnten. Die vorliegenden Daten bestätigen damit die mitochondriale Theorie des Alterns, die besagt, dass letztlich eine durch mtDNS-Schädigung induzierte Akkumulation oxidativer Schäden Ursache des Alterns ist (Harman 1956). Dies ist von großer Bedeutung, da die bis jetzt gezeigten Befunde, die die mitochondriale Theorie des Alterns unterstützen, ausschließlich assoziativer Art sind. Im Gegensatz zur Literatur konnte hier nicht nur gezeigt werden, dass der in Fibroblasten von Kearns-Sayre-Syndrom Patienten um den Faktor 10⁴ höhere Gehalt der mitochondrialen Common Deletion mit einer signifikanten Zunahme von ROS assoziiert ist, sondern auch, dass dieser nahezu doppelt so große oxidative Stress zu zellulären Veränderungen führt.

Es ist möglich, dass dieser signifikant erhöhte ROS-Gehalt der KSS-Fibroblasten kausal durch den intrinsisch hohen Gehalt der mitochondrialen Common Deletion verursacht wird, da der aufgrund der mtDNS-Deletionen entstehende Informationsverlust für die Synthese von Atmungskettenkomplexen zu einer Assemblierung defekter Atmungsketten führen kann. Dies wiederum verursacht eine vermehrte Freisetzung von Elektronen, die die Bildung von ROS zur Folge haben kann. Dieser Theorie entsprechend ist schon mehrfach gezeigt worden, dass das Vorhandensein mitochondrialer Deletionen mit einem erhöhten oxidativen Stress assoziiert ist (Wei *et al.* 2001; Jou *et al.* 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lassen jedoch keine Aussage darüber zu, ob zwischen der mtDNS-Schädigung der KSS-Fibroblasten und dem in diesen Zellen signifikant verstärkten oxidativem Stress ein kausaler oder nur ein assoziativer Zusammenhang besteht. Es wäre ebenfalls denkbar, dass der erhöhte ROS-Gehalt zytosolischen Ursprungs ist und nicht ausschließlich auf die Mitochondrien zurückzuführen ist. Dieser Hypothese entsprechend
konnte bereits gezeigt werden, dass die biochemische Proteasom-Aktivität in mtDNS-Deletions-tragenden Zellen von KSS-Patienten vermindert ist (Alemi *et al.* 2007) und eine Inhibition des Proteasoms in neuronalen Zellen zu einer verstärkten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt (Papa *et al.* 2007). Der Befund, dass nicht nur in bzw. an den Mitochondrien sondern auch im Zytosol der Gehalt an ROS in den KSS-Fibroblasten nahezu doppelt so groß ist wie in den Kontroll-Fibroblasten, deutet darauf hin, dass der verstärkte oxidative Stress sowohl mitochondrialen als auch zytosolischen Ursprungs ist.

Die vorliegenden Daten zeigen eindeutig, dass der in den mtDNS-geschädigten Fibroblasten signifikant erhöhte oxidative Stress kausal zu zellulären Veränderungen führt, wie am Beispiel der Kontraktionsfähigkeit der Zellen im dreidimensionalen Kollagengel beobachtet werden konnte. Die KSS-Fibroblasten besitzen im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten mit einem geringen Basislevel der mitochondrialen Common Deletion ein signifikant stärkeres Kontraktionsvermögen. Dieses zeigte sich bereits zwei Stunden nach Kontraktionsbeginn und konnte darüber hinaus auch an allen später untersuchten Zeitpunkten detektiert werden.

Die Hypothese, dass dieses veränderte physiologische Verhalten der KSS-Fibroblasten kausal durch ihren signifikant erhöhten oxidativen Stress vermittelt wurde, konnte in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen bestätigt werden. Sowohl die Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks als auch die Zugabe des Antioxidanz PBN reduzierte den Kontraktionsunterschied zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten. Der Befund, dass PBN den Gehalt reaktiver Sauerstoffspezies im Zytosol, nicht aber in bzw. an den Mitochondrien reduziert. zeigt, dass der oxidative Status der Zellen im Zytosol für den Kontraktionsunterschied zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten entscheidend ist. Auch die Literatur unterstützt die Bedeutung von ROS für den Kontraktionsprozess, da gezeigt wurde, dass ein artifiziell veränderter oxidativer Status von mesangialen Zellen die Kontraktion eines dreidimensionalen Kollagengels beeinflusst (Zent et al. 1999). Sowohl die extrazelluläre Zugabe von ROS in Form von H₂O₂ als auch die intrazelluläre Induktion eines gesteigerten ROS-Gehalts z.B. durch Inhibition des antioxidativen Enzyms Katalase führte zu einem gesteigerten Kontraktionsvermögen der mesangialen Zellen.

Um die Bedeutung einer ROS-vermittelten Änderung der Kontraktionsfähigkeit mtDNSgeschädigter KSS-Fibroblasten für den Prozess der Hautalterung zu charakterisieren, müssen die molekularen Mechanismen untersucht werden, die den erhöhten oxidativen Stress dieser Zellen in ein schnelleres Kontraktionsvermögen umsetzen. Daher wurden verschiedene Faktoren untersucht, deren Bedeutung für den Kontraktionsprozess bereits gezeigt wurde. Es ist bekannt, dass eine Inhibierung von MMPs die Kontraktion eines dreidimensionalen Kollagengels verlangsamt (Myers & Wolowacz 1998). Daher wurde überprüft, ob eine unterschiedliche MMP-Ausstattung von KSS- und Kontroll-Fibroblasten am ROS-vermittelten Kontraktionsunterschied beteiligt sein könnte. Dies ist denkbar, da ebenfalls gezeigt werden konnte, dass reaktive Sauerstoffspezies mitochondrialen Ursprungs eine Aufregulation der Kollagen Typ 1 degradierenden MMP1 bewirken können (Schroeder *et al.* 2007). Den vorliegenden Daten zufolge ist eine Beteiligung von MMP1 am gesteigerten Kontraktionsvermögen der mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten jedoch unwahrscheinlich. In der mRNS-Expression von MMP1 besteht weder bei einer Kultivierung der Fibroblasten im Monolayer, noch sechs Stunden nach Kontraktionsbeginn des dreidimensionalen Kollagengels ein Unterschied zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten. Ebenso zeigt die mRNS-Expression des MMP1-Inhibitors TIMP1 zu diesen Zeitpunkten keine signifikante Veränderung zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten.

Neben einer vermehrten Expression von MMP1 könnte auch ein verminderter MMP1-Abbau in einer erhöhten Aktivität resultieren, so dass ebenfalls der Proteingehalt im Überstand überprüft wurde. Auch hier war jedoch kein Unterschied zwischen Kontroll- und KSS-Fibroblasten erkennbar. Um eine Beteiligung von MMP1 am ROS-vermittelten Kontraktionsvermögen zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten allerdings definitiv ausschließen zu können, muss die Aktivität dieser Proteinase überprüft werden. Außerdem gilt zu berücksichtigen, dass MMP1 nur eine Proteinase der MMP-Familie ist, der Kollagen Typ 1 als Substrat dient. Auch MMP8 und MMP13 haben unter anderem Kollagen Typ 1 als Substrat. Um eine Beteiligung der MMP-Familie am stärkeren Kontraktionsvermögen der KSS-Fibroblasten auszuschließen, bedarf es daher weiterer Experimente, die die Aktivität weiterer Mitglieder der MMP-Familie überprüfen.

Neben der Bedeutung von MMPs für den Kontraktionsprozess ist ebenfalls gezeigt worden, dass Integrine als Oberflächenrezeptoren der Fibroblasten für diesen Vorgang unerlässlich sind (Jenkins *et al.* 1999). Es ist bekannt, dass für die Kontraktion eines dreidimensionalen Kollagen Typ 1 Gels der Integrin- Rezeptorkomplex $\alpha 2\beta 1$ notwendig ist. Durch die hier vorliegenden Daten konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass der Integrinkomplex $\alpha 2\beta 1$ an dem hier beobachteten ROS-vermittelten Kontraktionsunterschied zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten beteiligt ist. Unter Berücksichtigung der Eigenfluoreszenz von KSSund Kontroll-Fibroblasten konnte keine unterschiedliche $\alpha 2\beta 1$ -Integrin-Ausstattung gezeigt werden. Allerdings ist die Integrinexpression mit der Umgebung der Zellen eng verbunden (Klein *et al.* 1991). Um eine Beteiligung dieses Rezeptorkomplexes am Kontraktionsunterschied ausschließen zu können, muss daher zusätzlich die $\alpha 2\beta$ 1-Integrin-Expression der Fibroblasten während des Kontraktionsprozesses z.B. sechs Stunden nach Kontraktionsbeginn untersucht werden, ein Zeitpunkt der phänotypisch große Unterschiede im Kontraktionsverhalten zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten zeigt.

Ein weiterer für die Kontraktion entscheidender Faktor ist die für die Quervernetzung von Kollagenfasern verantwortliche Lysyloxidase, deren Inhibition den Kontraktionsprozess verlangsamt (Woodley et al. 1991). Im Gegensatz zu MMP1 und Integrin a2\beta1, deren Beteiligung am ROS-vermittelten Kontraktionsunterschied zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten unwahrscheinlich ist, zeigen die vorliegenden Daten, dass dieses Enzym einen Einfluss auf den Kontraktionsunterschied hat. Ein Vergleich der LOX-Expression von KSSund Kontroll-Fibroblasten zeigte eine erhöhte mRNS-Expression dieses Enzyms in den KSS-Fibroblasten. Dieser Befund bestätigt mit Hilfe von Microarrays gewonnene Ergebnisse der Literatur, die ebenfalls eine Aufregulation der Lysyloxidase in mtDNS-Deletions-tragenden Zellen von KSS-Patienten zeigen konnten (Alemi et al. 2007). Die funktionelle Relevanz dieser verstärkten mRNS-Expression für den Kontraktionsunterschied wurde durch die Synthese von Äquivalenten in Anwesenheit des LOX-Inhibitors BAPN bestätigt. Eine Inkubation von KSS- und Kontroll-Fibroblasten mit BAPN führte zu einer Verringerung des Kontraktionsunterschiedes. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass dieses Enzym am stärkeren Kontraktionsvermögen der KSS-Fibroblasten beteiligt ist. Es sind jedoch zusätzliche Experimente notwendig, bei denen neben dem LOX-Proteingehalt vor allem die Aktivität der Lysyloxidase in KSS- und Kontroll-Fibroblasten mit und ohne den LOX-Inhibitor BAPN verglichen wird.

Dass die in mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten veränderte LOX-mRNS-Expression sowie die funktionelle Beteiligung dieses Enzyms am Kontraktionsunterschied entscheidende Hinweise bei der Analyse von alterungsassoziierten Prozessen liefern könnte, wird durch mehrere Befunde der Literatur unterstützt. Es ist beispielsweise bekannt, dass unmittelbar vor Einsetzten der Seneszenz bei Fibroblasten von Progeria-Patienten eine Aufregulation der Lysyloxidase beobachtet werden kann, was zu der Hypothese führt, dass die Regulation dieses Enzyms im Alterungsprozess involviert ist (Sharma *et al.* 1997). Auch die immunhistochemische Lokalisation der Lysyloxidase in normaler menschlicher Haut unterstützt ihre mögliche Beteiligung im Prozess der Hautalterung, da gezeigt wurde, dass die Expression in der Gesichtshaut am höchsten ist (Kobayashi *et al.* 1994). Da die Gesichtshaut im Vergleich zu allen anderen Bereichen der menschlichen Haut deutlich stärker lichtexponiert ist, könnte dies ein Hinweis darauf sein, das die Regulation der LOX-Expression im Zusammenhang mit der Lichtalterung der Haut steht.

Die Bedeutung der anhand der LOX-Expression beobachteten Genregulierung der KSS-Fibroblasten ergibt sich außerdem aus der Frage, ob diese veränderte Genexpression der mtDNS-geschädigten Zellen genau wie ihr gesteigertes Kontraktionsvermögen auf den erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen sein könnte. Dies ist denkbar, da LOX ein Zielgen des Transkriptionsfaktors Hifl ist, der nicht nur für die Genregulierung unter hypoxischen Bedingungen, sondern auch bei oxidativem Stress verantwortlich ist (Erler et al. 2006). ROS stabilisieren die unter normalen Sauerstoff-Bedingungen abgebaute Hifla-Untereinheit von Hifl und ermöglichen so eine Assemblierung von Hifla mit der konstitutiv vorhandenen Hif1^β-Untereinheit. Dadurch kann ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor gebildet werden, der zu einer positiven Regulation des Zielgens LOX führen kann (Erler et al. 2006). Um zu bestätigen, dass die veränderte Genexpression der KSS-Fibroblasten auf ihren erhöhten oxidativen Stress zurückzuführen ist, sind jedoch zusätzliche Experimente notwendig, die eine Stabilisierung von Hiflα in den KSS-Zellen zeigen. Außerdem muss überprüft werden, ob eine Verminderung des erhöhten oxidativen Stresses in den KSS-Fibroblasten die postulierte Stabilisierung von Hifla sowie die Aufregulation von LOX inhibiert und dies wiederum zu einer Verminderung des Kontraktionsunterschieds zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten führt. Erste Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen bereits, dass eine Inkubation der Fibroblasten mit dem Antioxidanz N-Acetyl-Cystein den mRNS-Expressionsunterschied von LOX zwischen KSS- und Kontroll-Fibroblasten minimiert. Dieser Befund wird zusätzlich durch Literaturdaten unterstützt, die zeigen konnten, dass eine UVB-induzierte Aufregulation von Hiflα durch Inkubation mit N-Acetyl-Cystein verhindert wird (Rezvani et al. 2007).

Die Hypothese, dass die in den KSS-Zellen vermehrt detektierten ROS zu einer Stabilisierung von HIF1a und dadurch zu einer Induktion von LOX führen, wird weiterhin durch die positive Regulation weiterer Hif1-Zielgene unterstützt. Auch VEGF und Interleukin 8 (IL-8), beides Zielgene des Transkriptionsfaktors Hif1, werden in den KSS-Fibroblasten verstärkt exprimiert (persönliche Kommunikation mit Dr. M. Majora). Dies ist ein interessanter Aspekt bei der Analyse der molekularen Zusammenhänge zwischen oxidativem Stress und Hautalterung, da sowohl VEGF als auch IL-8 im Alterungsprozess von großer Bedeutung sind. Ein charakteristisches Merkmal der Hautalterung ist die Neoangiogenese, ein Prozess der vor allem durch VEGF, aber auch durch IL-8 vermittelt wird. Außerdem spielt IL-8 auch

bei Entzündungsprozessen eine Rolle, die während der Hautalterung beobachtet werden können. So konnte gezeigt werden, dass IL-8 durch UVB induziert wird (Pernet *et al.* 1999), was vermuten lässt, dass IL-8 bei Alterungsprozessen der Haut involviert ist, die durch vermehrte Sonnenexposition verursacht werden.

Die Bedeutung einer möglichen Hif1-Regulierung in den mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten für die Analyse alterungsassoziierter Prozesse wird ebenfalls durch die Rolle von Hif1 in pathologischen Prozessen unterstützt. Zum Beispiel wurde in Keratinozyten eine Induktion von Hif1 α durch UVB beobachtet, was eine Bedeutung dieses ROS-sensitiven Transkriptionsfaktors für die Lichtalterung der Haut vermuten lässt (Rezvani *et al.* 2007).

Die hier verwendeten mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten zeigen nicht nur ein durch ihren erhöhten ROS-Gehalt vermitteltes gesteigertes Kontraktionsvermögen sowie eine wahrscheinlich ROS-vermittelte veränderte Genexpression, sondern unterscheiden sich außerdem in ihrer Morphologie von normalen Kontroll-Fibroblasten. Während die Kontroll-Fibroblasten die für diesen Zelltyp charakteristische lang gestreckte, spindelförmige Morphologie besitzen, zeigen die KSS-Fibroblasten eine trapezförmige Zellform und eine Reduzierung der charakteristischen Zellfortsätze. Dieser Befund unterstützt die Idee, die mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten als mögliches Alterungsmodell zu verwenden, da diese Morphologie dem in der Literatur beschriebenen Seneszenz- Phänotyp von Fibroblasten entspricht (Hutter *et al.* 2004; Zwerschke *et al.* 2003). Es ist demnach denkbar, dass die mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten *in vitro* gealterten Fibroblasten ähneln, was die Bedeutung einer mtDNS-Schädigung für den Alterungsprozess unterstreicht.

Zusätzlich wird dieser möglicherweise Seneszenz-ähnliche Phänotyp durch die beobachtete erhöhte Granularität und Eigenfluoreszenz der KSS-Fibroblasten unterstützt. Es ist bereits mehrfach gezeigt worden, dass es in alternden Zellen zur Akkumulation von unlöslichem, fluoreszierendem Material kommt, das als Lipofuszin, Ceroid oder Alters-Pigment-ähnliches Fluorophor bezeichnet wird (Grune 2000; Yin 1996). Die Entstehung solcher fluoreszierenden Granula könnte ebenfalls auf den in den KSS-Fibroblasten vermehrten oxidativen Stress zurückzuführen sein. Es wird vermutet, dass ROS an der initialen Bildung von fluoreszierenden oxidierten bzw. quervernetzten Aggregaten beteiligt sind und somit entscheidend zu ihrer Entstehung beitragen (Grune 2000; Yin 1992). Der Grund hierfür ist, dass die oxidative Schädigung von Proteinen durch ROS die Zugänglichkeit der Proteine für den proteolytischen Abbau verändern kann, was letztlich zur Aggregation der Substrat-Proteine führt. Die hier vorliegenden Daten erlauben jedoch keine Aussage darüber, inwieweit

Diskussion

die in den KSS-Fibroblasten beobachteten Granula kausal auf den signifikant erhöhten oxidativen Stress dieser Zellen zurückzuführen sind. Dennoch könnte ein Vergleich der Eigenschaften der Seneszenz-ähnlichen KSS-Fibroblasten mit Passagen-gleichen Kontroll-Fibroblasten interessante Hinweise auf alterungsassoziierte zelluläre Veränderungen liefern. Im Gegensatz zu anderen Studien, in denen zunächst ein Seneszenz-ähnlicher Phänotyp der Fibroblasten durch eine wiederholte *in vitro* Passagierung der Zellen induziert werden muss, können die mtDNS-geschädigten KSS-Fibroblasten direkt auf alters-relevante Merkmale untersucht werden, die möglicherweise mit einem Seneszenz-ähnlichen Phänotyp assoziiert sind (Hutter *et al.* 2004).

Es wird deutlich, dass das hier verwendete Modellsystem eines Hautäquivalents erhebliche Vorteile gegenüber Untersuchungen an konventionellen zweidimensionalen Zellkulturen oder *in vivo* durchgeführten Studien liefert.

Ein großer Vorteil gegenüber einer konventionellen zweidimensionalen Zellkultur beispielsweise ist die im Hautäquivalent *in vivo* ähnliche Umgebung der kultivierten Fibroblasten, die in eine Kollagenmatrix eingesät werden, die der extrazellulären Matrix in der Dermis der Haut entspricht (Bell *et al.* 1983). In dieser dreidimensionalen, ihrer natürlichen Situation ähnlichen Umgebung können die Fibroblasten anschließend mehrere Wochen kultiviert werden, wie die hier vorliegenden Daten bestätigen konnten. In einer konventionellen zweidimensionalen Zellkultur dagegen werden die Fibroblasten in einem artifiziellen System untersucht, das nicht ihrer natürlichen Umgebung in der Dermis der Haut entspricht. Aufgrund der hier fehlenden physiologischen Bedingungen ist eine Aussage über die *in vivo* Relevanz der in einer konventionellen zweidimensionalen Zellkultur gefundenen Daten schwierig zu treffen.

Ein Vergleich mit *in vivo* durchgeführten Studien an menschlicher Haut bzw. mit Tierversuchen zeigt, dass *in vivo* Studien zwar eine hohe physiologische Relevanz besitzen, jedoch sowohl mit ethischen Problemen als auch mit Grenzen in der praktischen Durchführbarkeit verbunden sind. Eine genetische Manipulation der Zellen ist z.B. nur bedingt im Rahmen von Tierversuchen möglich.

Das hier gewählte Modellsystem eines Hautäquivalents dagegen umgeht sowohl die mit *in vivo* Studien verbundenen Limitationen als auch die in einer konventionellen zweidimensionalen *in vitro* Zellkultur fehlende *in vivo* Relevanz. Trotz der hohen *in vivo* Relevanz des Hautäquivalentmodells werden ethische Probleme vermieden und es ist möglich, das System vielfältig zu manipulieren. Die vorliegenden Daten beispielsweise

bestätigen, dass eine Modifikation durch den Einbau von mtDNS-geschädigten Fibroblasten möglich ist.

Durch die Wahl des in dieser Arbeit verwendeten Modellsystems eines Hautäquivalents können demnach mtDNS-geschädigte Fibroblasten in einer ihrer natürlichen Situation entsprechenden Umgebung untersucht werden, wodurch vor allem eine Analyse äußerst komplexer Zusammenhänge ermöglicht wird, die im Vergleich dazu in einem artifiziellen zweidimensionalen Modellssystem bzw. durch in vivo Studien nur schwer durchführbar ist. Ein Beispiel hierfür ist die Analyse des "Teufelskreises", der aufgrund von in vivo Studien für das Verhalten von mtDNS-Deletionen postuliert wird (Berneburg et al. 2004). Es konnte gezeigt werden, dass ein durch repetitive UVA-Strahlung induzierter initial niedriger Gehalt der mitochondrialen Common Deletion nach Beendigung der Bestrahlung in vivo weiter zunimmt. Als Ursache wird ein "Teufelskreis" postuliert, in dem der Gehalt einer mtDNS-Schädigung selbstverstärkend im Zuge einer positiven Rückkopplung weiter zunimmt. Der durch die Deletionen in der mtDNS verursachte Informationsverlust kann zur Expression defekter Atmungskettenproteine führen, die eine defekte Atmungskette oder eine Verringerung der Atmungskettenkapazität verursachen können und somit eine vermehrte Elektronen-Freisetzung bedingen. Diese ist mit der Bildung weiterer ROS assoziiert, die wiederum als zelluläre Noxe zu einer Schädigung der mtDNS führen können. Dies bewirkt letztlich eine Zunahme des Gehalts der mtDNS-Schädigung wie sie von Berneburg et al., 2004 in vivo beobachtet werden konnte.

Eine Bestätigung dieses postulierten "Teufelskreises" mit Hilfe von *in vitro* Studien ist jedoch nur möglich, wenn die Zellen in einer möglichst physiologischen Umgebung untersucht werden, die ein *in vivo* ähnliches Wachstumsverhalten ermöglicht. Das Wachstumsverhalten der Zellen ist deshalb von entscheidender Bedeutung bei der Analyse des postulierten "Teufelskreises", da eine im Gegensatz zum natürlichen Verhalten der Zellen verstärkte Proliferation einen negativen Selektionsdruck verursacht. Dieser könnte eine Akkumulation von mtDNS-Deletionen verhindern, da die Common Deletion tragenden Fibroblasten aufgrund eines beeinträchtigten Energiestoffwechsels einem Wachstumsnachteil unterliegen könnten (Gattermann *et al.* 1995).

Da die im Monolayer kultivierten Fibroblasten bei Erreichen der Konfluenz regelmäßig passagiert werden, kommt es zu einer ständigen Proliferation der Zellen und somit zu einem Selektionsdruck. Dies könnte erklären, warum die hier vorliegenden Daten während der Kultivierung der KSS-Fibroblasten im Monolayer eine Abnahme der Common Deletion mit steigender Passagenzahl zeigen. Im Gegensatz dazu blieb der Anteil Common Deletion tragender mtDNS-Moleküle bei einer Kultivierung der Fibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel konstant. Grund könnte die *in vivo* ähnliche Umgebung der Fibroblasten im dreidimensionalen Kollagengel sein, die bewirkt, dass die Zellen ihrem natürlichen Verhalten entsprechend weniger proliferieren als im Monolayer.

Die Modifikation des hier verwendeten dermalen Äquivalents durch den Einbau Common Deletion tragender KSS-Fibroblasten entspricht somit erstmals einem Modell, das mit Hilfe von Langzeit-Studien eine *in vitro* Untersuchung des postulierten "Teufelskreises" ermöglichen könnte. Allerdings erlauben die hier gewonnenen Daten noch keine Aussage über die Existenz des "Teufelskreises", da hierfür wie bereits erläutert eine langfristige Analyse des mtDNS-Gehalts der in einem dermalen Äquivalent kultivierten KSS-Fibroblasten notwendig ist, die nicht Schwerpunkt dieser Arbeit war. Die hier analysierte Zeitspanne von drei Wochen ist entsprechend den *in vivo* Beobachtungen von Berneburg *et al.*, 2004 zu kurz.

Durch eine langfristige Kultivierung der KSS-Fibroblasten in einem Hautäquivalentmodell kann neben der Analyse des postulierten "Teufelskreises" auch überprüft werden, inwieweit sich die mtDNS-Schädigung der Fibroblasten in funktionellen und physiologischen Veränderungen niederschlägt, die möglicherweise eine Relevanz für alterungsassoziierte Phänomene einschließen. Molekulare, biochemische und morphologische Untersuchungen können zeigen, ob es zu einer Veränderung von Faktoren kommt, die für die Hautalterung charakteristisch sind. So ist z.B. eine immunochemische MMP- und Kollagen-Färbung von Interesse, da bereits bekannt ist, dass es im Alter zu einer zunehmenden Veränderung der extrazellulären Matrix kommt. Die im Alterungsprozess beobachtete Abnahme des Kollagengehalts (Shuster et al. 1975) wird vermutlicht durch eine Aufregulation von MMPs verursacht (Yaar & Gilchrest 2003) und trägt zu klinisch und histologisch sichtbaren Veränderungen wie Falten oder Schlaffheit bei, die für die gealterte Haut charakteristisch sind (Krutmann & Diepgen 2003). Auch die Akkumulation oxidierter Proteine ist ein Alterungscharakteristisches Merkmal (Sander et al. 2002; Widmer et al. 2006), so dass eine Analyse der Proteinoxidation von mtDNS-geschädigten Fibroblasten, die langfristig in einem Hautäquivalentmodell kultiviert wurden, Hinweise auf die Bedeutung von mtDNS-Deletionen für den Alterungsprozess liefern könnte.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die bei einer langfristigen Kultivierung mtDNS-geschädigter Fibroblasten im Hautäquivalent möglicherweise auftretenden Veränderungen mit der Schädigung des mitochondrialen Genoms im Zusammenhang stehen, muss neben dem Vergleich mit Kontroll-Äquivalenten auch der jeweilige Gehalt der mtDNS-Deletion zu den entsprechenden Zeitpunkten bestimmt werden. Die hier vorliegenden Daten bestätigen bereits, dass der Gehalt der mtDNS-Deletion in KSS-Fibroblasten durch den Einbau der Zellen in ein dreidimensionales Kollagengel nicht verändert wird, was eine unabdingbare Vorraussetzung ist. Auch während der in dieser Arbeit untersuchten drei Wochen war der Common Deletion Gehalt der Fibroblasten im Hautäquivalent ist dennoch eine genaue Analyse der Integrität des mitochondrialen Genoms zu allen später untersuchten Zeitpunkten unerlässlich.

Da Hautalterung vor allem durch pathologische Veränderungen der dermalen extrazellulären Matrix sowie der für ihre Synthese und ihren Abbau verantwortlichen Fibroblasten charakterisiert ist, kann anstelle eines Vollhautmodells wie im Rahmen dieser Arbeit ein vereinfachtes dermales Hautäquivalent verwendet werden. Die in der Dermis vorkommenden Fibroblasten besitzen eine relativ lange Lebensdauer, so dass eine Akkumulation von Schäden im Laufe der Zeit möglich ist. Die beim Vollhautäquivalentmodell zusätzlich aufgebrachten Keratinozyten, die durch Proliferation und Differenzierung das epidermale Kompartiment der Haut bilden, sind dagegen relativ kurzlebig, so dass eine Akkumulation von Schäden, die zum Alterungsprozess beitragen könnte, hier nur bedingt möglich ist (Jung 1998). Allerdings muss bei der Auswertung der mit einem dermalen Hautäquivalentmodell erzielten Daten berücksichtigt werden, dass in diesem vereinfachten Modell eine mögliche Wechselwirkung zwischen Dermis und Epidermis vernachlässigt wurde. Zur Überprüfung der *in vivo* Relevanz sollten daher die erzielten Ergebnisse mit einem Vollhautäquivalentmodell bestätigt werden.

Die in dieser Arbeit charakterisierten Fibroblasten von Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom lieferten demnach sehr interessante Hinweise auf die molekularen Zusammenhänge von mtDNS-Mutationen, oxidativem Stress und Hautalterung. Es konnte gezeigt werden, dass die vermehrt vorhandenen Deletionen in der mtDNS dieser Zellen mit einem erhöhten oxidativem Stress assoziiert sind. Dies wiederum führt zu einem veränderten physiologischen Verhalten dieser Fibroblasten wie hier am Beispiel ihrer Kontraktionsfähigkeit im dreidimensionalen Kollagengel gezeigt werden konnte.

6 Zusammenfassung

Gealterte Haut besitzt im Vergleich zu junger Haut einen erhöhten Anteil mitochondrialer DNS-Mutationen, die der mitochondrialen Theorie des Alterns zufolge letztlich für den Prozess der Alterung verantwortlich sind. Auf welche Weise mtDNS-Mutationen zu den molekularen, strukturellen und funktionalen Veränderungen in gealterter Haut beitragen, ist bisher vollkommen unklar. Da bei der Hautalterung vor allem deutliche Unterschiede in der extrazellulären Matrix von gealterter und junger Haut zu finden sind, ist das Verhalten von mtDNS-geschädigten Fibroblasten in einer ihrer natürlichen Situation ähnlichen Umgebung ein interessanter Aspekt bei der Aufklärung der der Hautalterung zugrunde liegenden Mechanismen.

Um zu prüfen, ob und wie mtDNS-Mutationen kausal am Alterungsprozess beteiligt sind, wurden daher im Rahmen dieser Arbeit humane dermale Fibroblasten von Patienten mit Kearns-Sayre-Syndrom untersucht, einer mitochondrialen Krankheit, die auf große Deletionen in der mtDNS zurückzuführen ist. Diese Fibroblasten besitzen im Gegensatz zu Kontroll-Fibroblasten von altersgleichen gesunden Spendern einen konstitutiv hohen Gehalt der mitochondrialen Common Deletion, wie mittels quantitativer Real-Time-PCR nachgewiesen wurde. Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Schädigung der mtDNS in KSS-Fibroblasten mit einer signifikanten Zunahme von ROS assoziiert ist. Dieser erhöhte oxidative Stress vermittelt ein im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten stärkeres Kontraktionsvermögen der **KSS-Fibroblasten** in einem dreidimensionalen Kollagengel, da sowohl die Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks als auch die Zugabe des Antioxidanz PBN zu einer Angleichung der Kontraktionskraft zwischen Passagen-gleichen Kontroll- und KSS-Fibroblasten führt. Auf molekularer Ebene ist eine verstärkte Expression der für die Quervernetzung der Kollagenfasern verantwortlichen Lysyloxidase in den KSS-Fibroblasten am ROS-vermittelten Kontraktionsunterschied beteiligt. Ein Kontraktionsvergleich von KSS- und Kontroll-Fibroblasten bei Zugabe des LOX-Inhibitors BAPN zeigt eine deutliche Reduktion des Kontraktionsunterschieds. Neben der verstärkten LOX-Transkription wurde in den KSS-Zellen auch eine vermehrte mRNS-Expression der Sauerstoff-sensitiven α-Untereinheit des Transkriptionsfaktors Hifl detektiert. Da LOX ein Ziel-Gen dieses Transkriptionsfaktors ist, könnte die verstärkte LOX-Transkription in den KSS-Fibroblasten Hif1-vermittelt sein, was durch den Befund, dass ROS

die Sauerstoff-sensitive α -Untereinheit von Hifl stabilisieren können, zusätzlich unterstützt wird.

Humane dermale Fibroblasten mit mtDNS-Mutationen, die einem erhöhten Level an oxidativem Stress ausgesetzt sind, unterscheiden sich demnach in ihrem Verhalten in der extrazellulären Matrix von normalen Kontroll-Fibroblasten und bestätigen so einen kausalen Zusammenhang zwischen mtDNS-Mutationen, oxidativem Stress und zellulären Veränderungen.

7 Literaturverzeichnis

Alemi, M., Prigione, A., Wong, A., Schoenfeld, R., DiMauro, S., Hirano, M., Taroni, F. & Cortopassi, G. 2007. Mitochondrial DNA deletions inhibit proteasomal activity and stimulate an autophagic transcript

1. Free Radic.Biol.Med. 42: 32-43.

Allen, R. G. & Tresini, M. 2000. Oxidative stress and gene regulation 5. *Free Radic.Biol.Med.* 28: 463-499.

Arnaudeau-Begard, C., Brellier, F., Chevallier-Lagente, O., Hoeijmakers, J., Bernerd, F., Sarasin, A. & Magnaldo, T. 2003. Genetic correction of DNA repair-deficient/cancer-prone xeroderma pigmentosum group C keratinocytes 1. *Hum.Gene Ther.* 14: 983-996.

Asselineau, D. & Prunieras, M. 1984b. Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication. *Br.J.Dermatol.* 111 Suppl 27: 219-222.

Asselineau, D. & Prunieras, M. 1984a. Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication. *Br.J.Dermatol.* 111 Suppl 27: 219-222.

Attardi, G. & Schatz, G. 1988. Biogenesis of mitochondria 1. *Annu.Rev.Cell Biol.* 4: 289-333.

Beckman, K. B. & Ames, B. N. 1998b. The free radical theory of aging matures 1. *Physiol Rev.* 78: 547-581.

Beckman, K. B. & Ames, B. N. 1998a. The free radical theory of aging matures 1. *Physiol Rev.* 78: 547-581.

Bell, E., Ivarsson, B. & Merrill, C. 1979. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76: 1274-1278.

Bell, E., Sher, S., Hull, B., Merrill, C., Rosen, S., Chamson, A., Asselineau, D., Dubertret, L., Coulomb, B., Lapiere, C., Nusgens, B. & Neveux, Y. 1983. The reconstitution of living skin 4. *J.Invest Dermatol.* 81: 2s-10s.

Bereiter-Hahn, J. & Voth, M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria 1. *Microsc.Res.Tech.* 27: 198-219.

Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H. & Krutmann, J. 1999a. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion 1. *J.Biol.Chem.* 274: 15345-15349.

Berneburg, M., Grether-Beck, S., Kurten, V., Ruzicka, T., Briviba, K., Sies, H. & Krutmann, J. 1999b. Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion 1. *J.Biol.Chem.* 274: 15345-15349.

Berneburg, M., Plettenberg, H., Medve-Konig, K., Pfahlberg, A., Gers-Barlag, H., Gefeller,
O. & Krutmann, J. 2004. Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin
6. J.Invest Dermatol. 122: 1277-1283.

Bernerd, F., Asselineau, D., Frechet, M., Sarasin, A. & Magnaldo, T. 2005. Reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro: a model to study hypersensitivity to UV light

1. Photochem. Photobiol. 81: 19-24.

Bernerd, F., Asselineau, D., Vioux, C., Chevallier-Lagente, O., Bouadjar, B., Sarasin, A. & Magnaldo, T. 2001. Clues to epidermal cancer proneness revealed by reconstruction of DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum skin in vitro 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 7817-7822.

Bernstein, E. F., Chen, Y. Q., Kopp, J. B., Fisher, L., Brown, D. B., Hahn, P. J., Robey, F. A., Lakkakorpi, J. & Uitto, J. 1996. 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 1. *J.Am.Acad.Dermatol.* 34: 209-218.

Bondy, S. C. & Naderi, S. 1994. Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species 1. *Biochem.Pharmacol.* 48: 155-159.

Brown, W. M., George, M., Jr. & Wilson, A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA 2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76: 1967-1971.

Burgeson, R. E. & Christiano, A. M. 1997. The dermal-epidermal junction 1. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 651-658.

Burgeson, R. E. & Nimni, M. E. 1992. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution 1. *Clin.Orthop.Relat Res.* 250-272.

Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J. & Walker, J. E. 2003. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria 6. *Mol.Cell Proteomics*. 2: 117-126.

Chance, B., Sies, H. & Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 59: 527-605.

Chen, Q. & Ames, B. N. 1994. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 4130-4134.

Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G. & Schon, E. A. 1995. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes 1. Am.J.Hum.Genet. 57: 239-247.

Chomyn, A., Meola, G., Bresolin, N., Lai, S. T., Scarlato, G. & Attardi, G. 1991. In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria 1. Mol. Cell Biol. 11: 2236-2244.

Chu, D. H., Haake, A. R., olbrook, K. & Loomis, C. A. 2003. The Structure and Development of Skin. Fitzpatrick's dermatology in general medicine (pp. 58-88).

Corral-Debrinski, M., Horton, T., Lott, M. T., Shoffner, J. M., Beal, M. F. & Wallace, D. C. 1992. Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age

3. Nat. Genet. 2: 324-329.

Cortopassi, G. A. & Arnheim, N. 1990. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans 1. Nucleic Acids Res. 18: 6927-6933.

Cortopassi, G. A., Shibata, D., Soong, N. W. & Arnheim, N. 1992. A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues 1. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 89: 7370-7374.

Counts, D. F., Evans, J. N., Dipetrillo, T. A., Sterling, K. M., Jr. & Kelley, J. 1981. Collagen lysyl oxidase activity in the lung increases during bleomycin-induced lung fibrosis 1. J.Pharmacol.Exp. Ther. 219: 675-678.

Dalton, T. P., Shertzer, H. G. & Puga, A. 1999. Regulation of gene expression by reactive oxygen

2. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39: 67-101.

Di Donato, S. 2000. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. J.Inherit.Metab Dis. 23: 247-263.

DiMauro, S. & Schon, E. A. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases 2. N.Engl.J.Med. 348: 2656-2668.

Duval, C., Schmidt, R., Regnier, M., Facy, V., Asselineau, D. & Bernerd, F. 2003. The use of reconstructed human skin to evaluate UV-induced modifications and sunscreen efficacy 1. Exp.Dermatol. 12 Suppl 2: 64-70.

Erler, J. T., Bennewith, K. L., Nicolau, M., Dornhofer, N., Kong, C., Le, Q. T., Chi, J. T., Jeffrey, S. S. & Giaccia, A. J. 2006. Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis 1. Nature 440: 1222-1226.

Faller, A. & Schünke, M. 1999. Der Körper des Menschen. Stuttgart: Thieme-Verlag.

Fechter, P., Rudinger, J., Giege, R. & Theobald-Dietrich, A. 1998. Ribozyme processed tRNA transcripts with unfriendly internal promoter for T7 RNA polymerase: production and activity

3. FEBS Lett. 436: 99-103.

Finkel, T. & Holbrook, N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing 1. *Nature* 408: 239-247.

Fushida-Takemura, H., Fukuda, M., Maekawa, N., Chanoki, M., Kobayashi, H., Yashiro, N.,
Ishii, M., Hamada, T., Otani, S. & Ooshima, A. 1996. Detection of lysyl oxidase gene
expression in rat skin during wound healing
1. Arch.Dermatol.Res. 288: 7-10.

Gattermann, N., Berneburg, M., Heinisch, J., Aul, C. & Schneider, W. 1995. Detection of the ageing-associated 5-Kb common deletion of mitochondrial DNA in blood and bone marrow of hematologically normal adults. Absence of the deletion in clonal bone marrow disorders 2. *Leukemia* 9: 1704-1710.

Gerstein, A. D., Phillips, T. J., Rogers, G. S. & Gilchrest, B. A. 1993. Wound healing and aging 1. *Dermatol.Clin.* 11: 749-757.

Ghadially, R., Brown, B. E., Sequeira-Martin, S. M., Feingold, K. R. & Elias, P. M. 1995. The aged epidermal permeability barrier. Structural, functional, and lipid biochemical abnormalities in humans and a senescent murine model 1. *J.Clin.Invest* 95: 2281-2290.

Grinnell, F. 2003. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices 1. *Trends Cell Biol.* 13: 264-269.

Grune, T. 2000. Oxidative stress, aging and the proteasomal system 1. *Biogerontology*. 1: 31-40.

Halliwell, B. & Whiteman, M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br.J.Pharmacol.* 142: 231-255.

Hansford, R. G., Hogue, B. A. & Mildaziene, V. 1997. Dependence of H2O2 formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age 1. *J.Bioenerg.Biomembr.* 29: 89-95.

Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry 1. *J.Gerontol.* 11: 298-300.

Heckmann, M. 1999. Taschenlexikon Dermatologie. Berlin: Springer-Verlag.

Heffner, J. E. & Repine, J. E. 1989. Pulmonary strategies of antioxidant defense 1. *Am.Rev.Respir.Dis.* 140: 531-554.

Holt, I. J., Harding, A. E., Cooper, J. M., Schapira, A. H., Toscano, A., Clark, J. B. & Morgan-Hughes, J. A. 1989. Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA 1. *Ann.Neurol.* 26: 699-708.

Holt, I. J., Harding, A. E. & Morgan-Hughes, J. A. 1988. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies 4. *Nature* 331: 717-719.

Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Stockl, P., Jansen-Durr, P. & Gnaiger, E. 2004. Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts 1. *Biochem.J.* 380: 919-928.

Hynes, R. O. 1992. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion 1. *Cell* 69: 11-25.

Jenkins, G., Redwood, K. L., Meadows, L. & Green, M. R. 1999. Effect of gel reorganization and tensional forces on alpha2beta1 integrin levels in dermal fibroblasts 1. *Eur.J.Biochem.* 263: 93-103.

Jenuth, J. P., Peterson, A. C. & Shoubridge, E. A. 1997. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice 1. *Nat.Genet.* 16: 93-95.

Johns, D. R., Rutledge, S. L., Stine, O. C. & Hurko, O. 1989. Directly repeated sequences associated with pathogenic mitochondrial DNA deletions 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86: 8059-8062.

Jordana, M., Sarnstrand, B., Sime, P. J. & Ramis, I. 1994. Immune-inflammatory functions of fibroblasts 1. *Eur.Respir.J.* 7: 2212-2222.

Jou, M. J., Peng, T. I., Wu, H. Y. & Wei, Y. H. 2005. Enhanced generation of mitochondrial reactive oxygen species in cybrids containing 4977-bp mitochondrial DNA deletion 1. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1042: 221-228.

Jung, E. G. 1998. Dermatologie. Stuttgart: Hippokrates-Verlag.

Kaguni, L. S. 2004. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase 3. *Annu.Rev.Biochem.* 73: 293-320.

Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. & Wahli, W. 1993. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers 3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90: 2160-2164.

Khalil, Z., Ralevic, V., Bassirat, M., Dusting, G. J. & Helme, R. D. 1994. Effects of ageing on sensory nerve function in rat skin 1. *Brain Res.* 641: 265-272.

Khorramizadeh, M. R., Tredget, E. E., Telasky, C., Shen, Q. & Ghahary, A. 1999. Aging differentially modulates the expression of collagen and collagenase in dermal fibroblasts 1. Mol. Cell Biochem. 194: 99-108.

Klein, C. E., Dressel, D., Steinmayer, T., Mauch, C., Eckes, B., Krieg, T., Bankert, R. B. & Weber, L. 1991. Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils

1. J.Cell Biol. 115: 1427-1436.

Kleinle, S., Wiesmann, U., Superti-Furga, A., Krahenbuhl, S., Boltshauser, E., Reichen, J. & Liechti-Gallati, S. 1997. Detection and characterization of mitochondrial DNA rearrangements in Pearson and Kearns-Sayre syndromes by long PCR 1. Hum. Genet. 100: 643-650.

Kobayashi, H., Ishii, M., Chanoki, M., Yashiro, N., Fushida, H., Fukai, K., Kono, T., Hamada, T., Wakasaki, H. & Ooshima, A. 1994. Immunohistochemical localization of lysyl oxidase in normal human skin 3. Br.J.Dermatol. 131: 325-330.

Koch, H., Wittern, K. P. & Bergemann, J. 2001. 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.

Koolman, J. & Röhm, K.-H. 2003. Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart: Thieme-Verlag.

Koop, D. R. 1992. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1 32. FASEB J. 6: 724-730.

Krämer, U. & Schikowski, T. 2006. Recent Demographic Changes and Consequences for Dermatology. In Gilchrest, B. A. & Krutmann, J. (Eds) Skin Aging (pp. 1-8). Berlin: Springer-Verlag.

Krutmann, J. & Diepgen, T. 2003. Hautalterung. Berlin: Springer-Verlag.

Kujoth, G. C., Hiona, A., Pugh, T. D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S. E., Hofer, T., Seo, A. Y., Sullivan, R., Jobling, W. A., Morrow, J. D., Van Remmen, H., Sedivy, J. M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C. & Prolla, T. A. 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging 2. Science 309: 481-484.

Langholz, O., Rockel, D., Mauch, C., Kozlowska, E., Bank, I., Krieg, T. & Eckes, B. 1995. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. J.Cell Biol. 131: 1903-1915.

Lucero, H. A. & Kagan, H. M. 2006. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function

1. Cell Mol.Life Sci. 63: 2304-2316.

Maki, J. M., Sormunen, R., Lippo, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Soininen, R. & Myllyharju, J. 2005. Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues 1. *Am.J.Pathol.* 167: 927-936.

McCord, J. M. & Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein) 1. *J.Biol.Chem.* 244: 6049-6055.

Miwa, S. & Brand, M. D. 2003. Mitochondrial matrix reactive oxygen species production is very sensitive to mild uncoupling 1. *Biochem.Soc.Trans.* 31: 1300-1301.

Moraes, C. T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A. F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L. C., Servidei, S. & . 1989. Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome 1. *N.Engl.J.Med.* 320: 1293-1299.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology* 24: 17-27.

Munnich, A., Rustin, P., Rotig, A., Chretien, D., Bonnefont, J. P., Nuttin, C., Cormier, V., Vassault, A., Parvy, P., Bardet, J. & . 1992. Clinical aspects of mitochondrial disorders 7. *J.Inherit.Metab Dis.* 15: 448-455.

Myers, S. A. & Wolowacz, R. G. 1998. Tetracycline-based MMP inhibitors can prevent fibroblast-mediated collagen gel contraction in vitro 1. *Adv.Dent.Res.* 12: 86-93.

Nass, S. & Nass, M. M. 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. enzymatic and other hydrolytic treatments 1. *J.Cell Biol.* 19: 613-629.

Nemes, Z. & Steinert, P. M. 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier 2. *Exp.Mol.Med.* 31: 5-19.

Ockner, R. K., Kaikaus, R. M. & Bass, N. M. 1993. Fatty-acid metabolism and the pathogenesis of hepatocellular carcinoma: review and hypothesis 2. *Hepatology* 18: 669-676.

Packer, L. & Fuehr, K. 1977. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells 1. *Nature* 267: 423-425.

Papa, L., Gomes, E. & Rockwell, P. 2007. Reactive oxygen species induced by proteasome inhibition in neuronal cells mediate mitochondrial dysfunction and a caspase-independent cell death

2. Apoptosis. 12: 1389-1405.

Pernet, I., Sagot, V., Schmitt, D. & Viac, J. 1999. UVA1 and UVB radiation but not PGE2 stimulate IL-8 release in normal human keratinocytes 1. *Arch.Dermatol.Res.* 291: 527-529.

Porteous, W. K., James, A. M., Sheard, P. W., Porteous, C. M., Packer, M. A., Hyslop, S. J., Melton, J. V., Pang, C. Y., Wei, Y. H. & Murphy, M. P. 1998. Bioenergetic consequences of accumulating the common 4977-bp mitochondrial DNA deletion 1. *Eur.J.Biochem.* 257: 192-201.

Poulton, J. 1992. Mitochondrial DNA and genetic disease 2. *Bioessays* 14: 763-768.

Puoti, G., Carrara, F., Sampaolo, S., De Caro, M., Vincitorio, C. M., Invernizzi, F. & Zeviani, M. 2003. Identical large scale rearrangement of mitochondrial DNA causes Kearns-Sayre syndrome in a mother and her son 1. *J.Med.Genet.* 40: 858-863.

Rezvani, H. R., Dedieu, S., North, S., Belloc, F., Rossignol, R., Letellier, T., de Verneuil, H., Taieb, A. & Mazurier, F. 2007. Hypoxia-inducible factor-1alpha, a key factor in the keratinocyte response to UVB exposure 1. *J.Biol.Chem.* 282: 16413-16422.

Rotig, A., Bourgeron, T., Chretien, D., Rustin, P. & Munnich, A. 1995. Spectrum of mitochondrial DNA rearrangements in the Pearson marrow-pancreas syndrome 3. *Hum.Mol.Genet.* 4: 1327-1330.

Rotig, A., Cormier, V., Blanche, S., Bonnefont, J. P., Ledeist, F., Romero, N., Schmitz, J., Rustin, P., Fischer, A., Saudubray, J. M. & . 1990. Pearson's marrow-pancreas syndrome. A multisystem mitochondrial disorder in infancy 5. *J.Clin.Invest* 86: 1601-1608.

Sander, C. S., Chang, H., Salzmann, S., Muller, C. S., Ekanayake-Mudiyanselage, S., Elsner, P. & Thiele, J. J. 2002. Photoaging is associated with protein oxidation in human skin in vivo 1. *J.Invest Dermatol.* 118: 618-625.

Sanjuan-Pla, A., Cervera, A. M., Apostolova, N., Garcia-Bou, R., Victor, V. M., Murphy, M. P. & McCreath, K. J. 2005. A targeted antioxidant reveals the importance of mitochondrial reactive oxygen species in the hypoxic signaling of HIF-1alpha 2. *FEBS Lett.* 579: 2669-2674.

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. Science 283: 1488-1493.

Sastre, J., Pallardo, F. V. & Vina, J. 2000. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis 3. *IUBMB.Life* 49: 427-435.

Scheffler, I. E. 2001. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives 3. *Mitochondrion*. 1: 3-31.

Schmeichel, K. L. & Bissell, M. J. 2003. Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions 1. *J.Cell Sci.* 116: 2377-2388.

Schon, E. A., Rizzuto, R., Moraes, C. T., Nakase, H., Zeviani, M. & DiMauro, S. 1989. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA 1. *Science* 244: 346-349.

Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M., Treuting, P., Ogburn, C. E., Emond, M., Coskun, P. E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D. C. & Rabinovitch, P. S. 2005. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria 2. *Science* 308: 1909-1911.

Schroeder, P., Pohl, C., Calles, C., Marks, C., Wild, S. & Krutmann, J. 2007. Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling 1. *Free Radic.Biol.Med.* 43: 128-135.

Scott, K. A., Wood, E. J. & Karran, E. H. 1998. A matrix metalloproteinase inhibitor which prevents fibroblast-mediated collagen lattice contraction 1. *FEBS Lett.* 441: 137-140.

Sell, D. R., Lane, M. A., Johnson, W. A., Masoro, E. J., Mock, O. B., Reiser, K. M., Fogarty, J. F., Cutler, R. G., Ingram, D. K., Roth, G. S. & Monnier, V. M. 1996. Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 485-490.

Sharma, R., Kramer, J. A. & Krawetz, S. A. 1997. Lysyl oxidase, cellular senescence and tumor suppression 1. *Biosci.Rep.* 17: 409-414.

Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. & Ames, B. N. 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 10771-10778.

Shoffner, J. M., Lott, M. T., Voljavec, A. S., Soueidan, S. A., Costigan, D. A. & Wallace, D. C. 1989. 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.

Shuster, S., Black, M. M. & McVitie, E. 1975. The influence of age and sex on skin thickness, skin collagen and density 1. *Br.J.Dermatol.* 93: 639-643.

Simonetti, S., Chen, X., DiMauro, S. & Schon, E. A. 1992. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR 2. *Biochim.Biophys.Acta* 1180: 113-122.

Simonsz, H. J., Barlocher, K. & Rotig, A. 1992. Kearns-Sayre's syndrome developing in a boy who survived pearson's syndrome caused by mitochondrial DNA deletion 2. *Doc.Ophthalmol.* 82: 73-79.

Sorrell, J. M. & Caplan, A. I. 2004. Fibroblast heterogeneity: more than skin deep 2. *J.Cell Sci.* 117: 667-675.

St Pierre, J., Buckingham, J. A., Roebuck, S. J. & Brand, M. D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J.Biol.Chem.* 277: 44784-44790.

Stryer, L. 1999. Biochemie. Heidelberg: Spektrum-Verlag.

Suelmann, R. & Fischer, R. 2000. Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in Aspergillus nidulans2. *Cell Motil. Cytoskeleton* 45: 42-50.

Thorburn, D. R. & Dahl, H. H. 2001. Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options 2. *Am.J.Med.Genet.* 106: 102-114.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly, Y., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H. T. & Larsson, N. G. 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase 3. *Nature* 429: 417-423.

Wallace, D. C. 1992. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases?3. *Science* 256: 628-632.

Wallace, D. C. 1994. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease 3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91: 8739-8746.

Wallace, D. C. 1995. 1994 William Allan Award Address. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging 5. *Am.J.Hum.Genet.* 57: 201-223.

Wallace, D. C., Singh, G., Lott, M. T., Hodge, J. A., Schurr, T. G., Lezza, A. M., Elsas, L. J.
& Nikoskelainen, E. K. 1988. Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy
1. Science 242: 1427-1430.

Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis 1. *Genes Dev.* 15: 2922-2933.

Wei, Y. H., Lee, C. F., Lee, H. C., Ma, Y. S., Wang, C. W., Lu, C. Y. & Pang, C. Y. 2001. Increases of mitochondrial mass and mitochondrial genome in association with enhanced oxidative stress in human cells harboring 4,977 BP-deleted mitochondrial DNA 1. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 928: 97-112.

Widmer, R., Ziaja, I. & Grune, T. 2006. Protein oxidation and degradation during aging: role in skin aging and neurodegeneration 1. *Free Radic.Res.* 40: 1259-1268.

Woodley, D. T., Yamauchi, M., Wynn, K. C., Mechanic, G. & Briggaman, R. A. 1991. Collagen telopeptides (cross-linking sites) play a role in collagen gel lattice contraction 1. *J.Invest Dermatol.* 97: 580-585.

Yaar, M. & Gilchrest, B. 2003. Aging of Skin. Fitzpatrick's dermatology in general medicine (pp. 1386-1398).

Yaffe, M. P. 1999. Dynamic mitochondria 1. *Nat.Cell Biol.* 1: E149-E150.

Yang, J. H., Lee, H. C., Lin, K. J. & Wei, Y. H. 1994. A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin 1. *Arch.Dermatol.Res.* 286: 386-390.

Yin, D. 1996. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores 1. *Free Radic.Biol.Med.* 21: 871-888.

Yin, D. Z. 1992. Lipofuscin-like fluorophores can result from reactions between oxidized ascorbic acid and glutamine. Carbonyl-protein cross-linking may represent a common reaction in oxygen radical and glycosylation-related ageing processes 1. *Mech.Ageing Dev.* 62: 35-45.

Zent, R., Ailenberg, M., Downey, G. P. & Silverman, M. 1999. ROS stimulate reorganization of mesangial cell-collagen gels by tyrosine kinase signaling 1. *Am.J.Physiol* 276: F278-F287.

Zeviani, M. & Carelli, V. 2003. Mitochondrial disorders 1. *Curr.Opin.Neurol.* 16: 585-594.

Zeviani, M. & Di Donato, S. 2004. Mitochondrial disorders 1. *Brain* 127: 2153-2172.

Zeviani, M., Moraes, C. T., DiMauro, S., Nakase, H., Bonilla, E., Schon, E. A. & Rowland, L. P. 1988. Deletions of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome 1. *Neurology* 38: 1339-1346.

Zwerschke, W., Mazurek, S., Stockl, P., Hutter, E., Eigenbrodt, E. & Jansen-Durr, P. 2003. Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence

2. Biochem.J. 376: 403-411.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BAPN	3-Aminopropionitril Fumarat-Salz
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
cDNS	komplementäre einzelsträngige DNS
DCFDA	2`,7`-Dichlorofluorescin Diazetat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
et al.	et aliter
EtOH	Ethanol
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
xg	x fache der Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunden (engl.: hours)
Hif1	Hypoxia inducible factor 1
Kb	1000 Basenpaare
kda	Kilo Dalton
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
λ	Wellenlänge
LOX	Lysyloxidase
μl	Mikroliter
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mt	mitochondrial
nm	Nanometer
OD ₂₆₀	optische Dichte bei 260 nm
OD ₂₈₀	optische Dichte bei 280 nm
PBN	N-tert-Butyl-a-phenylnitrone
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
RNS	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
TIMP	Tissue specific inhibitors of matrix metalloproteinases
U	Einheit der Enzymaktivität (engl.: unit)
v/v	Verhältnis Volumen/Volumen
W/V	Verhältnis Masse/Volumen
z.B.	Zum Beispiel

9 Anhang

9.1 Danksagung

Ein herzliches Dankeschön an alle, die mich während der letzen drei Jahre unterstützt haben!

DANKE.....

Prof. Krutmann, für die Bereitstellung des Themas, Ihr stetes Interesse an neuen Daten und die Zuversicht, dass diese uns weiterbringen werden ("Promising, promising"…)

Peet, für Deine Unterstützung bei der Dateninterpretation ("da muss noch mehr Hirnschmalz rein"), Deinen unerschütterlichen Optimismus ("das spielt uns genau in die Karten"), den 1a-Fahrdienst zum Mitomeeting und nicht zuletzt für den großen Süßigkeiten-Vorrat auf Deinem Schreibtisch!

Maren, für Deine tatkräftige Unterstützung im Labor, Deine psychologische Betreuung, die – für mich als Nichtraucher - immer sehr redseligen Raucher-Pausen,....kurz: für die allerbeste "Rund-um-Betreuung", die man sich wünschen kann =)

Marc, für Deine kreative wissenschaftliche Unterstützung, die unzähligen Tipps und Paper, die viele Schokolade und nicht zuletzt für die entspannte "Nachbarschaft" =)

Der gesamten Arbeitsgruppe Dr. Schröder (auch Ines, Conny, Conny und Tobi!) und der Arbeitsgruppe Dr. Haendeler für die angenehme Arbeitsatmosphäre!

Francoise und ihrem Team (Cécile und Corinne!) für die Bereitstellung der Methoden ("no bubbles"!) und die fürsorgliche Betreuung während einer tollen Zeit in Paris…

Dr. Antje Gohla, Oleg und Andrea für die super Unterstützung am Konfokalmikroskop

Prof. Wilichowski, für die freundliche Überlassung der KSS-Fibroblasten

Dem Pizza-Club ohne den ich sicher oft verhungert wäre

Mom und Dad, dass ihr immer an mich glaubt und ich in jeder Situation auf Euch vertrauen kann!

Georg, dass ich Dir immer alles erklären durfte, was Dich sicher nicht interessiert hat (welcher BWLer weiß schon was KSS ist!!!), für Deine Geduld, für Deine tröstenden und motivierenden Worte ("Na, wie hast Du heute die Spitzenforschung voran gebracht?").....-aber vor allem dafür, dass Du immer für mich da bist =)

9.2 Lebenslauf

Tanja Désirée Maresch Kirchfeldstrasse 83 40217 Düsseldorf Tel.: 0174/4813025 E-mail: Tanja.Maresch@gmx.de geboren am 11.01.1978 in Essen ledig, kinderlos

Schulausbildung

1984 - 1988	Kruckeler Grundschule in Dortmund
1988 - 1997	Gymnasium Canisianum in Lüdinghausen
	Abschluss Abitur (Gesamtnote: 1,5)
1994	dreimonatiger Schüleraustausch in Kanada

Berufsausbildung

1997 - 1999	Ausbildung zur Bankkauffrau bei der WestLB Münster
	Abschluss Bankkauffrau (Gesamtnote: sehr gut)

Hochschulstudium im Studiengang Biochemie

1999 - 2001	Grundstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Abschluss Vordiplom (Gesamtnote: gut)
2001 - 2004	Hauptstudium an der Ruhr-Universität-Bochum Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie bei Prof. A. Wittinghofer: "Einfluss des Guaninnukleotid-bindenden Proteins TrmE/50K auf die Modifikationsreaktion der Uridinbase in Wobble-Position von tRNA" Abschluss Diplom (Gesamtnote: mit Auszeichnung)
2003	vierwöchiges Auslandspraktikum an der Universität Hull, UK
2004 - 2007	DFG-Promotionsstipendium im Graduiertenkolleg 1033 "Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Alterungsprävention"
	Doktorarbeit am Institut für umweltmedizinische Forschung gGmbH an der Heinrich-
	Heine-Universität Düsseldorf bei Prof. J. Krutmann: "Kausalzusammenhang zwischen
	mtDNS-Mutationen, oxidativem Stress und Hautaiterung
	Tag der mundlichen Promotionsprurung: 13.12.2007
2005	vierwöchiger Forschungsaufenthalt bei L'Oréal, Paris

Universitäres Engagement

1999 - 2001	Fachschaftsarbeit während des Grundstudiums in Kiel
2002 - 2003	Tutorin für Biochemie und Chemie an der Ruhr-Universität-Bochum

Sonstige Qualifikationen

Englisch – fließend in Wort und Schrift Französisch – gute Grundkenntnisse Computerkenntnisse (Windows XP, Office XP)

9.3 Erklärung

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

(Tanja Désirée Maresch)

Düsseldorf, 14.12.2007