

**Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* zu
oxidativem Stress und Mutationen
der mitochondrialen DNA im Alterungsprozess.**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Biologin Jennifer Knoch
aus Stuttgart

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

17.09.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Mark Berneburg

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Olaf Rieß

A ZUSAMMENFASSUNG	5
B EINLEITUNG	6
1. CHRONOLOGISCHES ALTERN – THEORIEN UND MARKER	6
1.1 <i>Der Alterungsprozess allgemein</i>	6
1.2 <i>Altern und mitochondriale Schäden</i>	7
1.3 <i>Funktionsprinzip der Deletions-PCR:</i>	9
2. UVA-induzierte DNA-Schäden	10
3. Defekte DNA-Reparatur und vorzeitiges Altern	11
3.1 <i>Cockayne-Syndrom</i>	11
4. Zusammenfassung Versuche	16
C MATERIAL UND METHODEN	17
1. Geräte	17
2. Materialien	18
2.1 <i>Kits</i>	18
2.2 <i>Enzyme</i>	18
2.3 <i>Primer</i>	18
2.4 <i>Puffer und Medien</i>	19
2.5 <i>Chemikalien</i>	19
2.6. <i>Gebrauchsmaterialien</i>	22
2.7 <i>PC-Programme</i>	22
3. Zellen und Zelllinien	23
3.1 <i>Fibroblasten</i>	23
4. Zellkultur	24
4.1 <i>Zellkultur und Konservierung</i>	24
5. Molekularbiologische Methoden	26
5.1 <i>DNA-Isolation</i>	26
5.2 <i>PCR</i>	26
5.3 <i>Real-Time-PCR</i>	28
5.4 <i>Agarosegelelektrophorese</i>	28
5.5 <i>FACS (Fluorescence-activated-cell-sorting)</i>	29
5.6 <i>In-vivo Untersuchungen in der Maus</i>	29
5.7 <i>Oxidativer-Stress in Fibroblasten</i>	31
D ERGEBNISSE	33
1. Verteilung der D17 Deletion in muriner Haut	33
1.1 <i>Wildtyp</i>	33
1.2 <i>XPG-knockout -Mäuse</i>	57

1.3 TLR2 knockout-Mäuse.....	59
1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Maushaut und Fett	61
2. Auswirkung von UVA-Stress auf CSA- und CSB-defiziente Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen	65
2.1 Apoptose und Nekrose	67
2.2 Common-Deletion.....	71
3. Verlauf von Wasserstoffperoxid-Stress in Fibroblasten	73
3.1 Im Medium von Fibroblasten.....	73
3.2 In den Zellen.....	75
E DISKUSSION.....	77
1. Murine D17-Deletion in Maushaut	77
1.1 Wildtyp-Mäuse.....	77
1.2 XPG-knockout-Mäuse.....	80
1.3 TLR2-knockout-Mäuse	81
1.4 Diskussion der Methode.....	82
2. Oxidativer Langzeitstress und seine Auswirkungen auf WT und CS-defiziente Fibroblasten	83
2.1 Apoptose und Nekrose	83
2.2 Common-Deletion.....	84
3. Wasserstoffperoxid-Stress	87
3.1 Stress im Medium.....	87
3.2 Stress im Zellinneren.....	88
F ABKÜRZUNGEN	89
G QUELLENANGABEN.....	92
H. ANHANG	98
1. Erklärung zum Eigenanteil.....	98
2. Lebenslauf.....	99
Persönliche Daten	99
Schulbildung.....	99
Hochschulausbildung	99
3. Danksagung	100

A Zusammenfassung

Der Alterungsprozess kann in zwei Qualitäten unterteilt werden, intrinsisches und extrinsisches. Während beim intrinsischen Altern- auch genannt chronologisches Altern- vermehrt genetische und endogene Stoffwechselprozesse eine Rolle spielen, kann beim extrinsischen Altern die ultraviolette Strahlung eine Ursache darstellen.

Da es sich bei der Alterung um langwierige Prozesse handelt sind genetische Erkrankungen mit vorzeitiger Alterung wichtige Modellsysteme. Hierzu gehört auch die Erkrankung Cockayne-Syndrom, die einen Defekt in der Nukleotidexzisionsreparatur aufweist.

Am Beispiel des Cockayne-Syndroms konnten wir und andere zeigen, dass sowohl extrinsische als auch intrinsische Alterungsprozesse beobachtet werden können.

Weiter zeigte sich bei dieser Erkrankung, dass Mutationen der mitochondrialen (mt) DNA vermehrt im Alterungsprozess zu beobachten sind und dies vor allem im subkutanen Fett der Haut zu beobachten ist, das alterabhängig reduziert ist.

Aus diesen Vorarbeiten heraus haben wir untersucht, wo über den Körper normaler Mäuse verteilt Mutationen der mt DNA in Epidermis, Dermis und subkutanem Fett vermehrt zu beobachten sind und ob dies über oxidativen Stress zum Verlust des subkutanen Fettgewebes führt, wie in Vorarbeiten untersucht.

In der Tat konnten wir zeigen, dass im subkutanen Fett gealterter Mäuse mitochondriale Deletionen akkumulieren, die in jungen Mäusen nicht vorhanden sind. Diese Deletionen können auch in Zellkulturen durch den oxidativen Stress einer repetitiven UV-Bestrahlung induziert werden.

Weiter war insbesondere an den Extremitäten der Anstieg der mitochondrialen D17-Deletion im subkutanen Fett besonders hoch. Insofern liefert diese Arbeit erste Daten wie die Steigerung der D17-Deletion über das subkutane Fett des gesamten Körpers verteilt erfolgt.

Weitere Untersuchungen sind notwendig um die Ergebnisse im Menschen zu bestätigen.

B Einleitung

1. Chronologisches Altern – Theorien und Marker

1.1 Der Alterungsprozess allgemein

Zur Frage, wie es in Zellen zur Alterung kommt, gibt es verschiedene Theorien. Sie reichen von der genetischen Ausstattung, über die replikative Seneszenz bis hin zu einer Akkumulation von Schäden, die potentielle Faktoren für eine Limitierung des Alters des menschlichen Organismus sind.

Beispielsweise wurde bei einem Vergleich der Genome von über 95-jährigen im Vergleich zu jüngeren Menschen gehäuft eine bestimmte Variante des Gens *FOXO3A* (Forkhead box O3A) festgestellt (1). Dieses Protein ist wichtig für den Umgang der Zelle mit Stress (2).

Replikative Seneszenz hingegen ist ein Effekt, den Calvin Harley et al. im Jahr 1990 veröffentlichte. Er stellte fest, dass die Telomere von Fibroblasten mit der Häufigkeit der Teilungen kürzer werden und folgerte daraus, dass die Fähigkeit der Zelle sich zu replizieren durch die Länge der Telomere limitiert wird (3). Es hat sich dann gezeigt, dass die Länge der Telomere nicht einfach nur von der Anzahl der Teilungen einer Zelle abhängt, sondern dass oxidativer Stress sich direkt auf die Länge der Telomere auswirkt (4). Telomere dienen dabei als Schadenssensor und tragen durch Interaktion mit Proteinen der Doppelstrangreparatur und den Checkpoint-Proteinen dazu bei, dass die Zelle, im Fall von beispielsweise oxidativem Stress, seneszent wird (5).

Im Jahr 1956 veröffentlichte Denham Harman darüber hinaus seine Theorie zum Thema Alterung. Sie besagt, dass freie Radikale, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wichtige zelluläre Strukturen und Moleküle schädigen, wie DNA oder Proteine schädigen und dass eine Akkumulation dieser Schäden zur Seneszenz der Zellen führt (6).

Die wahrscheinlich größte Quelle für ROS in einer Zelle sind die Mitochondrien, in denen bekannterweise durch fehlgeleiteten Elektronenfluss in der Atmungskette als Nebenprodukte ROS entstehen können (7-10). Etwa 0,1% des Sauerstoffs aus der Atmungskette werden zu ROS (11). Mit Hilfe der Superoxid-Dismutase (SOD) werden sie zu H_2O_2 umgewandelt, das über die Fenton-Reaktion zum Hydroxyl-Radikal ($OH\cdot$) umgewandelt werden kann. Dies ist eine der aggressivsten Formen von ROS und da $OH\cdot$ eine extrem kurze Lebensdauer aufweist, bleibt die Entstehung dieser Form von ROS nicht ohne Konsequenzen in Form von oxidativer Schädigung für seine nächste Umgebung, die innere Mitochondrienmembran oder die mitochondriale (mt) DNA (11, 12).

Um nun zumindest die weniger reaktiven ROS wieder abzufangen oder die durch ROS entstandenen Schäden wieder zu reparieren, stehen der Zelle mehrere Mechanismen zur Verfügung. Mehrere, sogenannte DNA-Reparaturmechanismen sind für die Reparatur von

Schäden an DNA verantwortlich (13), Enzyme wie z.B. Katalasen und Superoxiddismutasen oder die Glutathionperoxidase in Kombination mit dem Peptid GSH (Glutathion) stehen direkt für die Reduktion bzw. die Reparatur von ROS-induzierten DNA-Schäden zur Verfügung (14). Diese werden später im Detail beschrieben.

Sind solche Reparaturproteine oder Radikale fangenden Enzyme in irgendeiner Weise gestört, so führt dies häufig entweder zur Entstehung von Krebs- oder zu Alterungsphänotypen (13).

1.2 Altern und mitochondriale Schäden

Mitochondrien enthalten ihr eigenes genetisches Material, die mt DNA. Den Zusammenhang zwischen mt DNA-Schäden und (vorzeitigem) Altern hat vor allem die Arbeit von Trifunovic et al aufgeklärt (15).

In dieser Arbeit wurde in Mäusen die mt Polymerase γ (Pol γ) mutiert. Diese Polymerase ist, soweit bekannt, die einzige Polymerase in den Mitochondrien und somit vermutlich für alle Belange, wie DNA-Synthese, oder mt DNA Reparatur, zuständig. Die defekte Polymerase in der sogenannten „Mutator-Maus“ war so konstruiert, dass sie zwar noch zu DNA-Replikation fähig war, jedoch nicht mehr dazu in der Lage, mt DNA-Schäden zu erkennen oder zu reparieren. Diese Mäuse zeigten dann bereits im Alter von etwa 25 Wochen typische Zeichen vorzeitigen Alterns, die sich im weiteren Verlauf noch signifikant verstärkten. Dies waren beispielsweise verringertes Körpergewicht, Verlust des subkutanen Fettgewebes, verringerte Knochendichte und Knochenmineralgehalt, Anämien, Haarausfall, Herzprobleme, Kyphose, verringerte Fruchtbarkeit und eine geringere Lebensspanne (15).

Eine weitere Untersuchung dieser Mäuse erbrachte, eine Akkumulation von Schäden der mt DNA. Des Weiteren zeigte sich, dass die Atmungskette in den Mitochondrien dieser Mäuse, nicht gut funktionierte. Die Sauerstoffaufnahme war um 95% reduziert (16).

Einen weiteren Hinweis auf die Wichtigkeit der Integrität der mitochondrialen DNA im Alterungsprozess gibt uns die humane Common-Deletion (CD). Diese 4977 Basenpaare (bp) große Deletion der mt DNA steht in einem gewissen Zusammenhang mit dem chronologischen Altern, da die Inzidenz dieser Deletion der mt DNA mit zunehmendem Alter deutlich steigt (17, 18). Allerdings kann in der Haut eine gewisse Menge an Deletion nicht zu einem bestimmten Lebensalter korreliert werden, sondern die Menge der Deletion reflektiert eher die durch Strahlung (z.B. ultraviolette (UV)-Strahlung) induzierte Alterung, die individuell verschieden sein kann (19, 20). Dies wird dadurch bestätigt, dass die CD auch durch oxidativen Stress, wie beispielsweise durch repetitive UVA-Bestrahlung in der Haut, aber auch in Zellen induziert werden kann (20-22). Dabei wird die CD hauptsächlich in der Dermis, aber kaum in der Epidermis induziert. In der Haut können diese induzierten Deletionen auch noch lange Zeit später nachgewiesen werden (21).

Wie es zu solchen großen mt Deletion kommt ist nicht genau geklärt. Sie treten oft an Stellen auf, an denen sich direct repeats also gleichgerichtete Sequenzwiederholungen befinden (23). Die CD wird ebenfalls von solchen direct repeats flankiert, sie liegen im Bereich der Basenpaare 8470-8482 und 13447-13459. Es wird angenommen, dass Deletionen durch Rekombination oder durch falsche Basenpaarungen verursacht werden (24).

Im Fall von durch oxidativem Stress induzierter Deletion wäre es also möglich, dass sich im Bereich der direct repeats oxidative Basenaddukte wie 8-Hydroxy-Desoxyguanosin (8-OH-dG) bilden. Diese Addukte können durch Fehlpaarungen der Basen dazu führen, dass die während der Replikation auftretende Einzelstrangbildung einen Bruch der DNA und somit das Auftreten von Deletionen begünstigen (22, 25).

Lagern sich nämlich, nach der Einzelstrangbildung, die beiden Stränge im Bereich der direct repeats wieder aneinander an, kann sich dabei eine Schlaufe bilden, die bei der Replikation dann verloren gehen kann (22, 26, 27).

Große Deletionen der mt DNA finden sich sowohl in muriner, als auch in humaner mt DNA. Sie treten in der Haut von älteren, aber meist nicht in jungen Individuen auf. Die murine Entsprechung der CD, zumindest in Bezug auf die Lage und Größe der Deletion im mitochondrialen Genom, ist die D17-Deletion.

Um zu bestimmen, wie viele dieser Deletionen sich ereignet haben, wird eine semiquantitative PCR-Methode für die murine D17-Deletion genutzt, für die humane Common-Deletion eine Real-Time-PCR (20, 23).

1.3 Funktionsprinzip der Deletions-PCR:

Falls keine Deletion vorliegt, liegen die Bindungsstellen der Primer so weit voneinander entfernt, dass kein PCR Produkt entsteht. Eine Deletion rückt diese Bindungsstellen so nahe zusammen, dass ein PCR-Produkt entstehen kann (siehe Abb. 1).

Um die mt Common-Deletion in Relation zur Gesamtmenge der mt DNA zu setzen, wurde als interner Standard (IS) eine stabile Region des mt Genoms amplifiziert. Dies ist notwendig, da zum einen jede Zelle eine verschiedene Anzahl an Mitochondrien enthält und zum Zweiten, da in jedem Mitochondrium eine verschiedene Anzahl an Kopien der mt DNA enthalten sein kann.

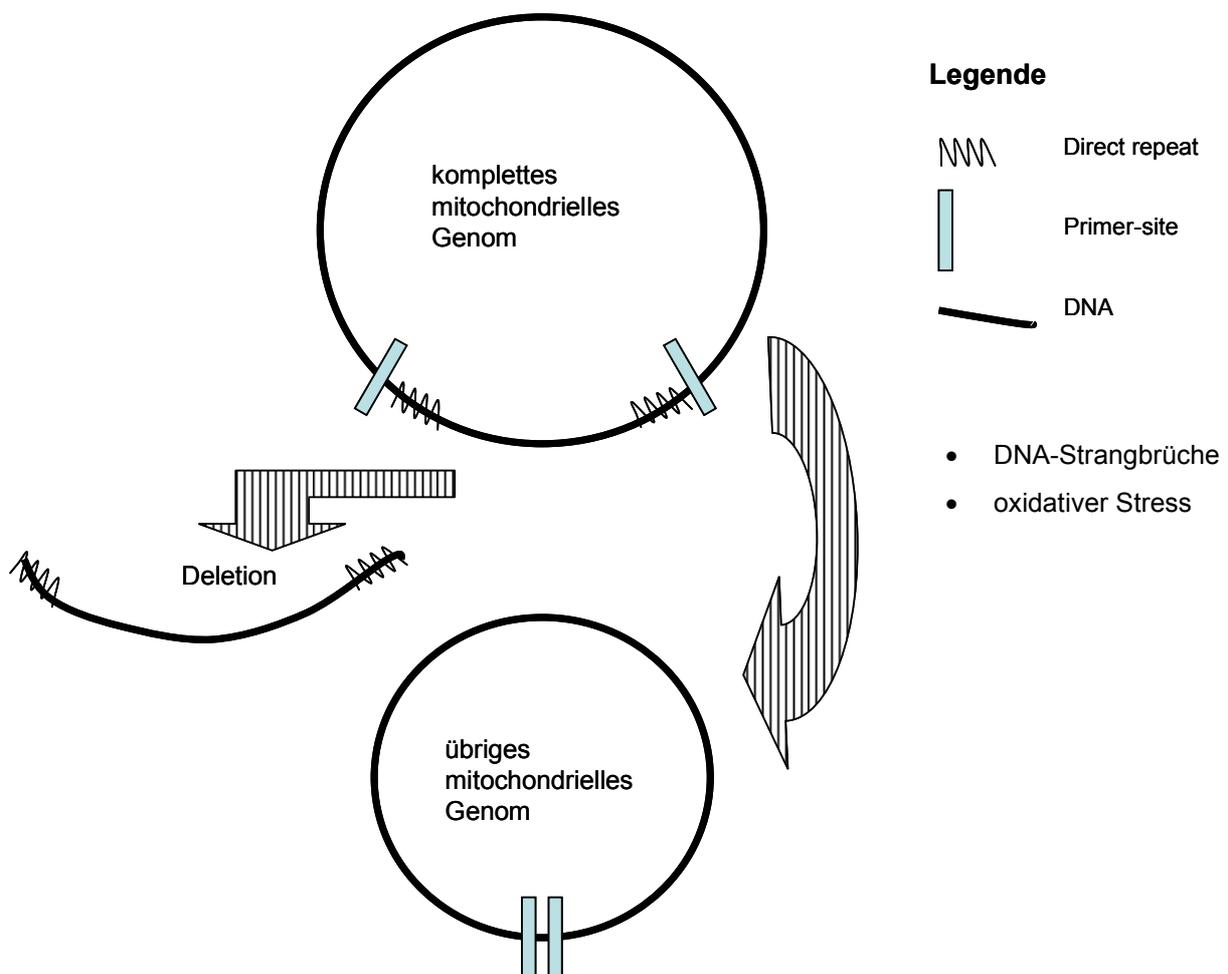


Abb. 1 Entstehung der Common-Deletion bzw. der murinen D17 Deletion und ihr Nachweis: Im Normalzustand liegen die Primeransatzstellen zur Messung der CD weit auseinander, so dass eine PCR kein Produkt ergibt. Durch das Stattfinden der Deletion werden sie zusammengedrückt und eine PCR ergibt ein Produkt, das mit der Produktmenge des IS-Primerpaares verglichen werden kann.

2. UVA-induzierte DNA-Schäden

Die Common-Deletion, die, wie zuvor beschrieben, durch Altern oder oxidativen Stress induziert wird, findet sich auch in durch Lichteinfluss vorzeitig gealterter Haut. In Experimenten zeigte sich, dass sie durch UVA-Strahlung induziert wird, sowohl in vivo als auch in vitro und dass sie in der Haut auch noch lange Zeit nach der Bestrahlung nachweisbar bleibt (7, 21).

UVA-Strahlung ist mit einer Wellenlänge von 320-400 nm in der Lage in tiefere Hautschichten vorzudringen als die kürzerwellige UVB-Strahlung (280-320 nm). Im Gegensatz zu UVB wird die DNA durch die Bestrahlung mit UVA meist nicht direkt geschädigt. Vielmehr entstehen durch die UVA-Bestrahlung ROS, die wiederum auf die Zelle und die DNA wirken (28, 29). Interessanterweise findet man die Induktion von ROS bereits bei niedrigen Dosen von UV-Strahlung (Wellenlängen entsprechend der Sonnenstrahlung) im Bereich von $2\text{J}/\text{cm}^2$ (30).

Als Quelle der bei UVA-Bestrahlung entstehenden ROS werden als Photosensitizer dienende endogene Chromophore genannt, zu denen Porphyrine, NAD(P)H, Flavine, Cytochrome, Häm und andere Cofaktoren zählen. Diese können durch Photonen der UVA-Strahlung in einen angeregten Zustand übergehen der zur Generation von ROS führt (31, 32). Die mitochondriale Lokalisation vieler dieser Chromophore lässt vermuten, dass dort auch als erstes die durch die ROS entstehenden Schäden zu finden sind.

Unter den durch ROS erzeugten Schäden finden sich Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA (SSBs und DSBs), Basenschäden wie 8-OH-dG oder 7,8-dihydro-8-oxoadenine (7,8-OH-dA), Basenverluste und T-G-Transversionen (33-36).

Weiterhin werden durch die UVA-Bestrahlung verschiedene Signale in den Zellen ausgelöst. Dies schließt Signalwege ein, die sich durch Apoptose, Zellzyklusarrest, Seneszenz, Transaktivierung von Stress-induzierbaren Genen (Entzündungsantwort), Hochregulierung antioxidativ wirkender Enzyme (z.B. Mangan-Superoxid-Dismutase) oder Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) auswirken (37-42).

Somit wirkt UVA-Strahlung sich auf mehreren Wegen auf die Alterung von Zellen und Geweben ein.

Die von UVA-Strahlung bzw. ROS induzierten DNA-Schäden werden von verschiedenen Reparatursystemen, wie der Doppel- und Einzelstrangbruchreparatur (DSBR, SSBR), der Basenexzisionsreparatur (BER), der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) oder der Mismatchreparatur (MMR) detektiert und so gut es geht wieder entfernt.

3. Defekte DNA-Reparatur und vorzeitiges Altern

Wie bereits beschrieben führen DNA-Schäden, auch in den Mitochondrien, zu Alterung. Diese DNA-Schäden werden normalerweise durch die Reparatursysteme der Zelle wieder entfernt oder ihre Ursachen wie z.B. ROS werden durch Enzyme wie Katalasen und Superoxiddismutasen oder Peptide wie GSH direkt abgefangen, so dass im normalen Alterungsprozess die Schäden nur langsam akkumulieren.

Im Fall von manchen Erkrankungen, den sogenannten Progerien, die als eines der Hauptsymptome vorzeitiges Altern aufweisen, sind häufig die Proteine, die zu den erwähnten Mechanismen beitragen, defekt.

Zwar unterscheiden sich Progerien in einigen Bereichen vom chronologischen Alterungsprozess, doch das Verständnis dieser Erkrankungen ermöglicht uns Einsichten in den mechanistischen Ablauf des normalen Alterungsprozesses.

3.1 Cockayne-Syndrom

Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist auch das Cockayne-Syndrom (CS).

Beim Cockayne-Syndrom, benannt nach dem Londoner Arzt Edward Cockayne, der es 1933 erstmals beschrieb, handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung mit einer Inzidenz von 1/250.000 Geburten (43). Betroffen ist eines von zwei Genen, entweder *CSA* (Cockayne-Syndrom A, auch *ERCC8*) in 20% der Fälle oder *CSB* (Cockayne-Syndrom B, auch *ERCC6*) im Fall der übrigen 80%.

Bei dieser Erkrankung treten folgende Symptome auf: Wachstumsverzögerung (besonders die Gewichtszunahme betreffend), Ataxien, Lichtempfindlichkeit der Haut, Gehörlosigkeit, vermindertes Unterhautfettgewebe, geistige Retardierung, Neurodegeneration, Mikrozephalie, Demyelinierung des Gehirnstamms, Altern, dünner Haarwuchs, Katarakte, früher Tod (44).

3.1.1 Nukleotidexzisionreparatur

Die Proteine *CSA* und *CSB* sind Teil der Nukleotidexzisionsreparatur (NER). Dieser Reparaturpfad wird in globale Genomreparatur (GGR) und transkriptionsgekoppelte Reparatur unterteilt. *CSA* und *CSB* gehören zur Transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) (Abb.2). Hierbei wird die im Fall eines DNA-Schadens blockierte RNA-Polymerase II (POL II) von *CSB* erkannt, das sonst während der Transkription zusammen mit XPG (Xeroderma Pigmentosum G) dynamisch mit POL II interagiert. Die durch den DNA-Schaden blockierte POL II verstärkt ihre Interaktion mit *CSB*. Durch diese Interaktion von *CSB* und POL II werden die Histon-Acetyltransferase p300 (HAT p300), ein Komplex bestehend aus ROC1 (Ring-box1), CUL4A (Cullin 4A), DDB1 (DNA damage binding protein 1) und *CSA*, sowie der CSN Komplex (COP9-Signalosom-Komplex) rekrutiert. Der Komplex, zu dem auch *CSA*

gehört, besitzt eine inaktive E3-Ubiquitin-Ligase, die in Verbindung mit dem CSN-Komplex aktiv wird. Um dann die Proteine XAB2 (XPA-binding protein), HMGN1 (high mobility group nucleosome binding domain 1) und TFIIIS (transcription elongation factor SII) zu rekrutieren werden sowohl CSA, als auch CSB benötigt. XAB2 ermöglicht nun die stabile Anlagerung des NER-Hauptkomplexes TFIIH (transcription factor IIH), sowie von XPA (Xeroderma Pigmentosum A) und RPA (Replication Protein A) an die beschädigte Stelle. CSB und POL II werden im Verlauf, durch den CSA enthaltenden Komplex ubiquitiniert und dadurch für den proteasomalen Abbau gekennzeichnet. An dieser Stelle vereinigt sich der Verlauf der TCR mit der globalen NER. Die Endonukleasen XPG (Xeroderma Pigmentosum G) und XPF (Xeroderma Pigmentosum F) assoziiert mit ERCC1 (DNA excision repair protein1) schneiden die DNA 5' und 3' vom Schaden ein, Polymerase ϵ oder δ füllen die Läsionslücke. Die DNA wird dabei durch einen PCNA-RPF-Komplex (Proliferating cell nuclear antigen-replication-factor-c) stabil gehalten wird. Schlussendlich werden die DNA Stränge durch Ligase III in Verbindung mit XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1) oder seltener von Ligase I wieder ligiert. (45-48)

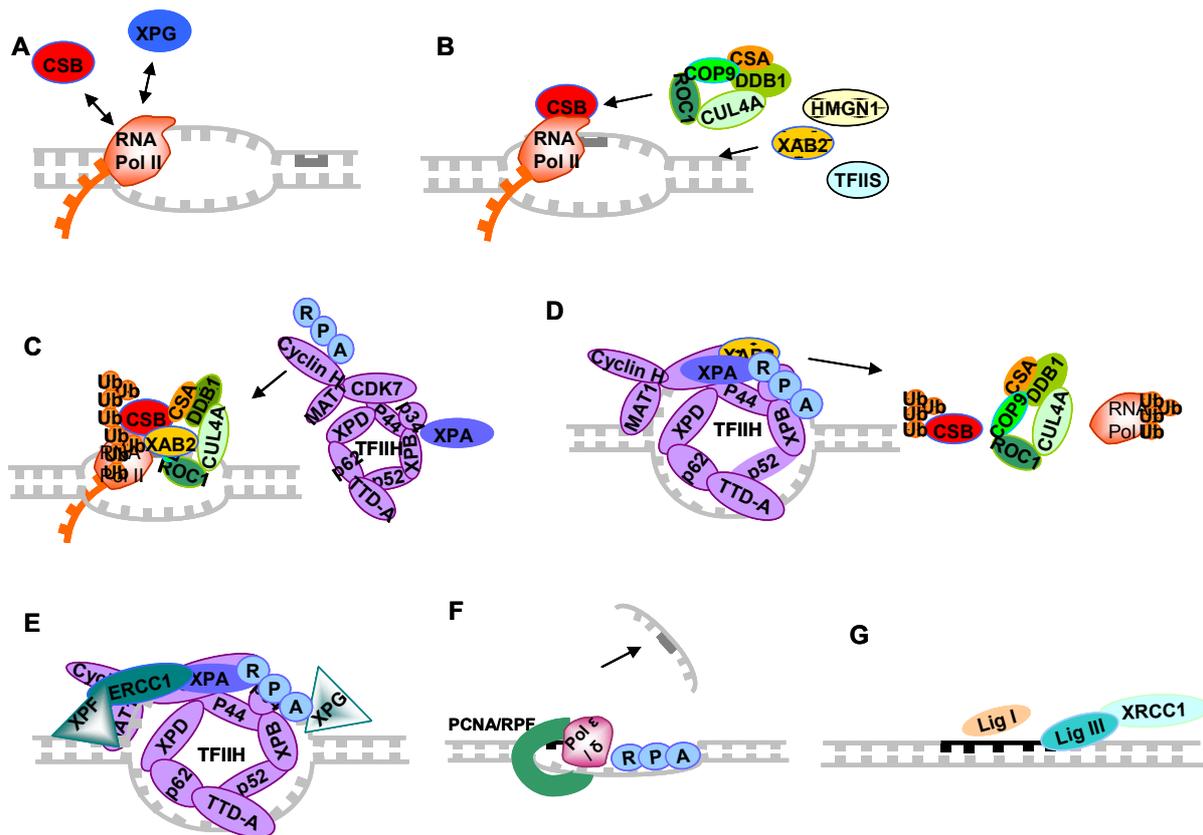


Abb. 2 Transkriptions-gekoppelte Nukleotidexzisionsreparatur. Ablauf der TCR. A) CSB und XPG interagieren dynamisch mit RNA-Polymerase II. B) Bei einer DNA-Läsion wird Pol II blockiert, die Interaktion mit CSB wird gestärkt. Der CSA enthaltende Komplex mit E3 Ubiquitinligaseaktivität, wird rekrutiert, mit dessen Hilfe dann XAB2, TFIIIS und HMGN1 rekrutiert werden. C+D) Dies ermöglicht die Anlagerung des TFIIH-Komplexes sowie RPA und XPA an XAB2. CSB und Pol II werden durch die E3 Ubiquitinase ubiquitinyliert und so für den Abbau markiert. E) Die Endonukleasen XPG und XPF mit ERCC1 schneiden die DNA 5' und 3' von der Schadensregion. F) Polymerase ϵ oder δ füllen die entstandene Läsion. G) Ligase III und XRCC1 oder Ligase I ligiert den neuen Strang.

Die CS-Proteine erfüllen aber nicht nur Aufgaben in der NER. Besonders für CSB sind noch einige weitere Bereiche bekannt, in denen dieses Protein beteiligt ist.

3.1.2 Transkription

Bei einer der Aufgaben, an denen CSB beteiligt ist, handelt sich um die Stimulation der Pol-I Transkription von ribosomaler RNA (49). Ein knockdown von CSB verhindert dabei die Assoziation von Pol I mit rRNA kodierenden Regionen und die daraus folgende Synthese von pre-rRNA (50). CSB spielt dabei zumindest *in vitro* auch eine Rolle bei der Pol-I Elongation (51). Ein komplettes Fehlen von CSB zeigt allerdings keine Auswirkungen auf die Pol-I Transkription, im Gegensatz zu mutierten oder trunkierten Varianten von CSB (51).

Die Transkription durch Pol-II wird ebenfalls durch CSB beeinflusst. Insbesondere die Wiederaufnahme der Transkriptionstätigkeit nach oxidativem Stress ist in CS-defizienten Zellen unterdrückt (52, 53).

Weiterhin ist CSB an der Transkription via Pol-III als Elongationsfaktor für die Synthese von strukturierten RNAs beteiligt. Ein Verlust von CSB oder eine Überexpression von p53 mit dem CSB direkt interagiert, verursacht dadurch die Fragilität der vier rRNA-kodierenden Genloci in der Metaphase (54).

3.1.3 Chromatin-Remodelling

CSB ist weiterhin ein Hauptfaktor für die Erhaltung und Remodellierung von Chromatinstrukturen und könnte durch diese Eigenschaften weiteren Einfluss auf Transkriptionsprozesse haben (55).

3.1.4 Interaktion mit p53 / Apoptoseregulation

Interessant ist weiterhin die Interaktion von CSB mit dem bekannten Tumorsuppressor p53 (56). Dabei scheint es so zu sein, dass p300 und CSB in Konkurrenz um die Bindung mit p53 stehen. CSB zeigt eine größere Affinität zu p53 und reguliert so die Transkriptions-Aktivität von p53 herunter. Fehlt CSB, so würde p53 durch p300 stabilisiert werden und die Zielgene von p53 in Konsequenz übermäßig aktiviert, inklusive der zur Apoptose führenden Gene. Auf diese Weise würde p53 in CS-Zellen toxisch wirken, weil es den wichtigen Transkriptionsfaktor p300 wegfängt (57). Zudem wurde gezeigt, dass CSB nach oxidativem Stress p300 rekrutiert. So wird die p53 Aktivität heruntermoduliert und dies begünstigt das Überleben der Zelle und zur Aufhebung des Zellzyklusarrestes nach Stress anstatt zum Zelltod (46). Des Weiteren zeigte sich kürzlich, dass CSB und CSA auch der p53 vermittelten Apoptose nach Stress entgegenwirken, indem sie den Abbau von p53 durch Ubiquitinierung induzieren (58).

3.1.5 Ubiquitinierung

Dass der CSA-enthaltende ROC1-Cul4A-DDB1 Komplex eine Ubiquitinierungsaktivität besitzt, wurde bereits im Abschnitt über die NER erwähnt. Dieser Komplex ubiquitiniert sowohl die RNA-Polymerase II und CSB, als auch CSA, wie neuere Daten belegen. Die Bedeutung der CSA-Ubiquitinierung ist allerdings noch nicht geklärt (59-61).

Auch die Mdm2 abhängige Ubiquitinierung von p53, die dessen Aktivität beeinflusst, wird von CSA und CSB reguliert (58).

3.1.6 Basenexzisionsreparatur

CSB-defiziente Zellen zeigen eine Akkumulation oxidativer DNA-Schäden wie beispielsweise 8-oxo-dG oder 8-oxo-dA (62). Ein Zusammenhang zwischen CSB und der BER konnte mittels hOGG1 (8-oxo-dG-glycosylase/apurinic-lyase) hergestellt werden (63). Diese Interaktion konnte ebenso für die mitochondriale BER gezeigt werden (64). Zudem zeigte sich, dass CSB die Inzisionsaktivität von APE1 (apurinic-endonuclease 1) durch direkte Interaktion stimuliert (65).

3.1.7 Altern im Cockayne-Syndrom

Alle genannten Bereiche, in denen vor Allem CSB, aber auch CSA involviert sind, hängen bis zu einem gewissen Grad auch mit der Alterung zusammen. Zum Teil sogar sehr direkt, wie beispielsweise die Regulierung von p53 zeigt (3.1.4), einem Protein, das durch die Regulation der Apoptose auch zum Altern beitragen kann. Die Fähigkeit zur Ubiquitinierung (3.1.5) hängt ebenfalls mit der Regulation von p53 zusammen, allerdings auch mit der Nukleotidexzisionsreparatur. Die Interaktion der CS-Proteine mit anderen Proteinen der Nukleotidexzisionsreparatur und Basenexzisionsreparatur (3.1.6 und 3.1.1), ist nötig um die DNA intakt zu erhalten. Eine Störung kann schlimmstenfalls zur Apoptose beispielsweise von Gewebestammzellen führen und somit zum Altern des Gewebes.

Im selben Zusammenhang ist auch die Fähigkeit von CSB zur Remodellierung von Chromatin (3.1.3) zu sehen. Diese kann der Zugänglichkeit der DNA für Reparaturprozesse dienen.

Die Transkription (3.1.2) wird nach oxidativem Stress von CSB reguliert. So kann die Zelle zu ihren üblichen Prozessen zurückkehren. Ist die Zelle nicht in der Lage, die Transkription wieder zu initiieren, bedeutet dies auf Dauer vermutlich ihren Tod (52).

Alle diese Zusammenhänge zwischen Funktionen der CS-Proteine und dem vorzeitigen Altern sind jedoch nicht ausreichend, um den komplexen Phänotyp, der in CS-Patienten auftritt, zu erklären.

3.1.8 Mitochondriale Interaktion

Ein Teil der CS-Symptome, wie beispielsweise Kleinwuchs, Katarakte, Verkalkung des Gehirns, Neurodegeneration oder vorzeitiges Altern, überschneidet sich auffällig mit den Symptomen von Erkrankungen mit defekten Mitochondrien, sogenannten Mitochondriopathien.

Zunächst konnte kein Zusammenhang zwischen den beim Cockayne-Syndrom betroffenen Proteinen CSA und CSB und den Mitochondrien hergestellt werden.

In eigenen Arbeiten konnten wir zeigen, dass Fibroblasten von CSA oder CSB-defizienten Patienten durch UV-Bestrahlung oxidativ gestresst, im Vergleich mit Wildtyp-Zellen eine deutliche Erhöhung der mitochondrialen Common-Deletion aufweisen. Zudem wurde gezeigt, dass die Ko-Inkubation von Vitamin E als Radikalfänger während einer UV-Bestrahlung in CSA-Zellen ausreicht, die Induktion der CD zu vermeiden. (64).

Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass die beiden Proteine nach oxidativem Stress z.B. durch Wasserstoffperoxid induziert, in die Mitochondrien translozieren (64, 66). Dort interagieren CSA und CSB mit Proteinen, die zur mt BER (Basenexzisionsreparatur) gehören (64). Dies legt nahe, dass CSA und CSB eine Rolle im Schutz vor mt DNA-Schäden spielen. Wie genau sich die CS-Proteine auf diese Fähigkeit auswirken ist allerdings nicht geklärt.

Da wir und andere nachweisen konnten, dass im Alterungsprozess vermehrt Mutationen der mitochondrialen DNA auftreten, speziell im subkutanen Fett von CSB^{m/m}-Mäusen, und dass es im Bereich des subkutanen Fettes zu Verlusten von Zellen durch erhöhten Umsatz kommt (64), haben wir nun untersucht, wo in der Haut normaler, gealterter Mäuse vermehrt Mutationen zu beobachten sind, wie der erhöhten Zellumsatz beim Altern zustande kommt und welche Rolle oxidativer Stress bei diesen Vorgängen spielt.

4. Zusammenfassung Versuche

In dieser Dissertation wurde die Haut von Wildtyp-Mäusen verschiedenen Alters auf das Auftreten der mitochondrialen D17-Deletion untersucht. Diese Deletion liegt in etwa an der Position, in der sich im humanen Mitochondrium die Common-Deletion befindet, die durch oxidativen Stress induziert werden kann (23, 67). Es sollte gezeigt werden, wie sich diese Deletion im chronologischen Altern unbehandelter Mäuse verhält, wann sie frühestens auftritt und auch, in welchen Körperbereichen und Hautsegmenten sie verstärkt zu messen ist. Dies bildet auch einen Hintergrund zu den in (64) veröffentlichten Daten.

Ebenso wurde untersucht, wie oxidativer Stress in Form von UVA-Bestrahlung sich auf die Zellen auswirkt. Es war bekannt, dass die mitochondriale Common-Deletion durch UV-Bestrahlung induziert wird. In einem Vorläufer-Experiment mit CSB-defizienten Zellen zeigte sich, dass auch die abgestorbenen Zellen des Überstandes viel CD aufwiesen. Deshalb sollte untersucht werden, wie lange die UVA-bestrahlten Zellen viabel bleiben oder wie schnell sie absterben. Im Fall des Zelltodes war zu klären, auf welche Art er stattfindet. Des Weiteren soll die Menge an mitochondrialer Common-Deletion als Marker für mitochondriale DNA Schäden und deren Verteilung und Häufigkeit in viablen, apoptotischen und nekrotischen Zellen gemessen werden.

Um des Weiteren mehr über die Vorgänge in Fibroblasten unter oxidativem Stress zu erfahren, wurde der zeitliche Verlauf von subletalem H_2O_2 -Stress untersucht. Hierfür wurde untersucht, wie lange sich eine subletale Dosis von H_2O_2 im Medium befindet und wie viel davon sich im Zellinneren nachweisen lässt.

C Material und Methoden

1. Geräte

Gerät	Modell	Firma
Brutschrank	Heracell 240	Thermo/Kendro, Dreieich/Hanau
Brutschrank Hypoxie	APT.line CB-CO ₂ Inkubator mit O ₂ - Regelung	Binder, Tuttlingen
Geldokumentation, UV- Transilluminator	RH-5.1 darkroom hood, easy 442K Kamera	Herolab, Wiesloch
Drehteller	KDE 015; gebaut vom Hausmeisterdienst	MTE, Weinstadt-Endersbach/ UKT, Tübingen
ELISA Reader	Multiscan Ex	Thermo, Waltham
FACS	BD FACS Calibur	BD; Heidelberg
FACS-Sorter	BD FACS Aria-Zellsorter	BD; Heidelberg
Fluoreszenzreader	Tristar LB 941	Berthold Technology, Bad Wildbad
Gelelektrophorese- Apparatur	Protean II, Modell 45-2020i	BioRad, München
Heizblock	Thermomixer Model Comfort LS2	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Axiovert25 Invers, Axiovert200 Fluorescence, HBO100	Zeiss, Jena
PCR Maschine	Primus 96 plus	MWG Biotech, Ebersberg
pH-Meter	CG842	Schott, Wertheim
Photometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Research, Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipette boy	Hirschmann, Eberstadt
Real Time PCR Maschine	LightCycler®480/ iCycler	Roche, Mannheim/ BioRad, München
Sterilbank	Hera Safe KS 18	Heraeus, Frotsher
UVA-Lampe	Sellasol 1200	Sellas, Gevelsberg
Vortexer	Reax Top	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	WB22 Funke	Medingen, Freital
Zentrifuge	Biofuge pico, Biofuge fresco/ Heraeus, Multifuge 3S-R	Thermo Waltham/ Dreieich, Hanau

Tab. 1 Geräte

2. Materialien

2.1 Kits

Kits	Hersteller
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Bioscience
QIAamp DNA-Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Mitochondria Isolation Kit human	Miltenyi Biotec
Sso Fast EvaGreen Supermix	BioRad, München
SybrGreen Supermix	BioRad, München

Tab. 2 Kits

2.2 Enzyme

Enzyme	Bezugsquelle
DNaseI	Sigma, Deisenhofen
Taq-DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden

Tab. 3 Enzyme

2.3 Primer

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)
CD sense (68)	ACC CCC ATA CTC CTT ACA CTA TTC C
CD antisense (68)	AAG GTA TTC CTG CTA ATG CTA GGC T
IS sense (68)	GAT TTG GGT ACC ACC CAA GTA TTG
IS antisense (68)	AAT ATT CAT GGT GGC TGG CAG TA
PL 47 (23)	TGC TTA CCT TGT TAC GAC TTA
PL 48 (23)	CGC TCT ACC TCA CCA TCT CTT
PL 85 (23)	TAA GTC GTA ACA AGG TAA GC
PL 86 (23)	GAT GGT GGT AGG AGT CAA AA

Tab. 4 Primer

2.4 Puffer und Medien

2.4.1 Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x) -242g Tris-base, 100ml 0,5M EDTA-Lösung (pH8), 57,1g Essigsäure, werden mit H₂O_{bidest} auf 1l aufgefüllt.

Ladepuffer -Glycerin und 1x TAE werden 1:1 gemischt, und 0,2% Farblösung (Orange G oder Bromphenolblau) sowie 1/10.000 Gel-Red werden hinzugefügt.

2% Agarosegel -2% Agarose (w/v) wird mit der entsprechenden Menge 1x TAE-Puffer aufgefüllt und erhitzt.

2.4.2 Zellkultur

Krypuffer -60% Kulturmedium, 12% DMSO, 28% FCS, sterilfiltrieren.

2.5.3 Puffer für Maushautexperimente

Lösung B -30mM HEPES, 4mM Glukose, 3mM KCl, 130mM NaCl, 1mM Na₂HPO₄, 0,25% Trypsin auf 500ml mit H₂O_{bidest} auffüllen und sterilfiltrieren.

2.4.4 H₂O₂ Bestimmung

Natriumphosphat-Puffer -0,25M Natriumphosphat werden in H₂O_{bidest} gelöst und auf pH 7,4 eingestellt

2.5 Chemikalien

Chemikalien und Materialien	Bezugsquelle
Acrylamid/ Bisacrylamid (30%/ 0,8%)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Bovine	Sigma, Deisenhofen
Amplex® Red reagent	Life technologies, Darmstadt
D (-) Mannitol	Roth, Karlsruhe
D (+) Sucrose	Fluka, Buchs
DAPI	Life technologies, Darmstadt
dNTP Set, PCR Grade	QIAGEN, Hilden

Material und Methoden

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Fluka, Buchs
Dithionit	Fluka, Buchs
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching
Eserserum	Jackson Immuno Research, Suffolk
Ethylen- diamin- tetra Essigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Fetales Rinderserum (FCS)	Thermo, Waltham
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
GelRed	Biotium, Hayward
Glycin	Roth, Karlsruhe
Größenstandard, 100 bp Plus DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon Rot
Horseradish Peroxidase (HRP) (EIA Grade)	Life technologies, Darmstadt
H_2O_2 / Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Sigma, Deisenhofen
Minimum Essential Medium (MEM) ohne Phenolrot	Life technologies, Darmstadt
MEM with Earle's Salts and L-Glutamine	PAA; Pasching
Methanol	VWR, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Fluka, Buchs
Magnesiumchlorid-Puffer (25mM)	QIAGEN, Hilden
Milchpulver	DM, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumfluorid	Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphat	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Fluka, Buchs
Natriumdodecylsulfat	Fluka, Buchs
PCR-Puffer (10x)	QIAGEN, Hilden
Propanol	Merck, Darmstadt
Propionaldehyd	Fluka, Buchs
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
Streptomycin/ Amphotericin B	Life technologies, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tris	Sigma, Deisenhofen
TritonX100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin	Life technologies, Darmstadt Promocell, Troisdorf
Trolox	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Urea	Roth, Karlsruhe
Vitamin C Pulver	DM, Karlsruhe

Tab. 5 Chemikalien

2.6. Gebrauchsmaterialien

Materialien	Firma
6-well-Platten	Greiner, Frickenhausen
24-well-Platten	Greiner, Frickenhausen
96-well-Platten	Greiner, Frickenhausen
96-well PCR Platten	Peqlab, Erlangen
Falcons	Greiner, Frickenhausen
Filtertips 0,5 - 10 µl	Greiner, Frickenhausen
Freezing Container „Mr Frosty“	Thermo, Waltham
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Küvetten	Ratiolab GmbH, Dreieich-Buchsschlag
Nitrozellulosemembran	Millipore, Billerica
Objekträger SuperFrost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
PCR Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml)	Costar, Fernwald
Plastikwaren für Zentrifugen, PCR	BD Bioscience, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter (0,22µm)	Millipore, Billerica
T 75 Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Whatman-Papier	GE-Healthcare, Chalfont St. Giles

Tab. 6 Gebrauchsmaterialien

2.7 PC-Programme

Programm	Hersteller
Microsoft Word XP	Microsoft
Microsoft Excel XP	Microsoft
Microsoft PowerPoint XP	Microsoft
Endnote X4	Thomson Reuters
Adobe Photoshop CS2	Adobe
iCycler	BioRad
Easy Win 32	Herolab

Tab. 7 PC-Programme

3. Zellen und Zelllinien

3.1 Fibroblasten

Name	Genotyp	Herkunft
FF3	Wildtyp / primär	AG Berneburg
F92	Wildtyp / primär	AG Berneburg
C5RO-WT	Wildtyp / primär	AG Prof. Leon Mullenders, Leiden NL
WT*31.3.03	Wildtyp / primär	AG Berneburg
WT*4.11.02	Wildtyp / primär	AG Berneburg
WT*01	Wildtyp / primär	AG Berneburg
WT*04	Wildtyp / primär	AG Berneburg
WT*10	Wildtyp / primär	AG Berneburg
CS3BE	CSA defizient / primär	AG Prof. Leon Mullenders, Leiden NL
CS6BR	CSA defizient / primär	AG Prof. Lehmann, Brighton UK
CS7PV	CSA defizient / primär	AG Prof. Stefanini, Paria, Italien
CS1AN	CSB- defizient / primär	AG Prof. Leon Mullenders, Leiden NL
CS1IAF	CSB-defizient / primär	AG Prof. Leon Mullenders, Leiden NL
CS12PV	CSB-defizient / primär	Italien
CS2TAN	CSB-defizient / primär	AG Prof. Mullenders, Leiden NL
CS4BR	CSB-defizient / primär	AG Prof. Lehmann, Brighton UK
CS1AN-S3G2	CSB-defizient-immortalisiert	AG Prof. Leon Mullenders, Leiden NL
CS3BE-S3G1	CSA-defizient-immortalisiert	AG Prof. Leon Mullenders, Leiden NL

Tab. 8 Liste der Zellen

4. Zellkultur

4.1 Zellkultur und Konservierung

4.1.1 Kultivierung von Fibroblasten

Alle Fibroblasten werden in MEM (Minimal essential Medium) komplementiert mit 10% FCS (fetal calf serum) und 1% Streptomycin/Amphotericin B bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei Erreichen einer Konfluenz von mindestens 80% werden die Zellen wie folgt gesplittet.

Das Kulturmedium wird aus der Zellkulturflasche abgesaugt oder abgeschüttet. Zellen werden mit circa 10 ml PBS (Phosphate-buffered saline; PAA) gewaschen. Nach Entfernen des PBS werden die Zellen durch kurze Inkubation mit 3ml Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Das Trypsin wird nach Lösung aller Zellen mit derselben Menge Kulturmedium abgestoppt.

Wenn benötigt kann die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Ebenso können bei Bedarf die Zellen zentrifugiert werden um das restliche Trypsin zu entfernen.

Die Zellen werden dann in einem geeigneten Volumen frischen Kulturmediums aufgenommen und ausgesät.

Danach werden die Zellen wieder in den Zellkulturschrank gegeben.

4.1.2 Isolation von Fibroblasten

Fibroblasten werden aus Hautstücken isoliert. Dafür wird das subkutane Fett grob entfernt, die Hautstücke in kleine Stücke geschnitten und mit der Epidermisseite nach unten in eine 6-well-Platte gelegt. Nach einer kurzen Antrocknungszeit werden die Hautstücke mit warmem Kulturmedium (MEM + 10% FCS + 1% Streptomycin/Amphotericin B) überschichtet und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Wenn Zellen aus den Hautstücken herauswachsen, können diese geerntet werden.

4.1.3 UVA-Bestrahlung von Zellen

Zellkulturmedium wird aus der Kulturschale abgenommen. Danach werden die Zellen mit PBS überschichtet und auf einem Drehteller unter die UV-Lampe gestellt.

Nach der Bestrahlung wird das PBS abgesaugt und das Medium wieder in die Kulturschale gegeben.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgt repetitiv, 3-mal täglich mit einem Abstand von ca. 4h an insgesamt 5 Tagen in der Woche.

4.1.4 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer

5µl Zellsuspension werden mit ebenfalls 5µl Trypanblau gemischt und in die mit dem Deckplättchen abgedichtete Zählkammer gegeben. Danach werden die Zellen in den vier Eckquadranten der Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Aus der gezählten Zahl wird dann der Mittelwert gebildet.

Daraus kann dann die Zellzahl pro ml errechnet werden:

$$\text{Zellkonzentration [ml}^{-1}\text{]} = \text{Mittelwert gezählte Zellen} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Durch die Tiefe der Kammer definiert beträgt der Kammerfaktor 10^4

Die Gesamtzellzahl im gegebenen Volumen berechnet sich wie folgt:

Gesamtzellzahl = Mittelwert gezählte Zellen x Kammerfaktor x Verdünnungsfaktor x Volumen des Mediums

4.1.5 Kryokonservierung von Zellen

Zellen werden geerntet, das Pellet in 1ml Kryokonservierungspuffer resuspendiert und mit Hilfe des Freezing Containers „Mr. Frosty“ langsam auf -80°C gebracht. Zellen werden später in Flüssigstickstoff gelagert.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1 DNA-Isolation

DNA-Isolation erfolgt mit dem QIAamp DNA-Mini Kit von Qiagen nach Anleitung des Herstellers.

5.2 PCR

5.2.1 PCR zur Bestimmung mitochondrialer (mt) Deletionen

Diese Methode ist bereits mehrfach publiziert und von anderen Arbeitsgruppen reproduziert worden (20, 21, 23, 67, 69-71).

In der DNA von Mitochondrien können alters- oder schädigungsbedingt Deletionen auftreten. Die Orte an denen die Brüche stattfinden sind dabei nicht willkürlich über das mitochondriale Genom verteilt sondern sie befinden sich an bestimmten Stellen.

Bei der humanen „Common-Deletion“ handelt es sich um eine solche Deletion. Um sie zu messen werden Primer genutzt, die knapp außerhalb des Bereiches liegen, der durch die Deletion verloren geht.

Falls keine Deletion vorliegt, liegen diese Bereiche weit auseinander, z.B. 4977 Basenpaare im Fall der humanen Common-Deletion. Dieser Abstand ist zu groß um bei dieser PCR ein Produkt zu liefern. Erst wenn eine mitochondriale Deletion an dieser Stelle stattgefunden hat, liegen die beiden Primersektionen nahe genug beieinander.

Die Common-Deletion wird mit Hilfe einer Real-Time-PCR gemessen. Dabei wird die Anzahl der Vermehrungszyklen gezählt, die benötigt wird, dass die zunehmende DNA-Menge einen gewissen Schwellenwert übersteigt.

Um die amplifizierte Deletionsmenge in Relation zur Gesamtmenge mitochondrialer DNA zu setzen wird zusätzlich DNA von einer Region des Mitochondriums als interner Standard (IS) amplifiziert, von der bislang keine Deletionen bekannt sind.

Die murine D17-Deletion entspricht in ihrer Position und Größe der humanen Common-Deletion. Zudem teilt sie auch andere Eigenschaften der CD (20, 23). Die murine D17-Deletion wird mit Hilfe einer semiquantitativen PCR gemessen. Das so entstandene PCR-Produkt kann für die murine D17-Deletion mittels eines Agarosegels nachgewiesen werden. Die Menge an Deletion kann danach durch densitometrische Messung am PC mit Photoshop verglichen werden. Um einen Vergleich zur Gesamtmenge der mt DNA in der Probe zu bekommen wird zeitgleich eine PCR einer stabilen Region der mt DNA vorgenommen, die in dieser Arbeit als mIS (muriner interner Standard) bezeichnet wird.

5.2.2 Ansätze

murine D17-Deletion: Primer: PL85/PL86, Größe des PCR-Produkts im Gel: 851 bp (Basenpaare).

Die PL85/86-Primer wurden ausgewählt, weil ihre Position der entspricht, die im humanen System von der Common-Deletion eingenommen wird (15).

zugehörige Housekeeping-Primer: PL47/48 (als interner Standard), Größe des PCR-Produkts im Gel: 355 bp.

	Ansatz
Puffer	5µl
H ₂ O	41,8µl
dNTPs	1,5µl
Primer1	0,75µl
Primer2	0,75µl
Taq	0,2µl
Template	5µl
Gesamt	55µl

Tab. 9 Ansatz D17-PCR

5.2.3 PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Zeit
1	95°C	2min
35x		
2	95°C	30s
3	56°C	30s
4	72°C	2min
Ende der Wiederholungen		
5	72°C	5min

Tab. 10 PCR-Programm D17-Deletion

5.3 Real-Time-PCR

5.3.1 Ansätze

humane Common-Deletion: Primer: CD1 und CD2

zugehörige Housekeeping-Primer: IS1 und IS2

	Ansatz
H ₂ O	11µl
SybrGreen-SuperMix / Sso Fast EvaGreen Supermix	12,5µl
Primer 1	0,2µl
Primer 2	0,2µl
Template	5µl
Gesamt	24µl

Tab. 11 Ansatz CD Real-Time-PCR

5.3.2 Real-Time-PCR-Programme

Schritt	Temperatur	Zeit (SybrGreen / EvaGreen)
1	95°C	2min / 2min
47x		
2	95°C	5s / 5s
3	58°C	30s / 15s
4	72°C	10s / -

Tab. 12 Programm CD Real-Time-PCR

5.4 Agarosegelelektrophorese

Agarose wird in TAE-Puffer (Tris-Acetic-Acid-EDTA-Puffer) mit Hilfe einer Mikrowelle erhitzt, bis alles gelöst ist. Flüssige Agarose wird in die vorbereitete Gelkammer gegossen und mit entsprechendem Kamm für Taschen versehen. Nach dem Abkühlen und Festigen des Gels wird dieses in die Laufkammer gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. Danach werden die mit Laufpuffer gemischten DNA-Proben in die Taschen eingefüllt und eine Spannung wird angelegt (100V). Nach ca. 20 min kann das Gel unter einer UV-Lampe analysiert werden.

5.5 FACS (Fluorescence-activated-cell-sorting)

5.5.1 Messung intrazellulärer Wasserstoffperoxidgehalt

50µg von CM-H₂DCF-DA, einem Abkömmling von Dihydrofluorescein werden in 17,2µl DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Dies entspricht 5mM. Nach kurzem, vorsichtigem Vortexen, werden 600µl PBS dazu gegeben und invertiert. In diese Lösung werden 7x10⁶ Zellen gegeben und für insgesamt 45min bei 37°C inkubiert. Zu den ungefärbten Kontrollzellen wird die gleiche Menge DMSO gegeben und gleichzeitig inkubiert. Alle 10 Minuten wird die Zellsuspension vorsichtig geschwenkt.

Nach der Inkubationszeit werden die Zellen für 5 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet zweimal mit 10 ml PBS gewaschen, dann in Medium (MEM + 10%FCS) resuspendiert. Die ungefärbten Zellen werden jeweils in zwei Aliquots aufgeteilt, die gefärbten in drei. Zu einem Aliquot der gefärbten und zu einem Aliquot der ungefärbten Zellen wird 25µM H₂O₂ als Positivkontrolle gegeben zu einem anderen gefärbten Aliquot 200µM H₂O₂. Bei den ungefärbten Zellen wird zu einem Aliquot ebenfalls 25µM H₂O₂ gegeben, der übrige Teil wird als Negativkontrolle verwendet.

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn des Stresses werden Zellen zur Messung des intrazellulären H₂O₂-Gehaltes entnommen und im FACS-Calibur gemessen.

5.5.2 Messung von Apoptose und Nekrose

Die Zellen wurden nach Angaben des Herstellers mit dem AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I gefärbt und innerhalb einer Stunde mit dem BD FACS Aria-Zellsorter gemessen und gesortet.

5.6 In-vivo Untersuchungen in der Maus

5.6.1 Mausliste

Genotyp	Hintergrund	Geschlecht	Alter	Bezeichnung
WT	C57BL/6	männlich	3Monate	3MI
WT	C57BL/6	weiblich	3Monate	3MII
WT	C57BL/6	weiblich	3Monate	3MIII
WT	C57BL/6	weiblich	9Monate	9MI
WT	C57BL/6	weiblich	9Monate	9MII
WT	C57BL/6	männlich	17 Monate	17MI
WT	C57BL/6	weiblich	24Monate	24MI
WT	C57BL/6	männlich	24Monate	24MII
WT	C57BL/6	weiblich	24Monate	24MIII
WT	C57BL/6	männlich	24Monate	24MIV

WT	C57BL/6	weiblich	24Monate	24MV
XPG ^{-/-}	Bl6/Fvb	weiblich	4Wochen	XPG 4-1
XPG ^{-/-}	Bl6/Fvb	weiblich	13 Wochen	XPG 13-1
XPG ^{-/-}	Bl6/Fvb	männlich	13 Wochen	XPG 13-4
XPG ^{-/-}	Bl6/Fvb	männlich	13 Wochen	XPG 13-5
TLR2 ^{-/-}	Balb-c	weiblich	3 Monate	TLR2-ko-3M
TLR2 ^{-/-}	Balb-c	weiblich	16 Monate	TLR2-ko-16M I
TLR2 ^{-/-}	Balb-c	weiblich	16 Monate	TLR2-ko-16M II

Tab. 13 Mausliste

5.6.2 Isolation einzelner Hautpartien und von Körperfett

Die tote Maus wird, falls sie gefroren ist, bei Zimmertemperatur aufgetaut. Währenddessen können Pinzetten, Schere und Eppendorff-Reaktionsgefäße vorbereitet und beschriftet werden. Dann wird mit Hilfe der Schere und Pinzette die Haut der Maus eingeschnitten. Dabei sollte möglichst so flach geschnitten werden, dass die Organe nicht freigelegt werden. Die Haut sollte zudem möglichst ohne sichtbare Fettdepots entfernt werden.

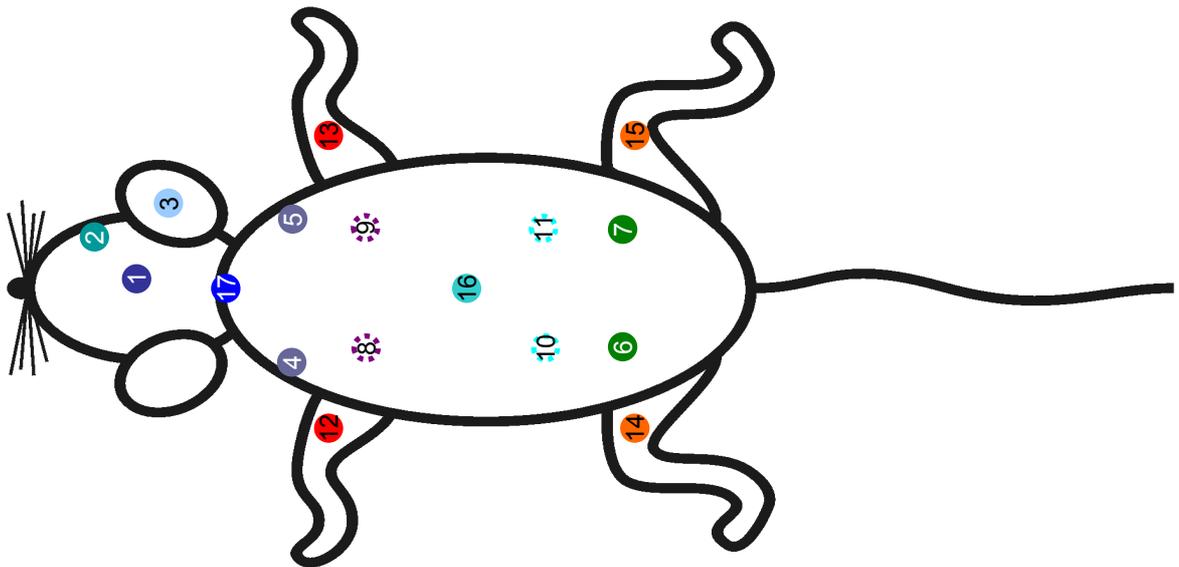


Abb. 3 Areale der Hautentnahme für die Messung der D17-Deletion. 1-Stirn, 2-Wangen, 3-Ohr, 4+5-Schultern, 6+7-unterer Rücken, 8+9-Brust, 10+11-Bauch, 12+13-Vorderpfoten, 14+15-Hinterpfoten, 16-mittlerer Rücken, 17-Nacken.

Nach der vorsichtigen Entfernung der Haut von den verschiedenen Arealen wird das Körperfett entnommen. Hierfür werden die sichtbaren Fettdepots mit der Pinzette leicht hochgehoben und dann mit der Schere abgeschnitten, wenn nötig unter mikroskopischer Kontrolle. Alle Proben werden in Eppendorff-Reaktionsgefäßen gesammelt.

5.6.3 Isolation des subkutanen Fettes

Zur Isolation des subkutanen Fettes werden Pinzetten und Skalpelle, idealerweise mit abgerundeter Klinge (z.B. Fig. 10), benötigt. Die Haut wird mit den Haaren nach unten auf eine saubere Unterlage (z.B. Petrischale) ausgebreitet. Während die Haut mit der Pinzette an einer Ecke festgehalten wird, löst man mit Hilfe des Skalpells durch vorsichtiges darüberfahren das subkutane Fett ab, wenn nötig unter mikroskopischer Kontrolle.

5.6.4 Auftrennung von Dermis und Epidermis

Um Dermis und Epidermis voneinander zu trennen wird nach dem Entfernen des subkutanen Fettes die übrige Haut mit der Epidermis (Fellseite) nach unten in eine Petrischale mit etwas Lösung B (siehe 2.5.3) gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Idealerweise wird die Haut in der Lösung noch etwas glatt gestrichen. Bei Bedarf können auch noch Fellhaare entfernt werden.

Am nächsten Tag kann die Epidermis mit Hilfe zweier Pinzetten durch leichtes Streichen von der Dermis abgenommen werden.

5.7 Oxidativer-Stress in Fibroblasten

5.7.1 H₂O₂-Messung im Medienüberstand

Die Messung des H₂O₂ – Gehaltes im Medienüberstand erfolgt mit dem Farbstoff Amplex-Red. Dieser Farbstoff an sich, ist nicht fluoreszent. In Anwesenheit von HRP und H₂O₂ reagiert er mit einer 1:1 Stöchiometrie zu Resorufin, einem fluoreszierendem Farbstoff.

Um eine Messung mit Amplex-Red zu ermöglichen müssen die Zellen frei von Phenolrot kultiviert werden.

Zellen werden in 6-well-Platten bis zur Konfluenz wachsen gelassen. Danach wird das Medium (MEM + 10% FCS + 1% Streptomycin/Amphotericin B, phenolrotfrei) gegen Medium mit nur 0,5% FCS ausgetauscht.

Amplex red sowie HRP werden im Dunklen auf Zimmertemperatur gebracht.

Zu gewissen Zeitpunkten wird dem Medium H₂O₂ zugegeben, so dass sich eine Gesamtkonzentration von jeweils 25µM ergibt.

Während der Inkubationszeit wird eine Verdünnungsreihe von H₂O₂ im Bereich zwischen 0 und 25 µM in Kulturmedium vorbereitet. Davon werden je 50µl in einer 96-well-Platte vorgelegt

Nach Ablauf der Zeit werden aus jedem well 50µl Überstand abgenommen und ebenfalls in die 96-well-Platte gegeben.

Dann werden 4,85 ml 1x Natriumphosphat-Puffer mit 100µl HRP (10 U/ml) und 50µl Amplex-Red (10mM) invertiert und 50µl hiervon in jedes well gegeben.

Material und Methoden

Nach einer Inkubationszeit von einer halben Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur wird die 96-well Platte am Fluoreszenzreader gemessen.

emission/extinction: Amplex-Red: 530/590 nm

D Ergebnisse

1. Verteilung der D17 Deletion in muriner Haut

Cockayne-Syndrom Patienten weisen als eines der hervorstechendsten Merkmale reduziertes subkutanes Fett, insbesondere im Bereich des Gesichtes auf. Untersuchungen an 130 Wochen alten $CSB^{m/m}$ -Mäusen und an $CSA^{-/-}$ -Mäusen ergaben deutlich erhöhte Mengen an muriner D17-Deletion im subkutanen Fett des Gesichtsareals. Die untersuchten $CSB^{m/m}$ -Mäuse wiesen denselben Phänotyp wie CS-Patienten mit reduziertem subkutanem Fett im bukkalen Bereich auf. Ursache hierfür war der durch Apoptose erhöhte Zellumsatz des subkutanen Fettes (64).

Der Verlust von subkutanem Fett im Gesichtsbereich ist auch ein Merkmal normalen Alterns. Um herauszufinden, ob das subkutane Fett auch in WT-Mäusen mit dem zunehmenden Alter steigende Raten mitochondrialer D17-Deletion aufweist und ob es dabei eine Verteilung über verschiedene Körperareale gibt, wurde die Haut verschiedener Mäuse in Areale unterteilt, entnommen, wiederum aufgeteilt in Dermis, Epidermis und subkutanes Fett und schließlich auf die enthaltene Menge D17-Deletion untersucht.

1.1 Wildtyp

Verwendet wurden Wildtyp-Mäuse mit dem Hintergrund C57BL/6, da dies der Mausstamm war, mit dem in Vorarbeiten gearbeitet wurde.

Mittels PCR wurde die Menge an D17-Deletion, der murinen Entsprechung der humanen Common-Deletion, im relativen Vergleich zum internen Standard der Maus (mIS), einem stabilen Teil der mt DNA, gemessen.

Ebenso wurden verschiedene Körperfettareale untersucht.

Die Haut von drei C57BL/6-Wildtyp-Mäusen im Alter von 12-13 Wochen (3MI, 3MII, 3MIII), von zwei C57BL/6-Wildtyp-Mäusen im Alter von 9 Monaten (9MI, 9MII), von einer C57BL/6-Wildtyp-Maus im Alter von 17 Monaten (17MI) und von fünf C57BL/6-Wildtyp-Mäusen im Alter von 24 Monaten (24MI-24MV), wurde in Areale unterteilt und abgetrennt. Daraus wurden Dermis, Epidermis und subkutanes Fett isoliert und die darin enthaltene D17-Deletion (Primer PL85 und PL 86) im Vergleich zum murinen internen Standard (mIS Primer PL47 und PL48) gemessen. Die Messung der D17-Deletion erfolgte in zwei PCR Durchgängen jeweils in Triplets.

Die gewählten Areale sind:

1) Stirn, 2) Wange, 3) Ohren, 4+5) Schulter 6+7) Rücken unten, 8+9) Brust, 10+11) Bauch, 12+13) Vorderpfoten, 14+15) Hinterpfoten, 16) Rückenmitte, 17) Nacken.

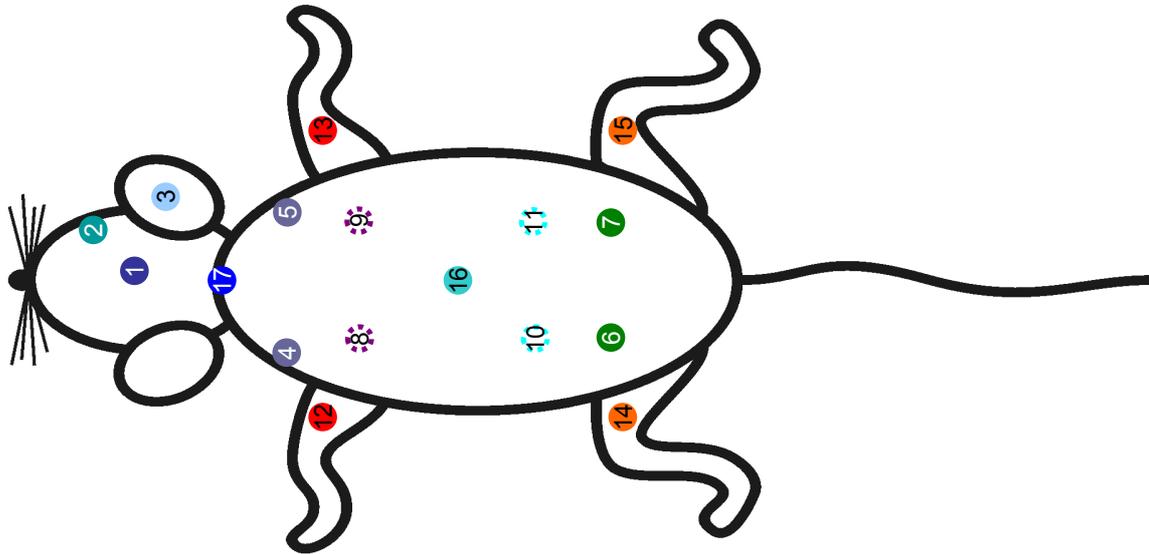


Abb. 3a Verschiedene Areale der Hautentnahme aus Mäusen.

Körperfett wurde an folgenden Stellen entnommen:

A) im unteren Bauchbereich, B) an den Flanken, C) vom Nacken, D) aus dem Achselbereich und E) vom seitlichen Hals.

Die Darstellung der D17-Deletion wird relativ zur Menge des internen Standards in Prozent in logarithmischer Skalierung angezeigt um auch die geringen Werte sichtbar zu machen. Die Linie markiert den Grenzbereich unter dem der Level der Deletion als nicht nachweisbar definiert wurde

1.1.1 Stirn

a) Epidermis

In der Epidermis wurde im Stirnbereich von C57BL/6-Mäusen keine Deletion gemessen.

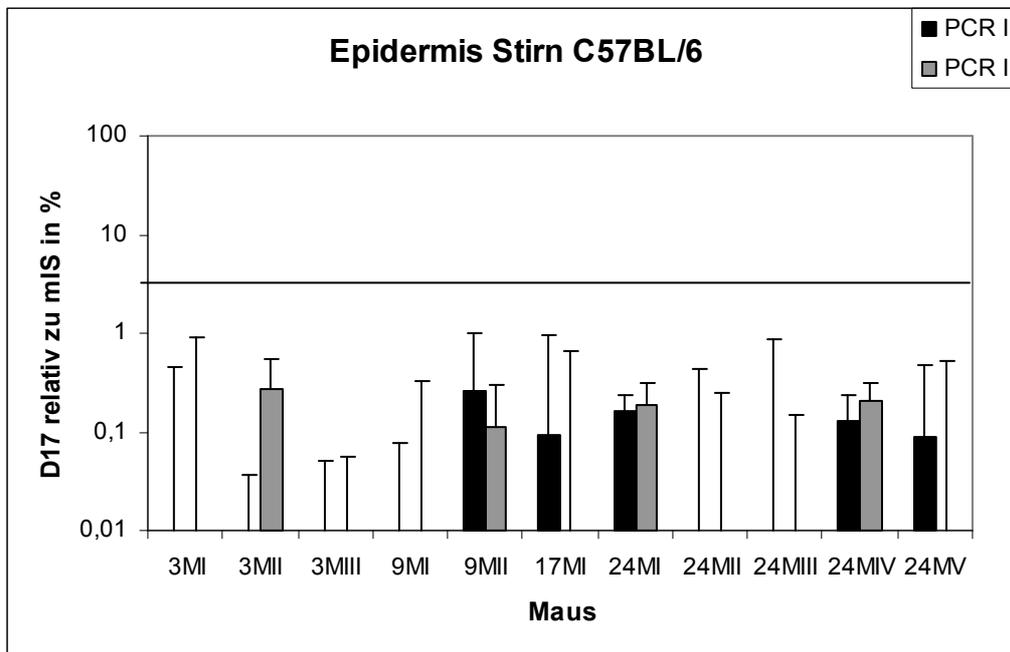


Abb. 4 D17-Deletion Stirn – Epidermis: In der Epidermis des Stirnbereiches wurde keine D17-Deletion gemessen.

b) Dermis

In der Dermis des Stirnbereichs von C57BL/6-Mäusen konnte keine D17-Deletion nachgewiesen werden.

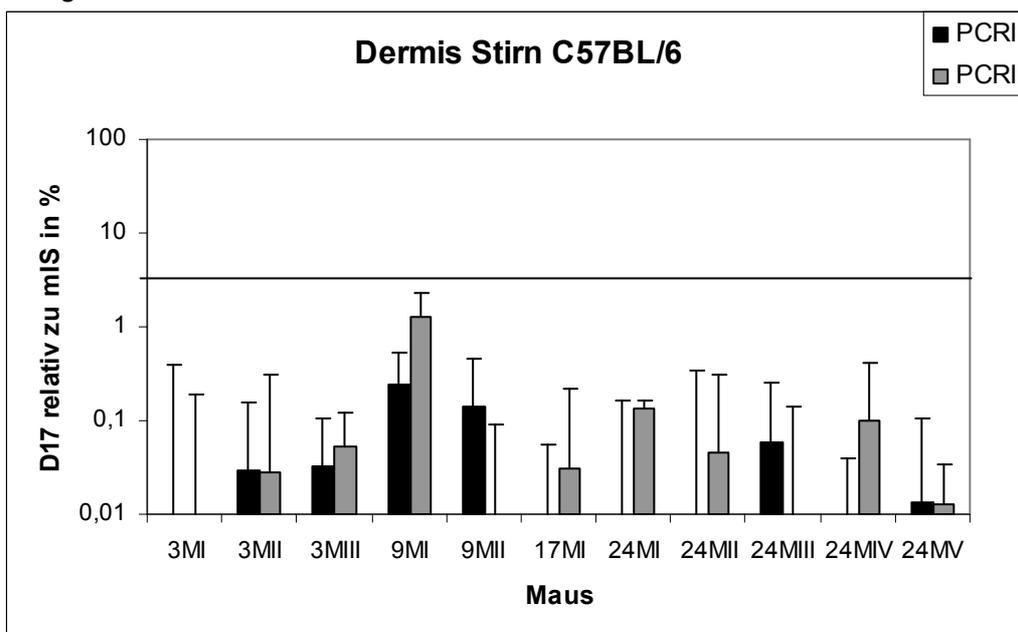


Abb. 5 D17-Deletion Stirn – Dermis: In der Dermis des Stirnbereichs konnte keine D17-Deletion nachgewiesen werden.

c) Subkutanes Fett

Im subkutanen Fett der C57BL/6-Mäusen zeigt sich eine geringfügige Erhöhung der D17-Deletion bei den ältesten Mäusen im Vergleich zu den drei Monate alten Mäusen.

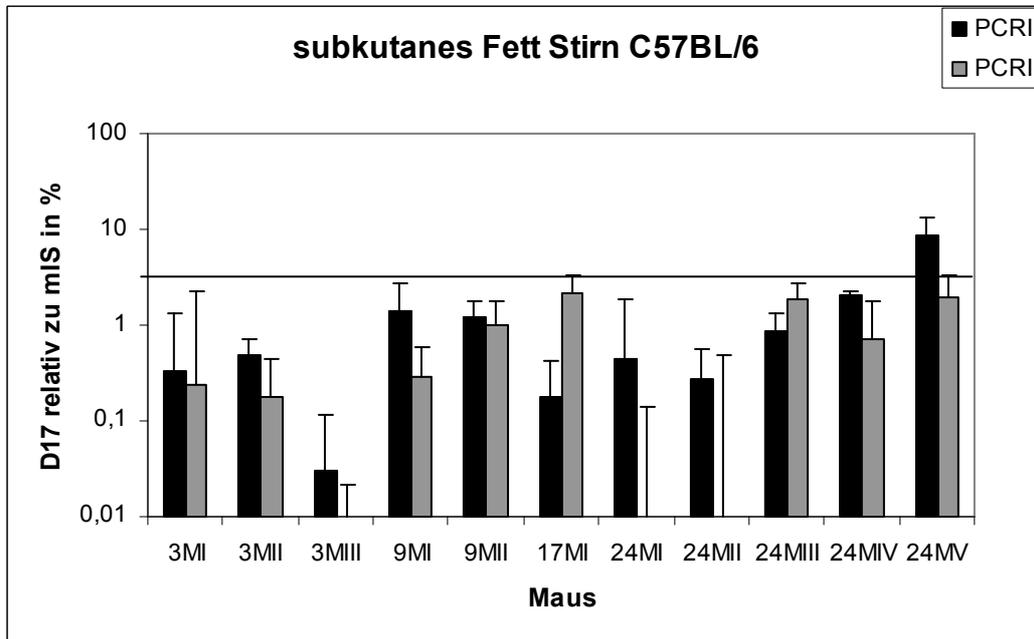


Abb. 6 D17-Deletion Stirn – subkutanes Fett: Die Maus 24 MV zeigt eine geringe Erhöhung der Deletion im Vergleich zu den 3 Monate alten Kontrollmäusen.

1.1.2 Wange

a) Epidermis

In der Epidermis der Wange von C57BL/6-Mäusen wurde keine D17 Deletion gemessen.

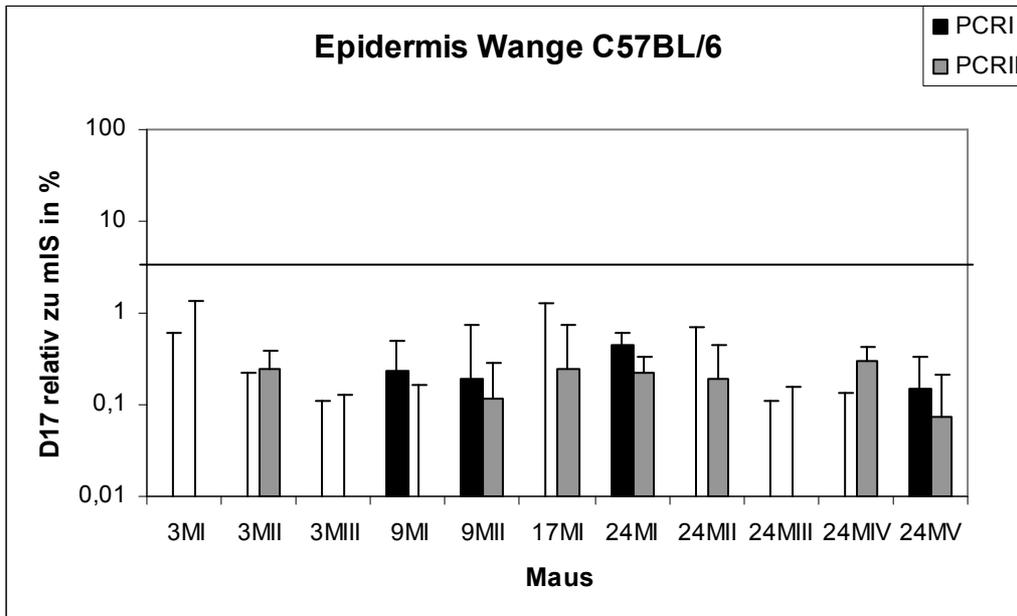


Abb. 7 D17-Deletion im Wangenbereich – Epidermis: In der Epidermis der Wangen wurde keine D17-Deletion gemessen.

b) Dermis

In der Dermis der Wange wurde keine deutliche Erhöhung der D17-Deletion gemessen.

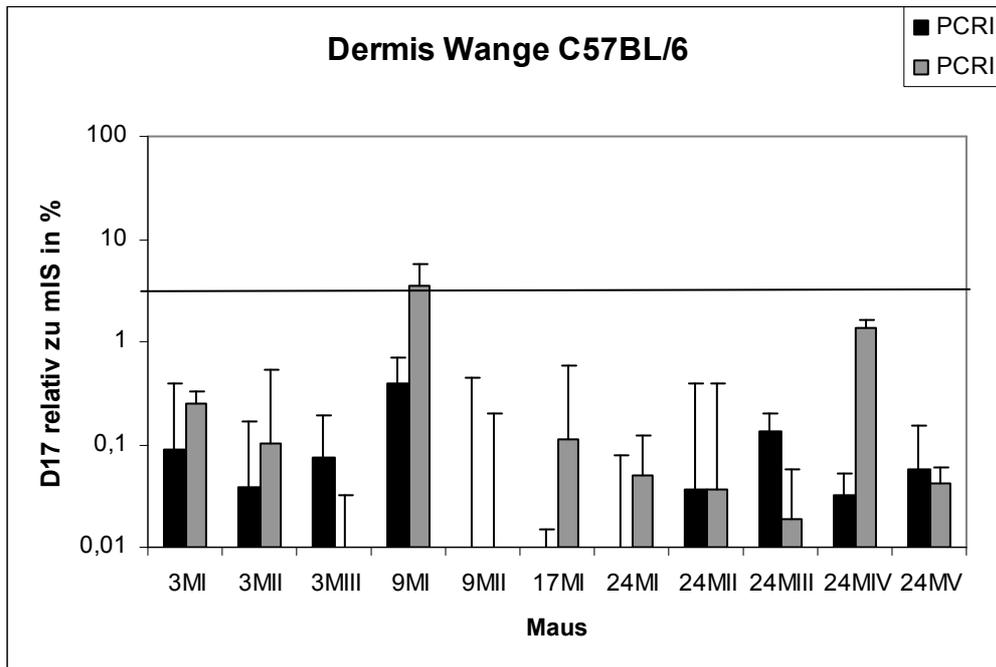


Abb. 8 D17-Deletion im Wangenbereich – Dermis: In der Dermis der Wange wurde keine deutliche Menge der D17-Deletion gemessen.

c) Subkutanes Fett

Im subkutanen Fett der Wange zeigte sich ab einem Alter von 9 Monaten in einzelnen Arealen eine geringfügige Erhöhung der D17-Deletion.

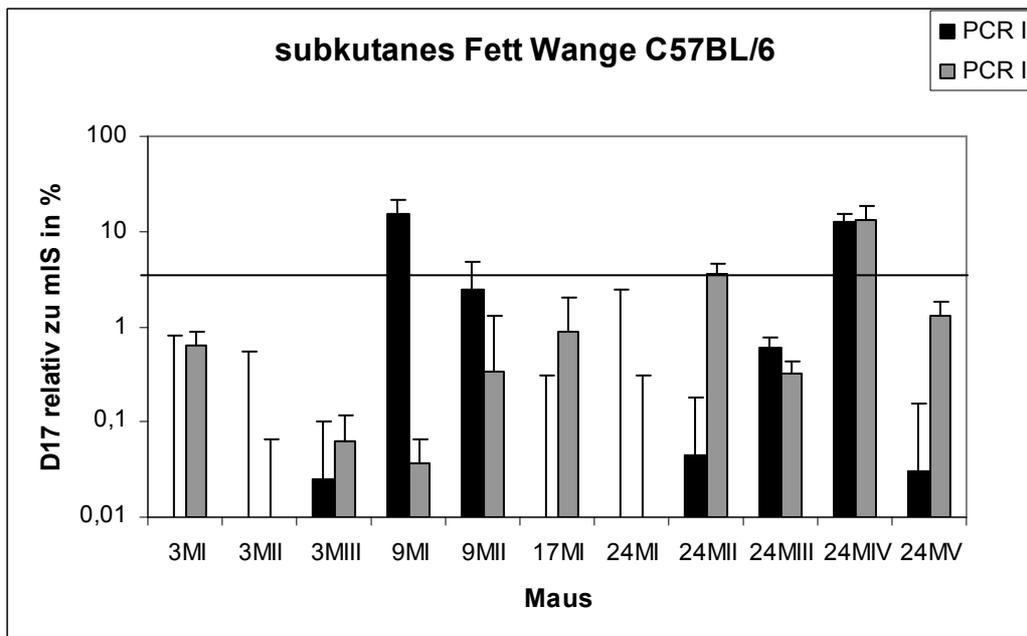


Abb. 9 D17-Deletion im Wangenbereich - subkutanes Fett: Die Mäuse 9MI, 24MII und 24MIV zeigen eine teilweise, geringe Erhöhung der D17-Deletion im Vergleich zu jüngeren WT-Tieren.

1.1.3 Schulter

a) Epidermis

In der Schulter wurde in der Epidermis keine D17-Deletion gemessen.

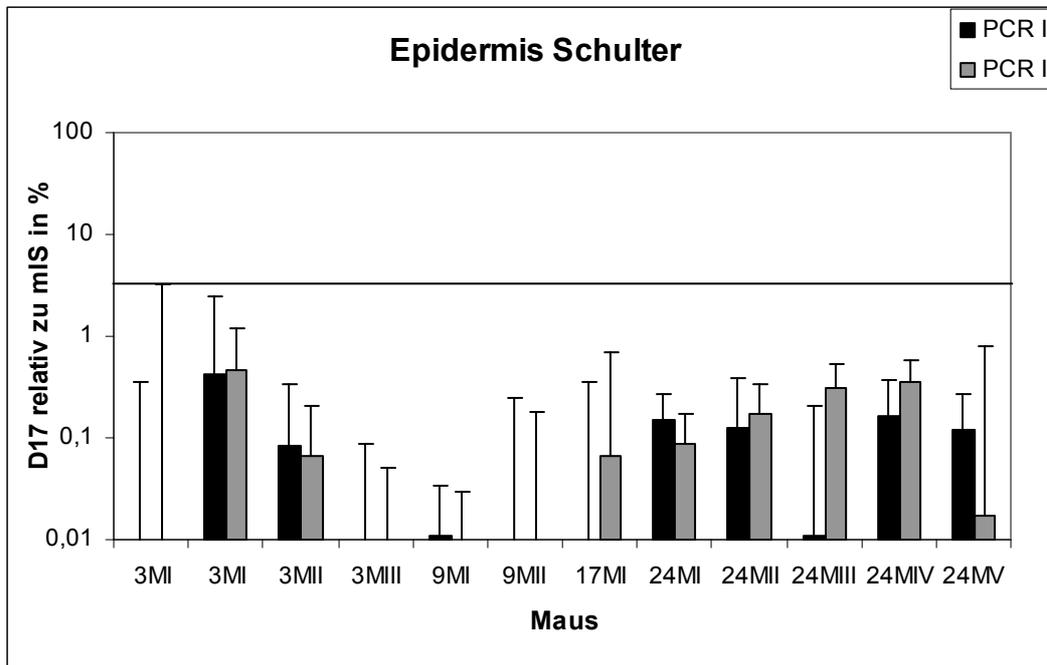


Abb. 10 D17-Deletion der Schulter – Epidermis: In der Epidermis der Schulter wurde keine D17 Deletion gemessen.

b) Dermis

Nur Maus 9MI zeigte ein geringes Level D17-Deletion in der Dermis im Schulterbereich.

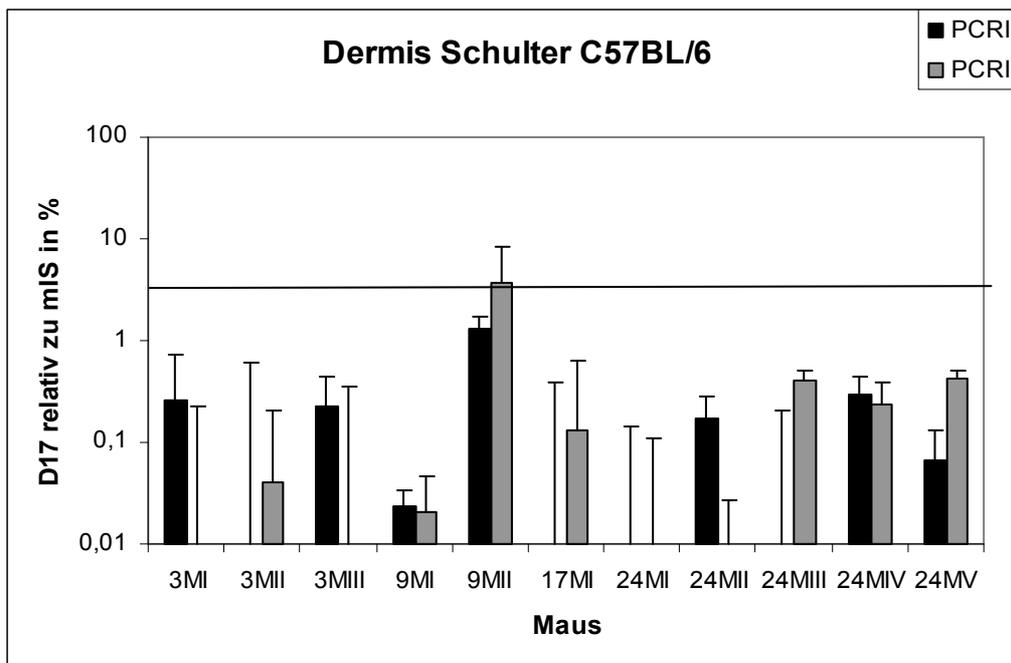


Abb. 11 D17-Deletion der Schulter – Dermis: In der Dermis des Schulterbereichs wurde keine deutliche D17-Deletion gemessen.

c) Subkutanes Fett

Ab einem Alter von 9 Monaten zeigte sich im subkutanen Fett der Schulter eine signifikante Erhöhung des Levels an D17-Deletion im Vergleich zu 3 Monate alten Mäusen.

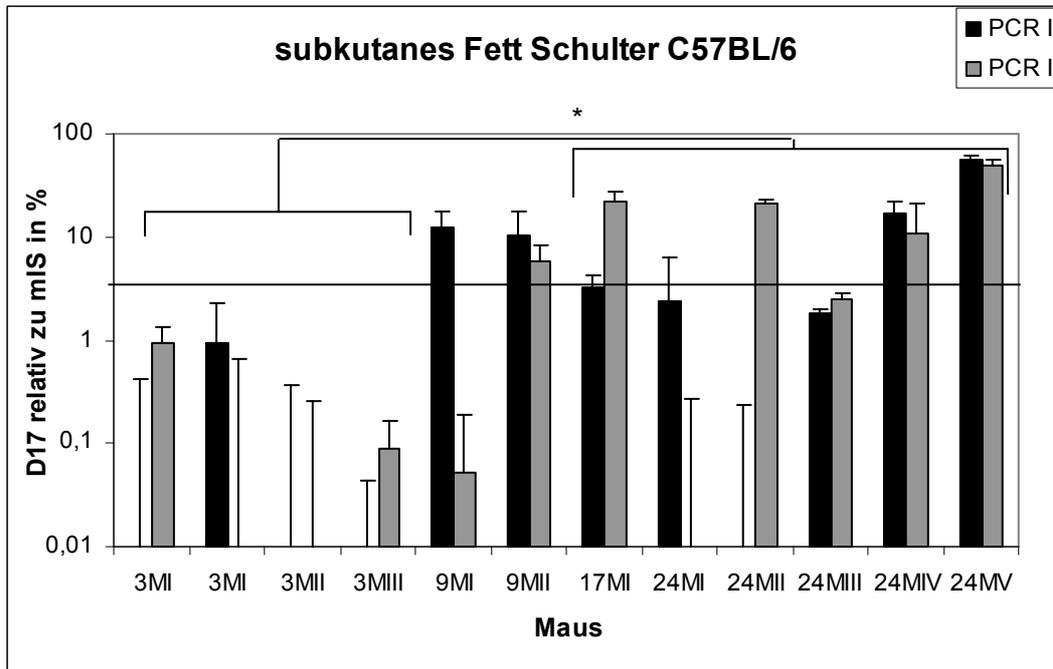


Abb. 12 D17-Deletion der Schulter – subkutanes Fett Im subkutanen Fett der Schulter zeigte sich ab einem Alter von 9 Monaten eine deutliche (außer Maus 24MI) und ab 17 Monaten eine signifikante Erhöhung der D17-Deletion im Vergleich zu 3-monatigen Mäusen.

1.1.4 unterer Rücken

a) Epidermis

In der Epidermis des unteren Rückenbereichs war keine D17-Deletion nachweisbar.

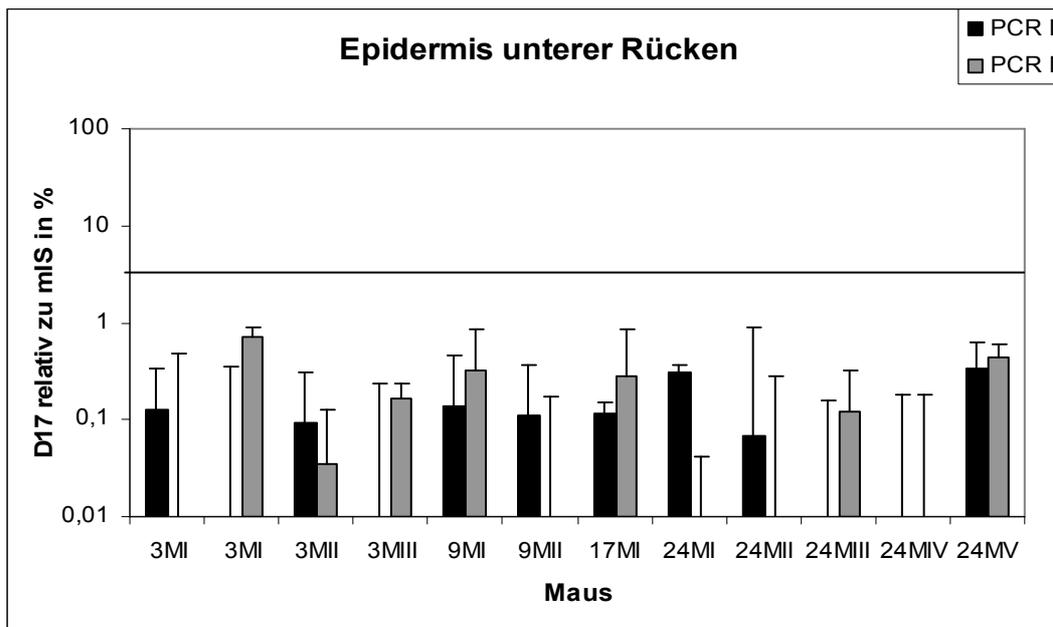


Abb. 13 D17-Deletion im unteren Rücken – Epidermis: In der Epidermis des unteren Rückens wurde keine D17-Deletion gemessen.

b) Dermis

Im Bereich des unteren Rückens war in der Dermis keine D17-Deletion messbar.

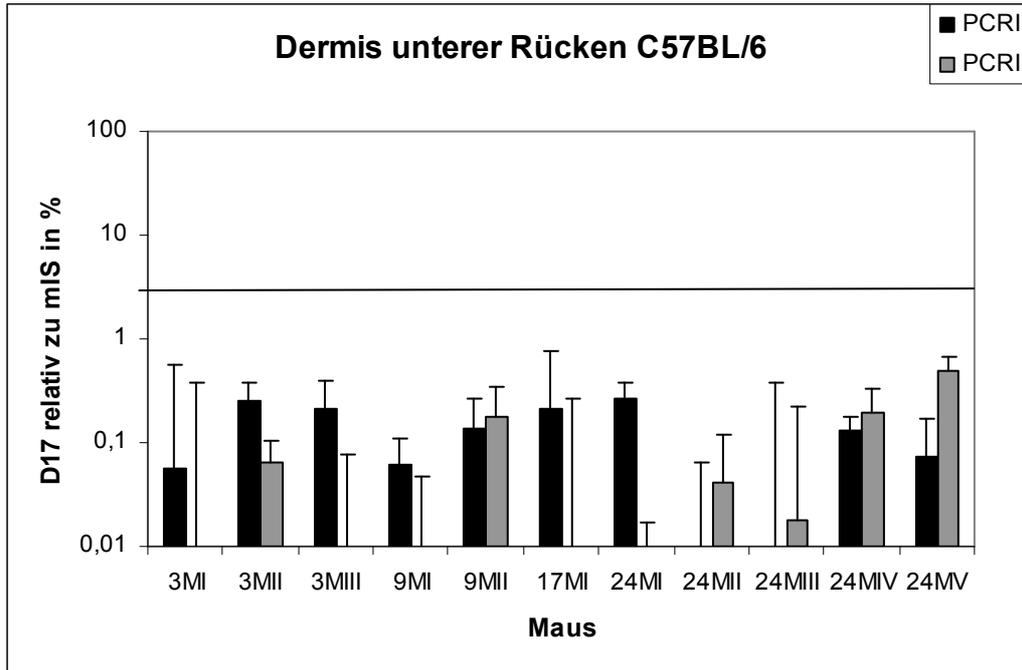


Abb. 14 D17-Deletion im unteren Rücken – Dermis: In der Dermis des unteren Rückens wurde keine D17-Deletion gemessen.

c) Subkutanes Fett

Im subkutanen Fett des unteren Rückens zeigt sich nur bei zwei der 2-jährigen Mäusen eine Erhöhung der D17-Deletion.

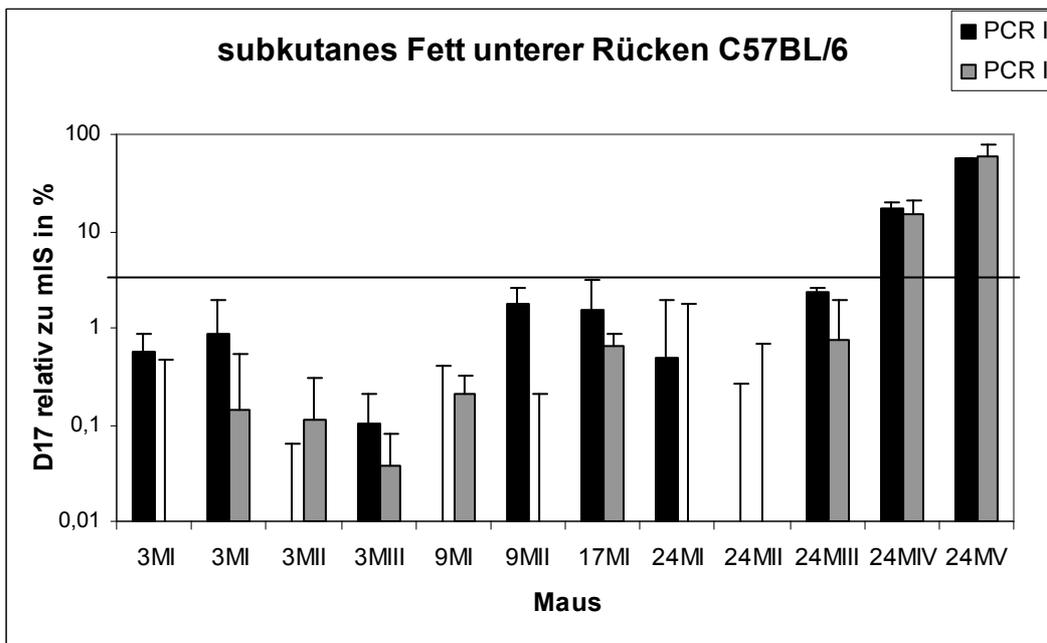


Abb. 15 D17-Deletion im unteren Rücken – subkutanes Fett: Die Mäuse 24MIV und 24MV zeigen deutlich erhöhte Level der D17-Deletion.

1.1.5 Brust

a) Epidermis

In der Epidermis der Brust zeigte sich keine messbare D17-Deletion.

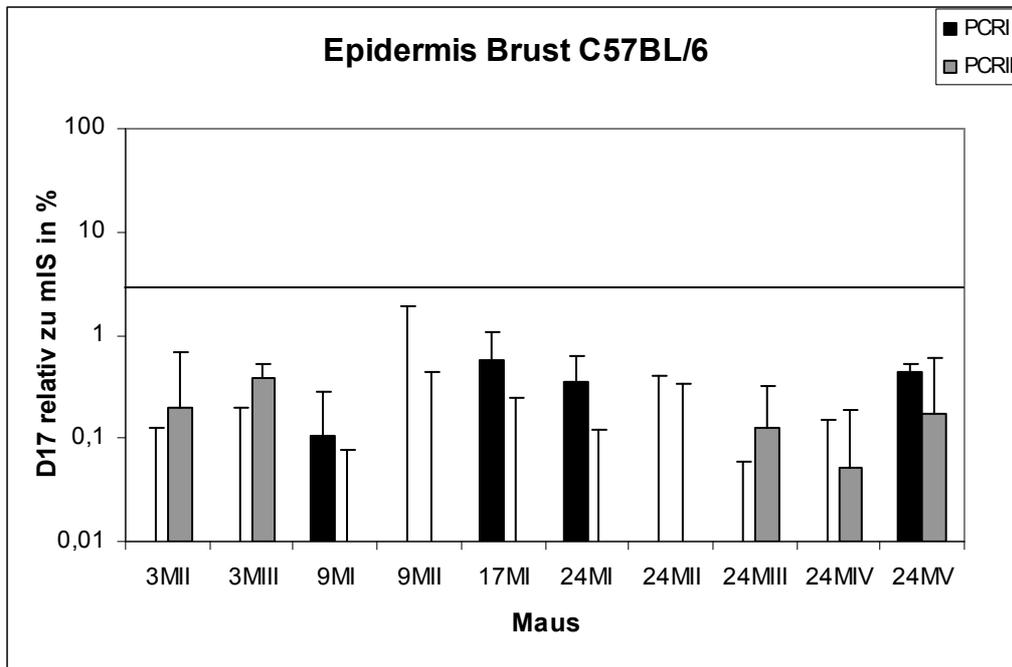


Abb. 16 D17-Deletion im Brustbereich – Epidermis: In der Epidermis der Brust wurde keine D17-Deletion gemessen.

b) Dermis

Es konnte in der Dermis des Brustbereichs aller WT-Mäuse keine D17-Deletion nachgewiesen werden.

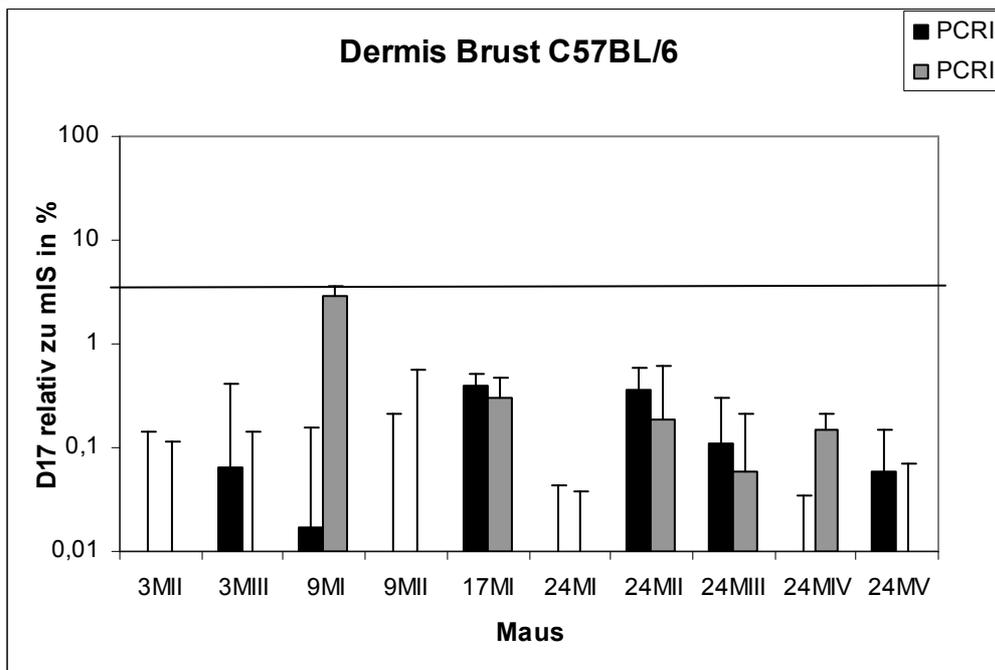


Abb. 17 D17-Deletion im Brustbereich – Dermis: In der Dermis des Brustbereichs wurde keine D17-Deletion gemessen.

c) Subkutanes Fett

Ab einem Alter von 9 Monaten weisen die WT-Mäuse eine Erhöhung der D17-Deletion im Brustbereich auf, ab 17 Monaten eine signifikante Erhöhung.

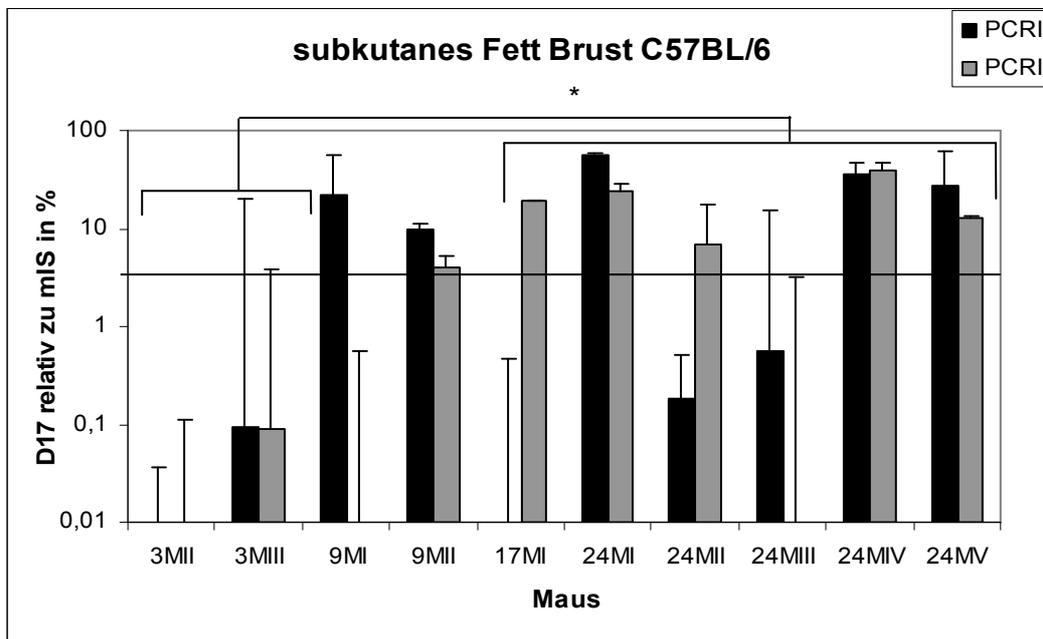


Abb. 18 D17-Deletion im Brustbereich – subkutanes Fett: In allen Mäusen ab einem Alter von 9 Monaten, mit Ausnahme von Maus 24MIII, zeigt sich eine deutliche Erhöhung der D17-Deletion im Vergleich zu 3 Monate alten WT-Mäusen, die ab einem Alter von 17 Monaten signifikant ist.

1.1.6 Bauch

a) Epidermis

Im Bauchbereich konnte in der Epidermis keine D17-Deletion nachgewiesen werden.

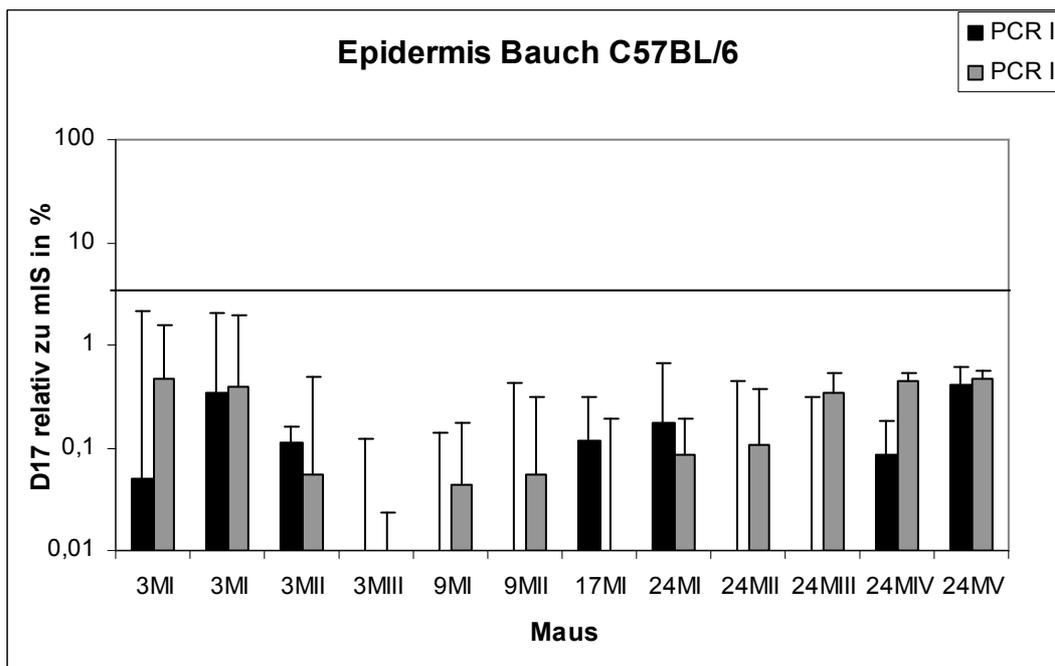


Abb. 19 D17-Deletion im Bauchbereich – Epidermis: In der Epidermis des Bauchbereiches wurde keine D17-Deletion gemessen.

b) Dermis

Im Bauchbereich der Dermis wurde keine D17-Deletion gemessen.

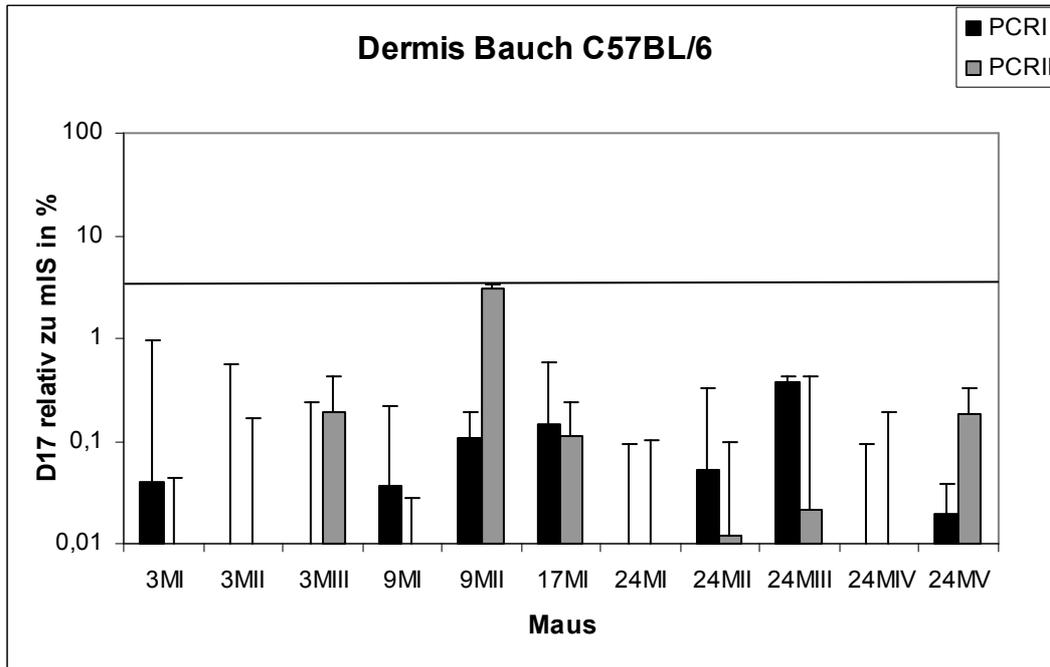


Abb. 20 D17-Deletion im Bauchbereich – Dermis: In der Dermis des Bauchbereiches wurde keine D17-Deletion nachgewiesen.

c) Subkutanes Fett

Im Bauchbereich zeigen bereits die 9 Monate alten und mehr als die Hälfte der 2-jährigen Mäuse eine Erhöhung der D17-Deletion. Ab einem Alter von 17 Monaten ist diese signifikant.

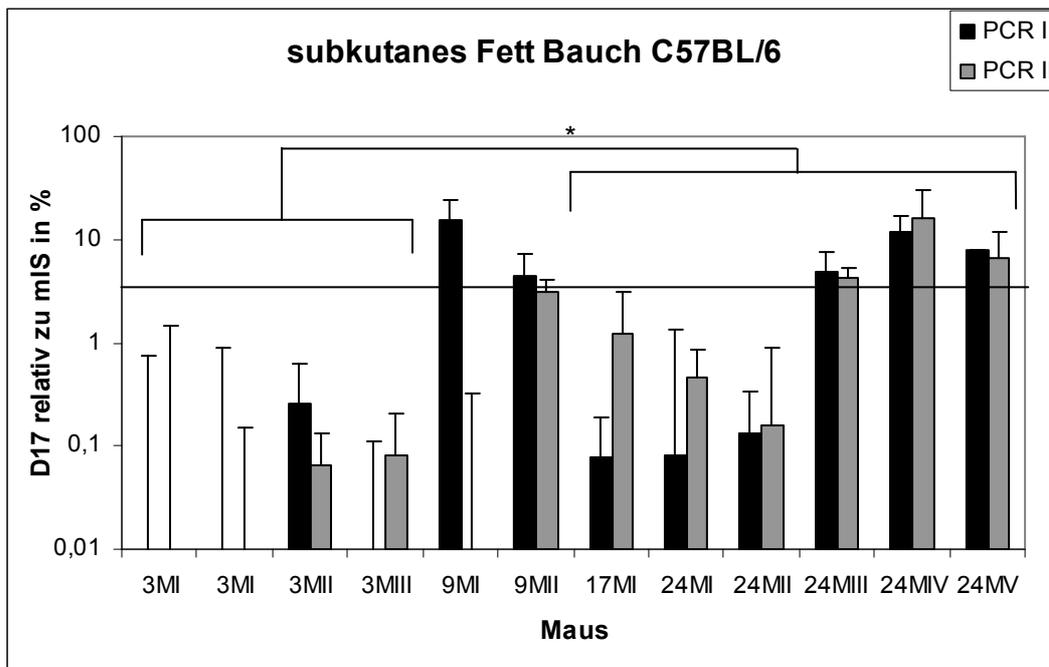


Abb. 21 D17-Deletion im Bauchbereich – subkutanes Fett: Die Mäuse 9MI, 9MII, 24MIII, 24MIV und 24MV zeigen eine erhöhte Menge D17-Deletion im Vergleich zu jungen Mäusen.

1.1.7 Vorderpfoten

a) Epidermis

In der Epidermis der Vorderpfoten wurde keine D17-Deletion gemessen.

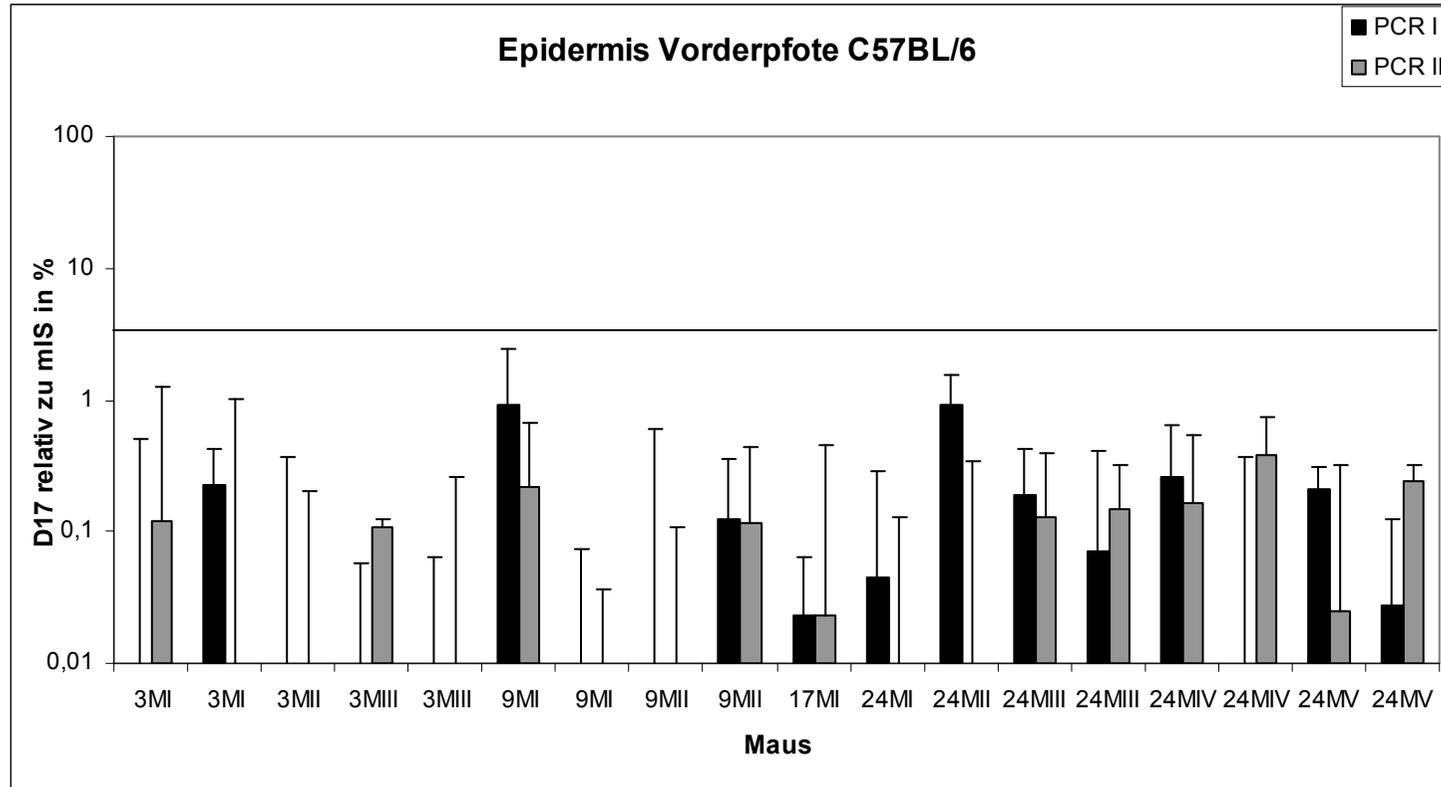


Abb. 22 D17-Deletion in den Vorderpfoten – Epidermis: In der Epidermis der Vorderpfoten war keine D17-Deletion messbar.

b) Dermis

In der Dermis der Vorderpfoten zeigt sich bei einer der 9 Monate alten Mäusen (Maus 9MI) eine geringfügige Erhöhung der D17-Deletion.

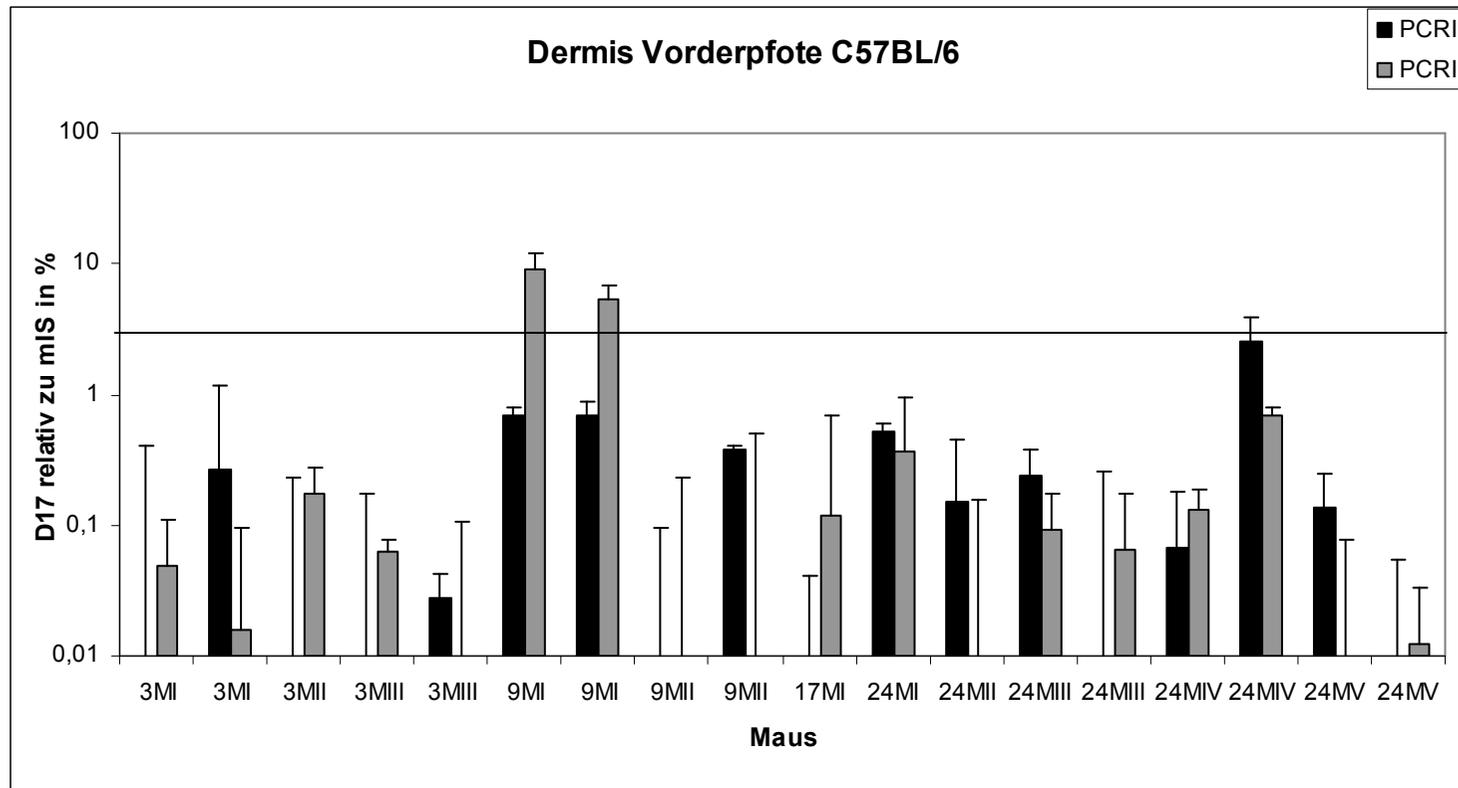


Abb. 23. D17-Deletion in den Vorderpfoten – Dermis: Nur in Maus 9MI zeigt sich eine geringe Erhöhung der D17-Deletion

Ergebnisse

c) Subkutanes Fett

In den Vorderpfoten ist bereits in den drei Monate alten Mäusen D17-Deletion messbar. Diese erhöht sich mit dem Alter der Mäuse noch weiter. In den alten Mäusen ab 17 Monaten ist diese Erhöhung signifikant.

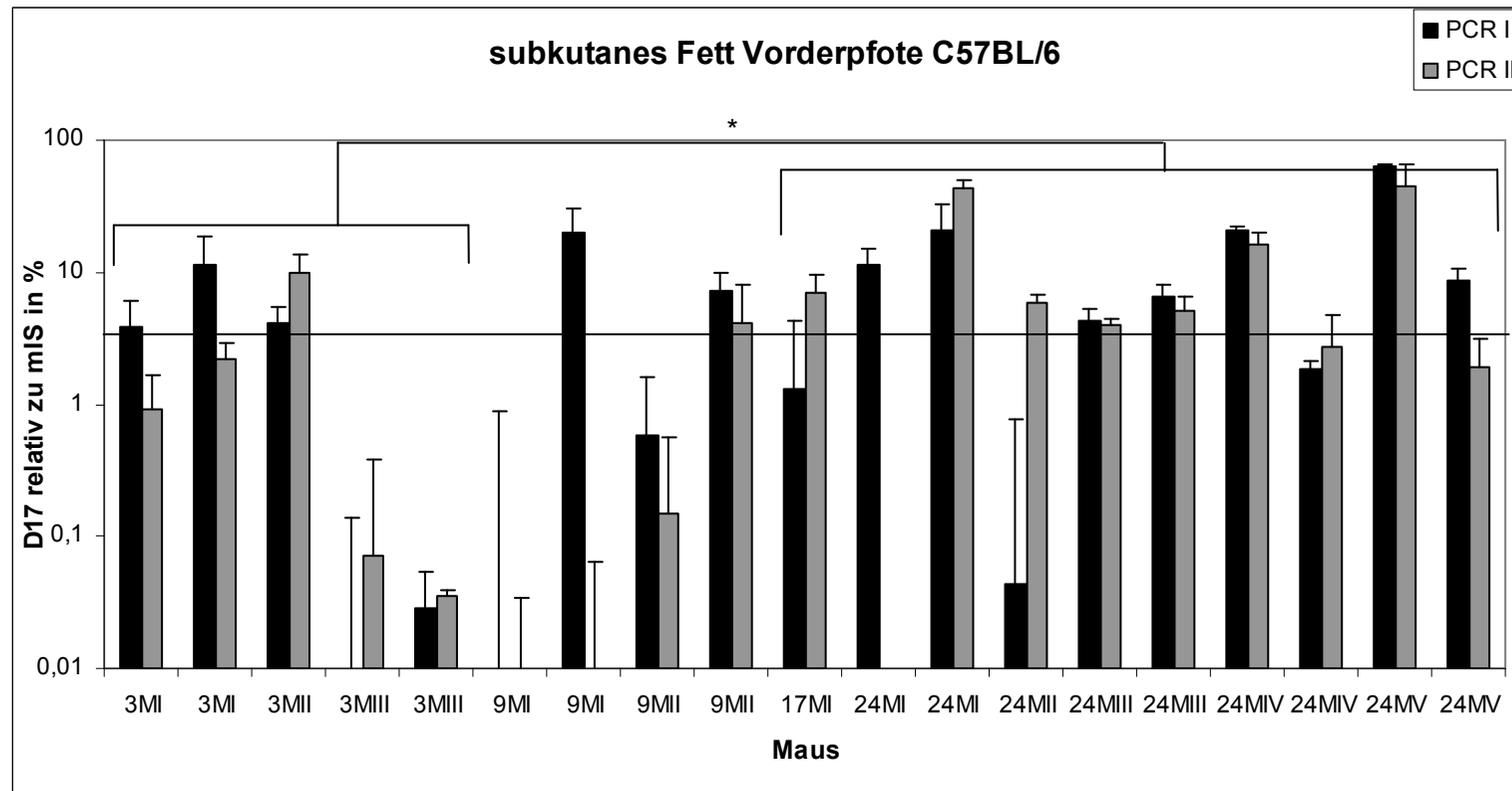


Abb. 24 D17-Deletion in den Vorderpfoten – subkutanes Fett: Im subkutanen Fett der Vorderpfoten ist in fast allen Mäusen D17-Deletion nachweisbar. Mit dem Alter steigt auch die Deletion signifikant an.

1.1.8 Hinterpfoten

a) Epidermis

In der Epidermis der Hinterpfoten konnte keine D17-Deletion gemessen werden.

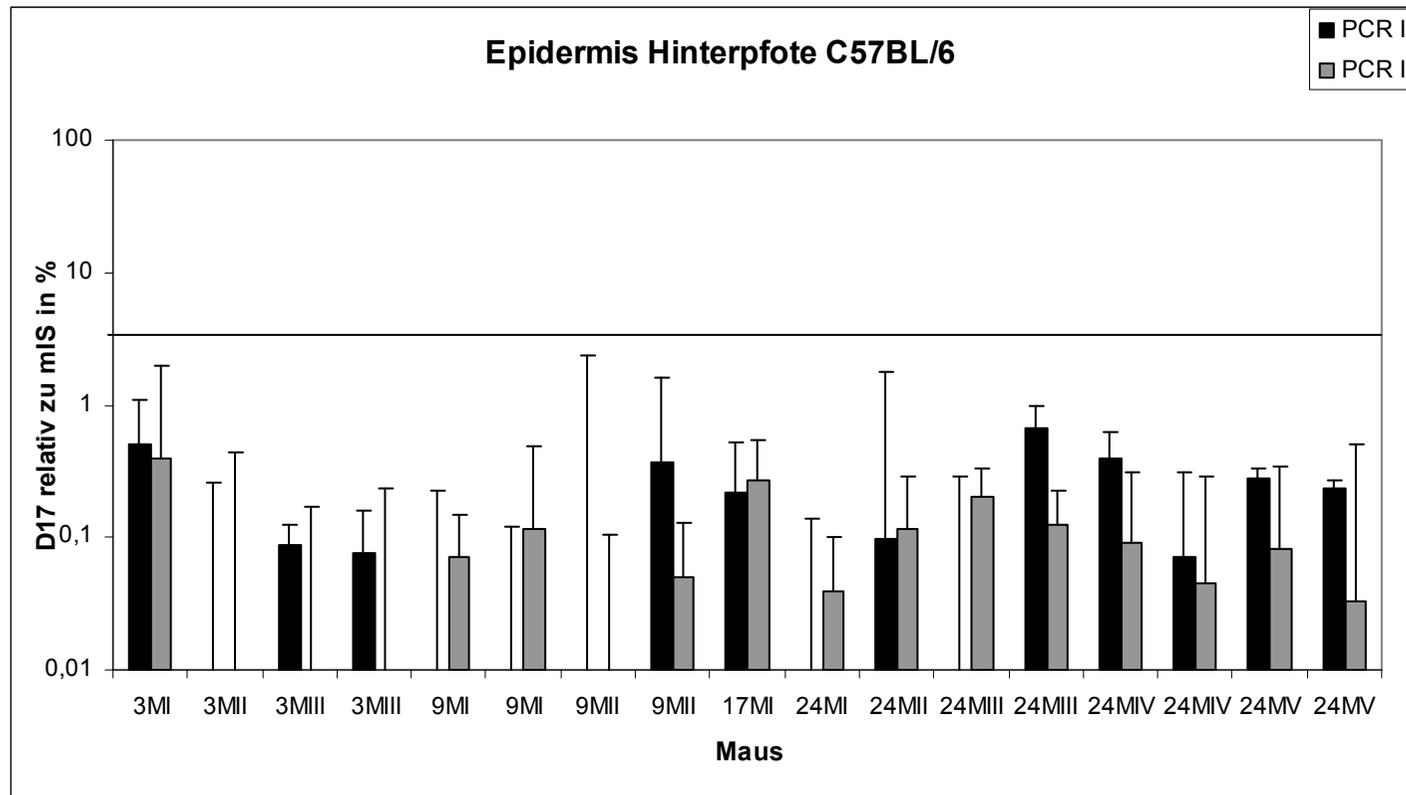


Abb. 25 D17-Deletion in den Hinterpfoten - Epidermis In der Epidermis der Hinterpfoten wurde keine D17-Deletion gemessen.

Ergebnisse

b) Dermis

In der Dermis der Hinterpfoten war ebenfalls keine Deletion messbar.

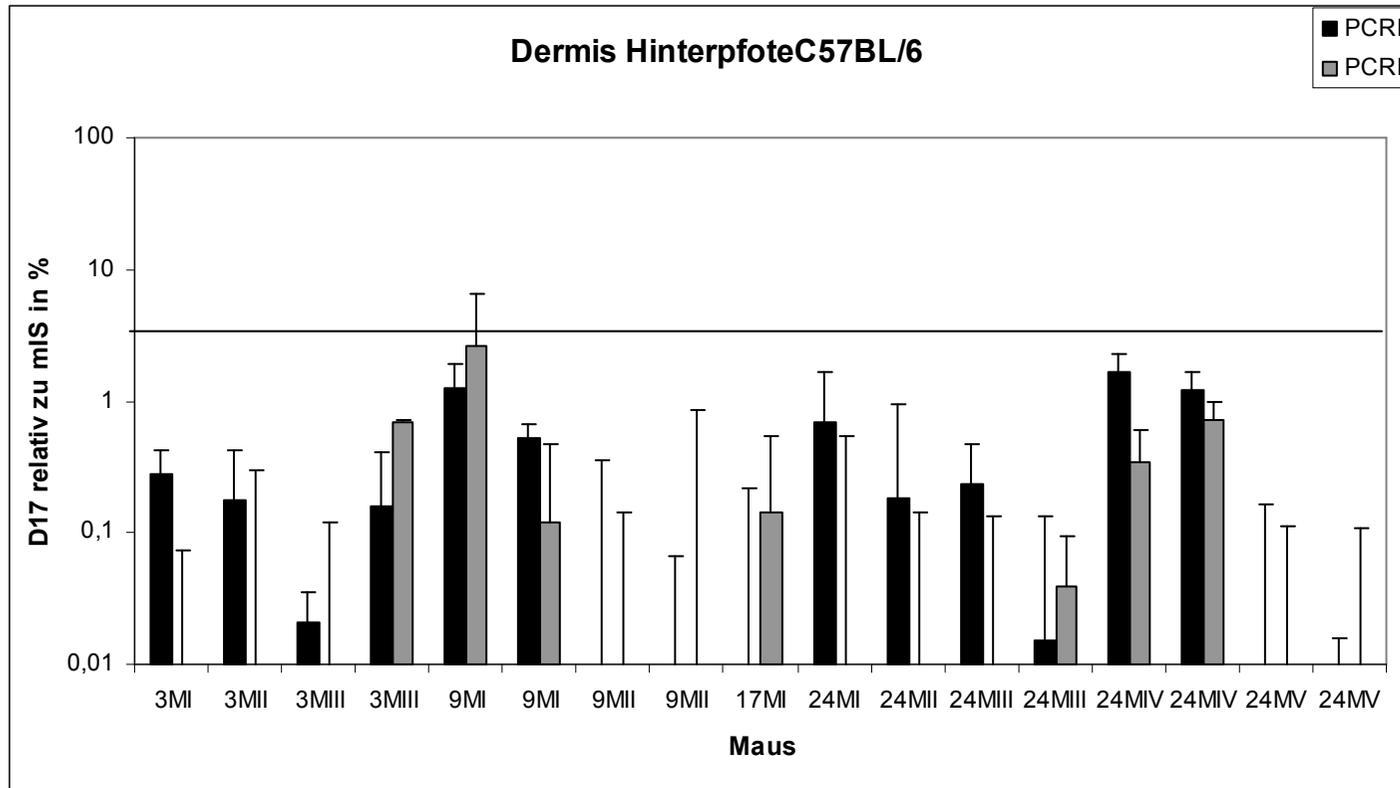


Abb. 26 D17-Deletion in den Hinterpfoten – Dermis: In der Dermis der Hinterpfoten war keine D17-Deletion messbar.

c) subkutanes Fett

Im subkutanen Fett der Hinterpfoten ist in einem Fall bereits in einer 3 Monate alten Maus D17-Deletion messbar. Bei älteren Mäusen ist sie ebenfalls regelmäßig, teilweise sehr stark vorhanden. Ab einem Alter von 17 Monaten ist die D17-Deletion im Vergleich zu den 3 Monate alten Mäusen signifikant erhöht.

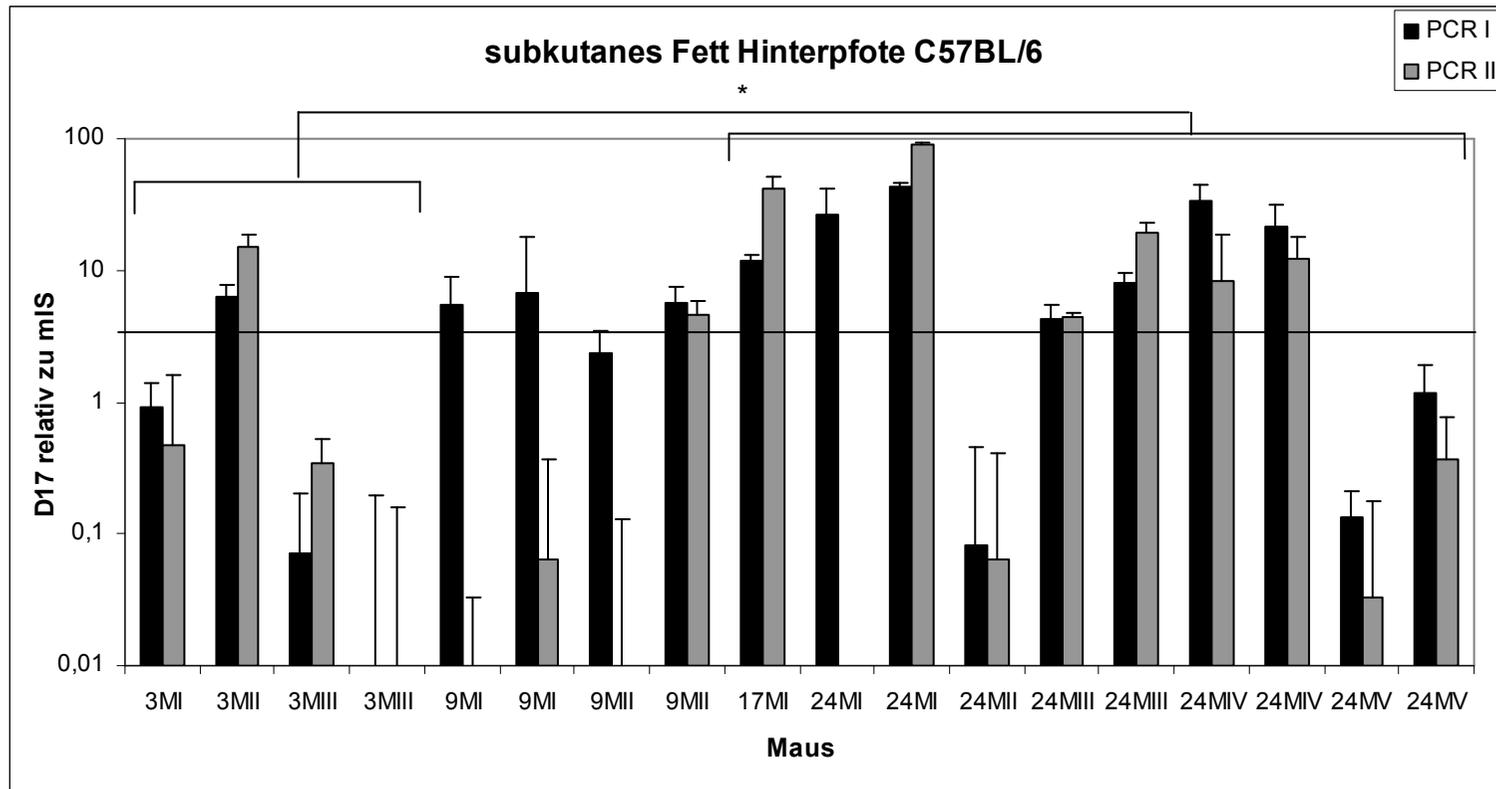


Abb. 27 D17-Deletion in den Hinterpfoten – subkutanes Fett: Im subkutanen Fett der Hinterpfoten ist eine deutliche Menge D17-Deletion teilweise bereits bei jungen Mäusen messbar. Ab 17 Monaten ist die D17-Deletion im Vergleich zu jungen Mäusen signifikant erhöht.

1.1.9 mittlerer Rücken

a) Epidermis

In der Epidermis des mittleren Rückens konnte keine D17-Deletion detektiert werden.

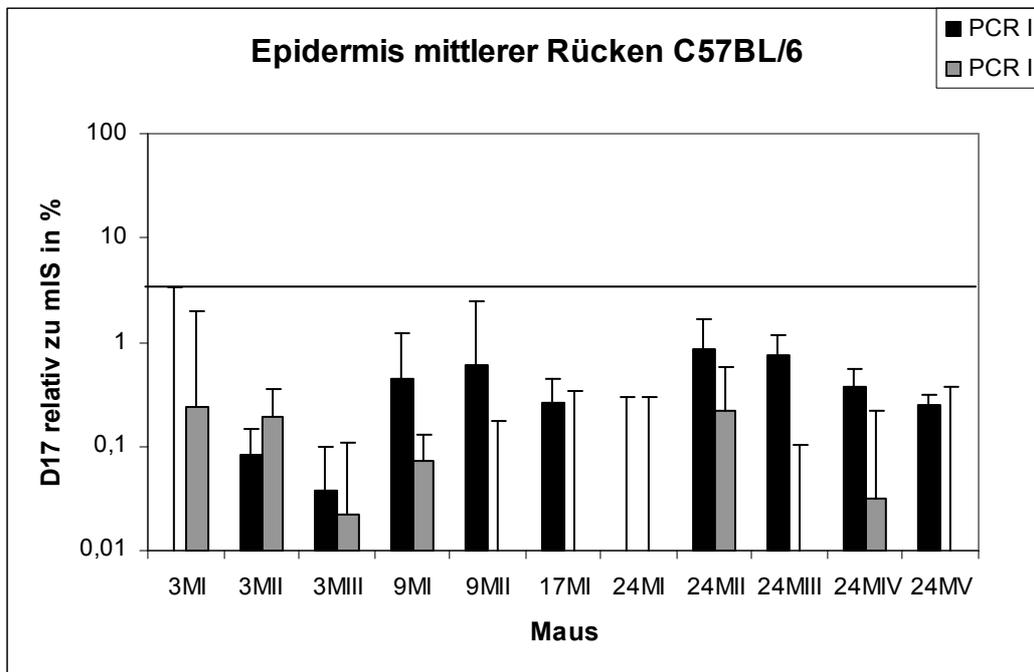


Abb. 28 D17-Deletion des mittleren Rückens – Epidermis: Die Epidermis des mittleren Rückens wies keine messbare D17-Deletion auf.

b) Dermis

Die Dermis des mittleren Rückens enthielt ebenfalls keine D17-Deletion.

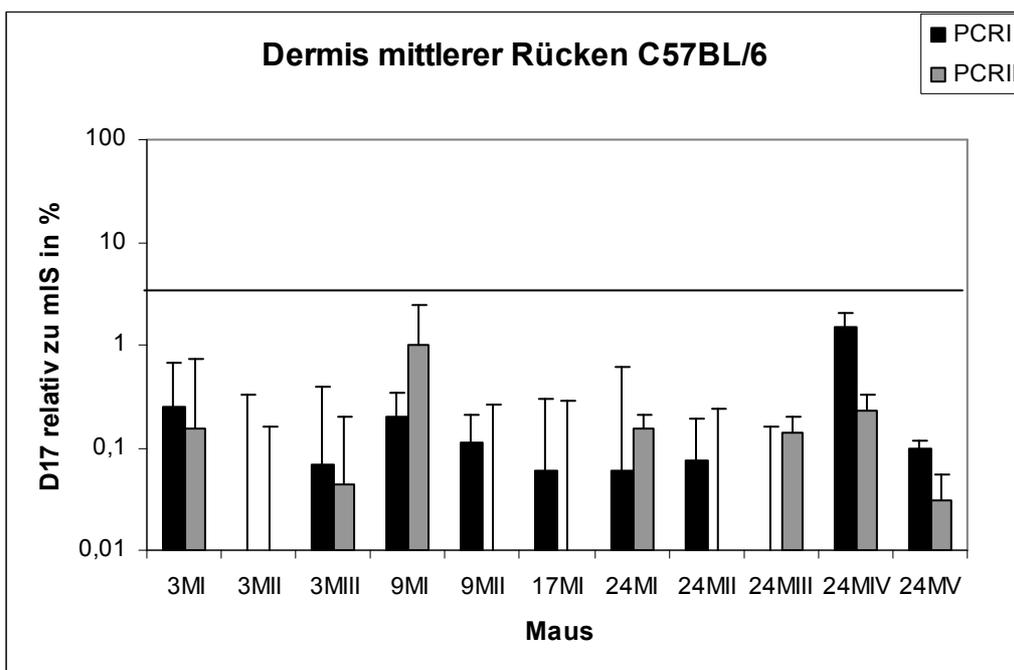


Abb. 29 D17-Deletion des mittleren Rückens - Dermis: In der Dermis des mittleren Rückens wurde keine D17-Deletion gemessen.

c) Subkutanen Fett

Im subkutanen Fett des mittleren Rückens weisen Mäuse die älter als 17 Monate alt sind eine signifikante Erhöhung der D17-Deletion auf.

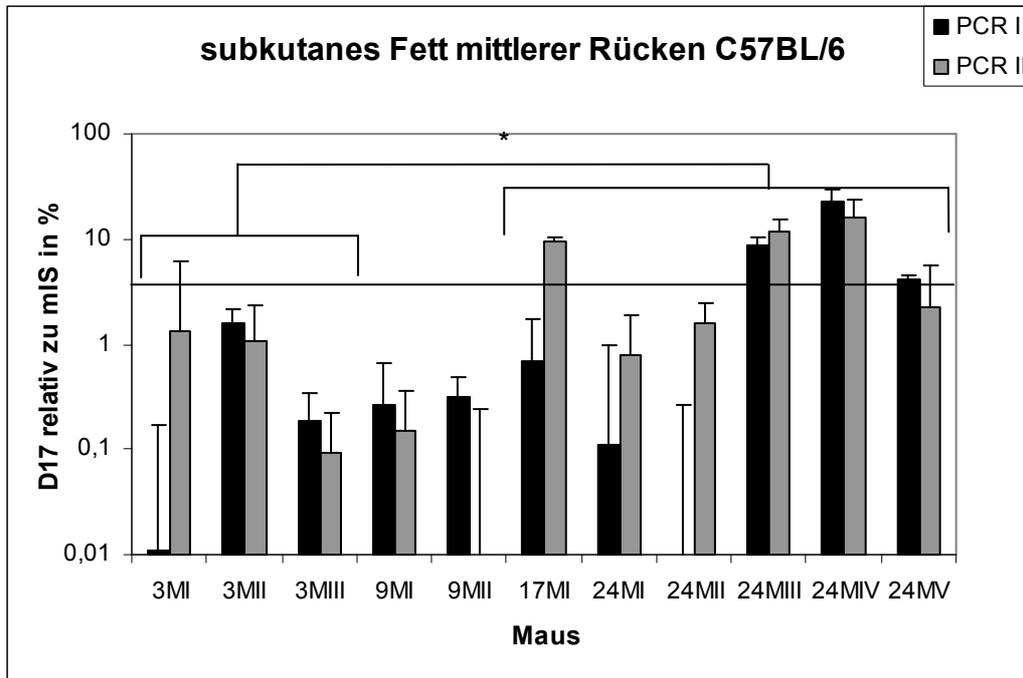


Abb. 30 D17-Deletion des mittleren Rückens-subkutanen Fett: Ab einem Alter von 17 Monaten finden sich signifikant erhöhte Mengen D17-Deletion im subkutanen Fett des mittleren Rückens. Allerdings nicht bei allen gemessenen Mäusen.

1.1.10 Nacken

a) Epidermis

In der Epidermis des Nackens wurde keine D17-Deletion gemessen.

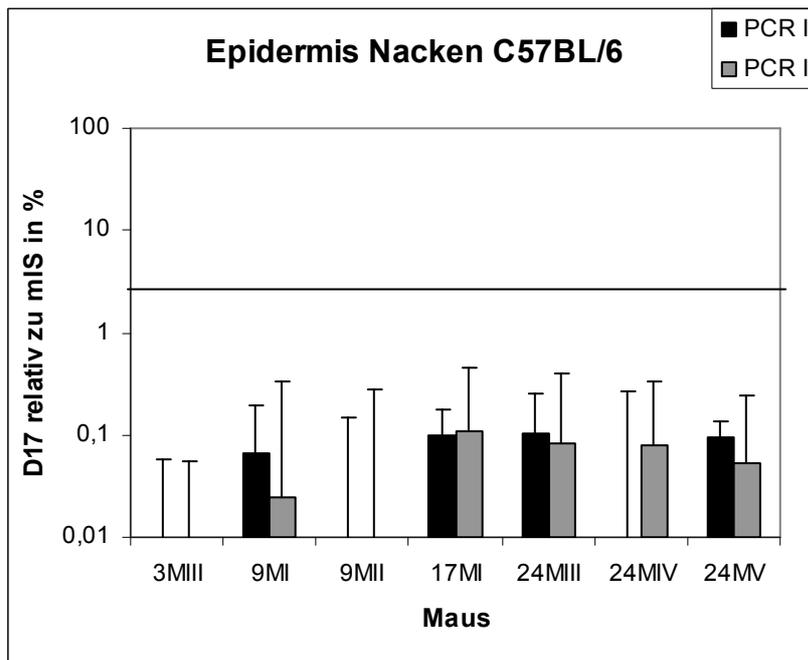


Abb. 31 D17-Deletion des Nackens -Epidermis: In der Epidermis des Nackens wurde keine D17-Deletion gemessen

b) Dermis

In der Dermis war im Nackenbereich in einer der 24 Monate alten Mäuse eine geringe Menge D17-Deletion messbar.

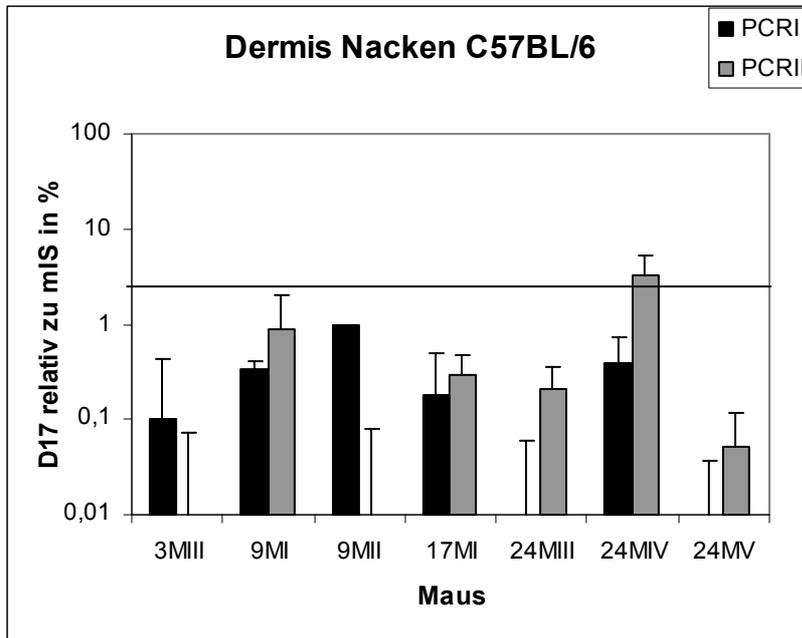


Abb. 32 D17-Deletion des Nackens - Dermis: In der Dermis des Nackens war in einem Fall eine geringe Menge D17-Deletion in einer 24 Monate alten Maus messbar.

c) Subkutanen Fett

Im Nacken war im subkutanen Fett ab einem Alter von 9 Monaten D17-Deletion vorhanden. Mit zunehmendem Alter steigerte sich auch die Menge an Deletion signifikant.

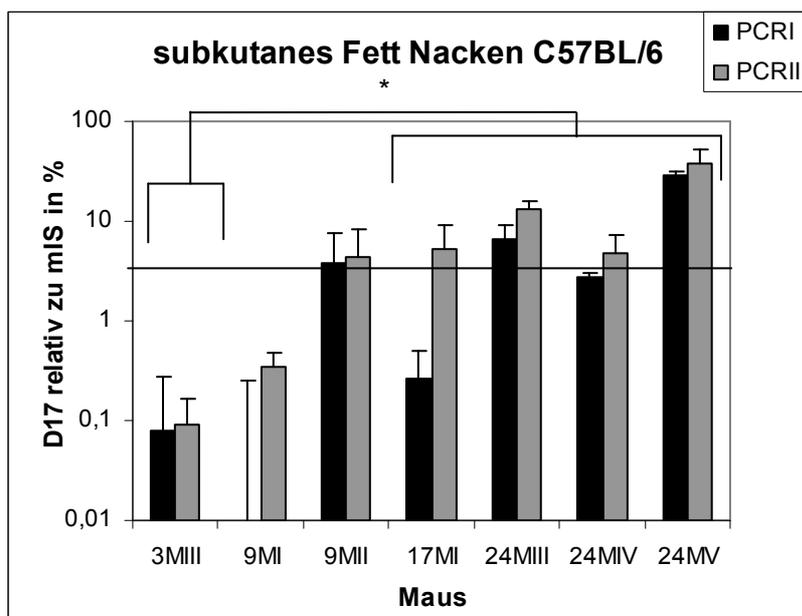


Abb. 33 D17-Deletion des Nackens - subkutanen Fett: Im subkutanen Fett des Nackens war ab 9 Monaten D17-Deletion messbar, die Menge steigerte sich mit zunehmendem Alter der Mäuse.

1.1.11 Ohren

Die Ohren wurden immer komplett ohne Unterteilung in Hautkompartimente gemessen. In den Ohren zeigte sich in keiner einzigen Maus D17-Deletion.

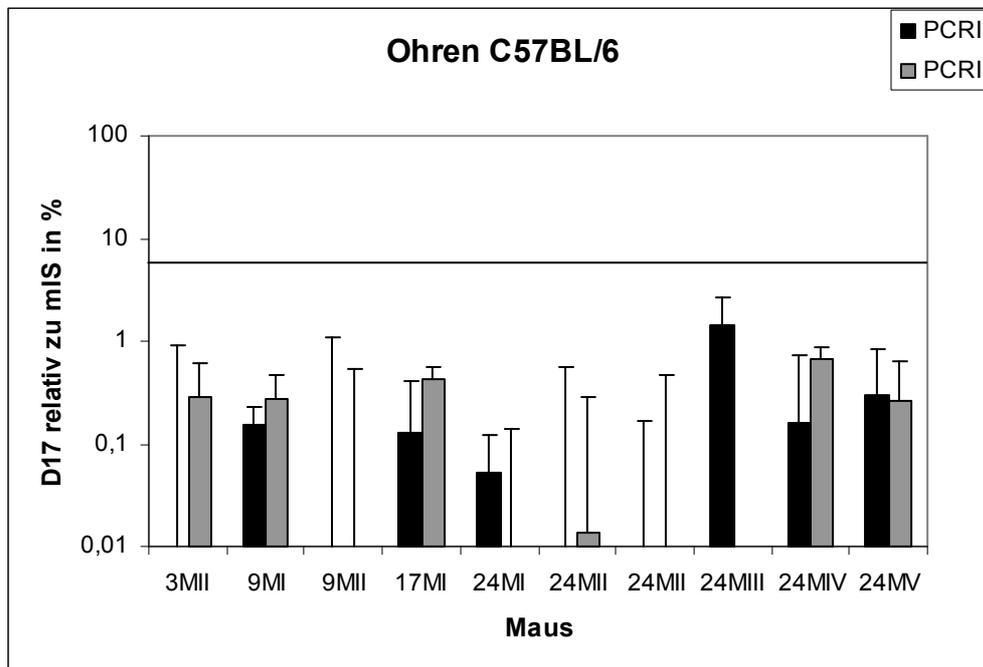


Abb. 34 D17-Deletion in den Ohren von WT-Mäusen: In den Ohren zeigte sich bei Wildtyp-Mäusen in keinem Alter D17-Deletion.

Die Untersuchung der verschiedenen Hautareale von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen unterschiedlichen Alters zeigte, dass im Bereich der Epidermis keine Erhöhung der D17-Deletion mit steigendem Alter stattfindet. Im Bereich der Dermis ließen sich vereinzelt relativ geringe Erhöhungen der D17-Deletion ab einem Alter von 9 Monaten messen, das Maximum lag hierbei jedoch nur bei annähernd 9% im Bereich der Vorderpfoten, ein Wert der in den Messungen des subkutanen Fettes desselben Bereiches um ein Vielfaches überschritten wird.

1.1.12 Zusammenfassung Haut WT

Es zeigt sich, dass insbesondere im subkutanen Fett die Menge an D17-Deletion sich mit steigendem Alter der Mäuse drastisch erhöht. Allerdings findet diese Erhöhung nicht in allen Arealen statt. Beispielsweise zeigt sich in den beiden Arealen im Gesicht der Maus, Stirn und Wange, kaum Erhöhung der Deletion mit dem Alter. Im subkutanen Fett der Stirn ist sogar nur bei einer der 24 Monate alten Mäuse (24MV) eine Erhöhung zu messen. Im Wangenbereich besteht bei einer der 9 Monate alten Mäuse und bei zwei der 24 Monate alten Mäuse eine Erhöhung der D17-Deletion auf bis zu 15%.

Im Vergleich dazu, erhöht sich in den Arealen mit starker Deletion die Rate auf bis zu 89% als Maximalwert der in den Pfoten von Maus 24MI auftritt.

Insgesamt gesehen (siehe Abb. 35) tritt die D17-Deletion im subkutanen Fett des Gesichtsbereichs nur geringfügig auf (1,56% bzw. 2,69 % in Stirn und Wange). Im subkutanen Fett von Bauch und mittlerem Rücken ist sie schon deutlich messbar und erreicht Werte von durchschnittlich 8,38% im Bauchbereich bzw. 6,49% im Bereich des mittleren Rückens. Eine weitere Steigerung zeigt das subkutane Fett im Nacken und im unteren Rückenbereich, wo sich die Deletion auf 12,52% (Nacken) und 12,74% (unterer Rücken) erhöht. Die Spitzenwerte an D17 Deletion erreichen im Durchschnitt des subkutanen Fettes die Brust (14,59%), die Schulter (15,41%), die Vorderpfoten (13,76%) und die Hinterpfoten (17,17%)

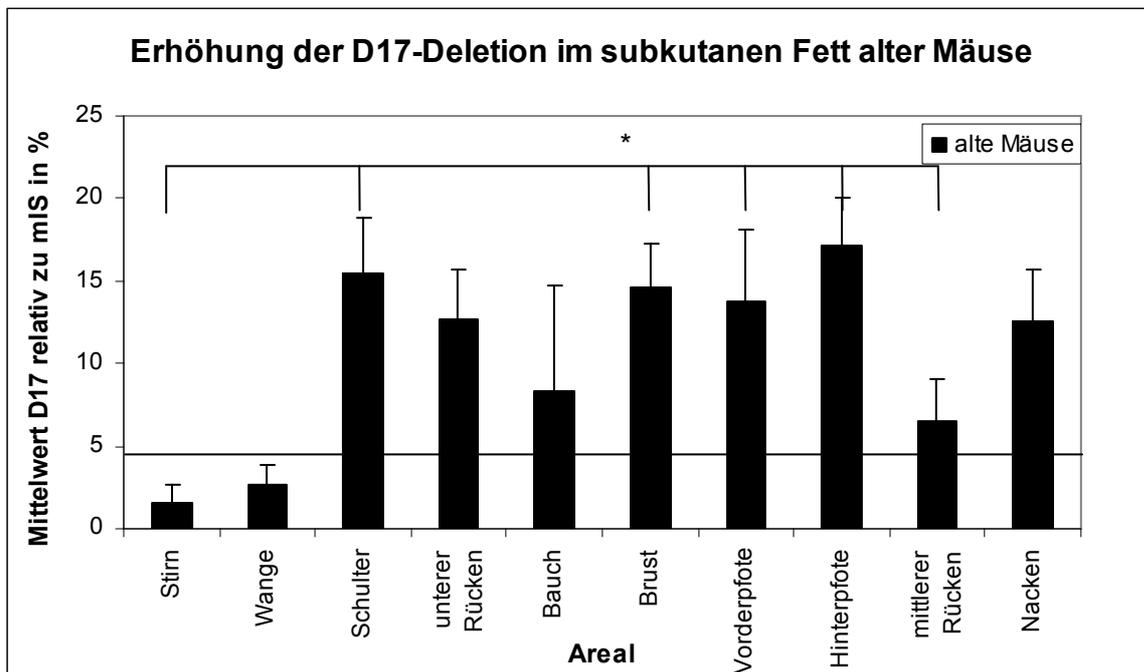


Abb. 35 Im subkutanen Fett alter Mäuse ist die Erhöhung der D17-Deletion in den verschiedenen Hautarealen unterschiedlich verteilt. Im Kopfbereich ist die Deletion kaum vorhanden, im Bauch und mittleren Rückenbereich ist sie schon deutlich erhöht, weiter steigert sie sich im Bereich des Nackens und des unteren Rückens, ihre Spitzenwerte finden sich im Bereich der Schulter, der Brust und der Pfoten. Die Steigerung von Stirn gegenüber Schulter, Brust, Vorder- und Hinterpfoten sowie mittlerem Rücken ist signifikant ($p < 0,05$).

1.1.13 Körperfett

Da sich die meiste D17-Deletion der WT-Mäuse im subkutanen Fett zeigte, wurde zum Vergleich auch das Körperfett der Mäuse mit untersucht. Die dabei gewählten Areale von denen das Körperfett entnommen wurde sind:

A) unterer Bauch, B) Nacken, C) Flanken, D) unter den Vorderpfoten, E) seitlich am Hals.

Es wurde immer das gesamte an diesen Stellen vorhandene Fett entnommen.

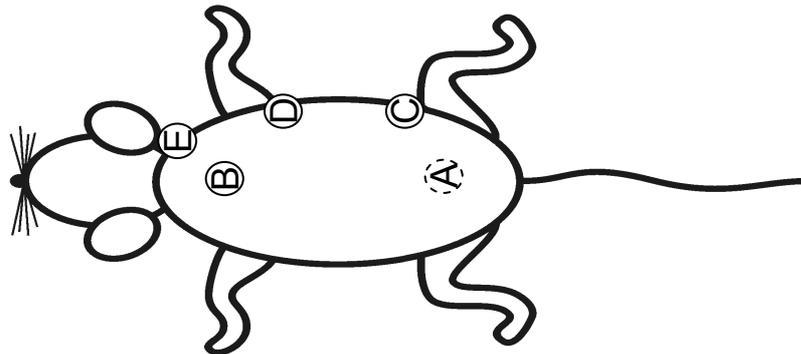


Abb. 36 Verteilung des entnommenen Körperfettes in der Maus: A) unterer Bauch, B) Flanken, C) Nacken, D) unter den Vorderpfoten, E) seitlich am Hals

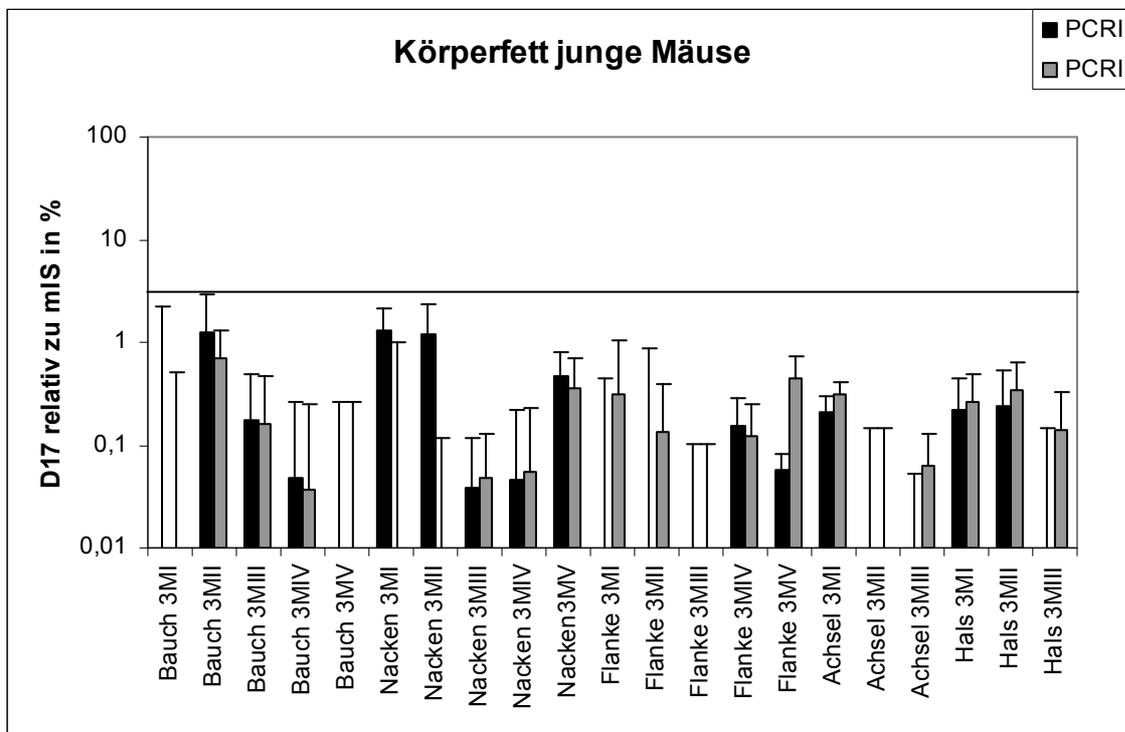


Abb. 37 D17-Deletion im Körperfett von jungen WT-Mäusen: Im Körperfett junger Mäuse war keine D17-Deletion messbar.

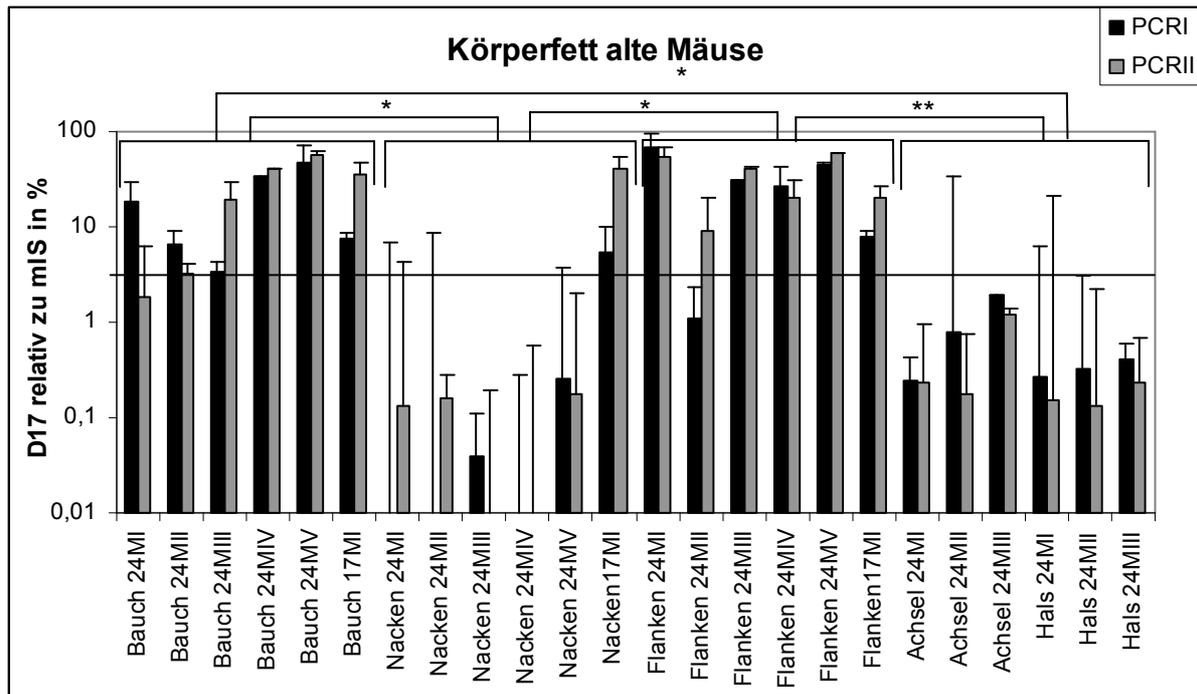


Abb. 38 D17-Deletion im Körperfett von alten WT-Mäusen: Im Bauch- und Flankenareal sind für alle Mäuse (24MI-24MV, 17MI) deutliche Mengen an D17-Deletion messbar, in den übrigen Arealen (Nacken, Achsel und Hals) ist keine Erhöhung im Vergleich zu jungen Mäusen messbar.

Nach der Messung der D17-Deletion zeigte sich, dass in den jungen Mäusen, wie bereits zuvor, auch im Körperfett keine Deletion auftritt (Abb. 37), sie bei den älteren Mäusen jedoch durchaus auftritt, allerdings nicht in allen Arealen gleich (Abb. 38). Bei allen alten Mäusen zeigt sich im Körperfett eine sehr starke Erhöhung der D17-Deletion im Bauchareal und im Fett des Flankenbereichs im Vergleich zu jungen Mäusen. Gleichzeitig kann in den anderen Arealen auch bei den alten Mäusen keine Erhöhung der D17-Deletion gemessen werden.

1.2 XPG-knockout -Mäuse

XPG ist, wie auch die CS-Proteine CSA und CSB in die NER involviert. Allerdings steht dieses Protein in keinem bekannten direkten Zusammenhang mit Mitochondrien. Somit war es interessant zu untersuchen, ob es in diesen Mäusen eine Beeinflussung der Integrität der mt DNA gibt. Dies war bei einer Untersuchung junger Tiere bis zu einem Alter von 13 Wochen nicht der Fall. Ein höheres Alter erreichen diese Tiere meist nicht (72).

In keiner der XPG-knockout Mäuse konnte in irgendeinem Areal oder Gewebe D17-Deletion gemessen werden.

a) Epidermis

In der Epidermis von 4 oder 13 Wochen alten XPG-knockout-Mäusen konnte keine D17-Deletion gemessen werden.

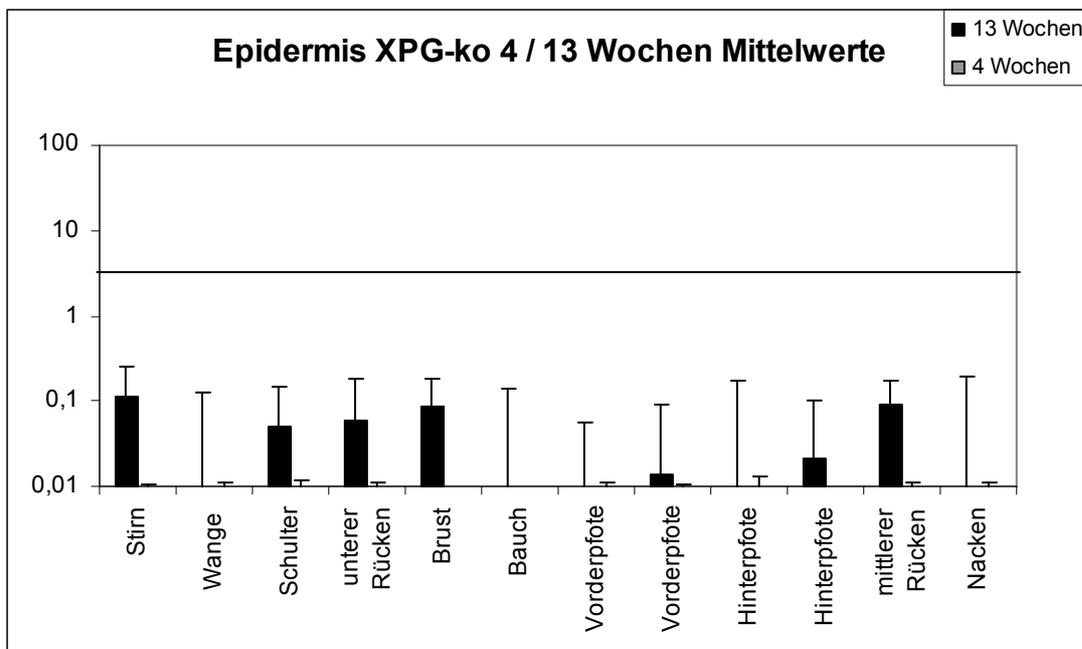


Abb. 39 Epidermis XPG-knockout-Mäuse 4 und 13 Wochen: Es wurde keine D17-Deletion gemessen.

b) Dermis

Die Dermis der 4 oder 13 Wochen alten XPG-knockout-Mäuse enthielt ebenfalls keine D17-Deletion.

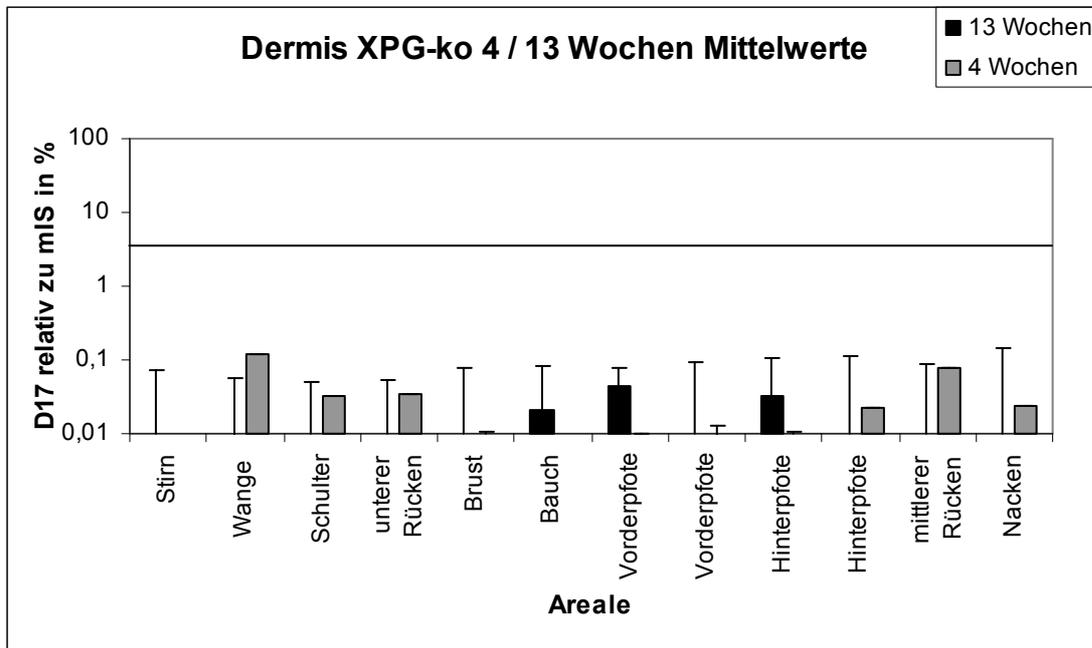


Abb. 40 Dermis XPG-knockout-Mäuse 13 Wochen: Es wurde keine D17-Deletion gemessen.

c) Subkutanen Fett

Auch im subkutanen Fett dieser Mäuse konnte keine D17-Deletion gemessen werden.

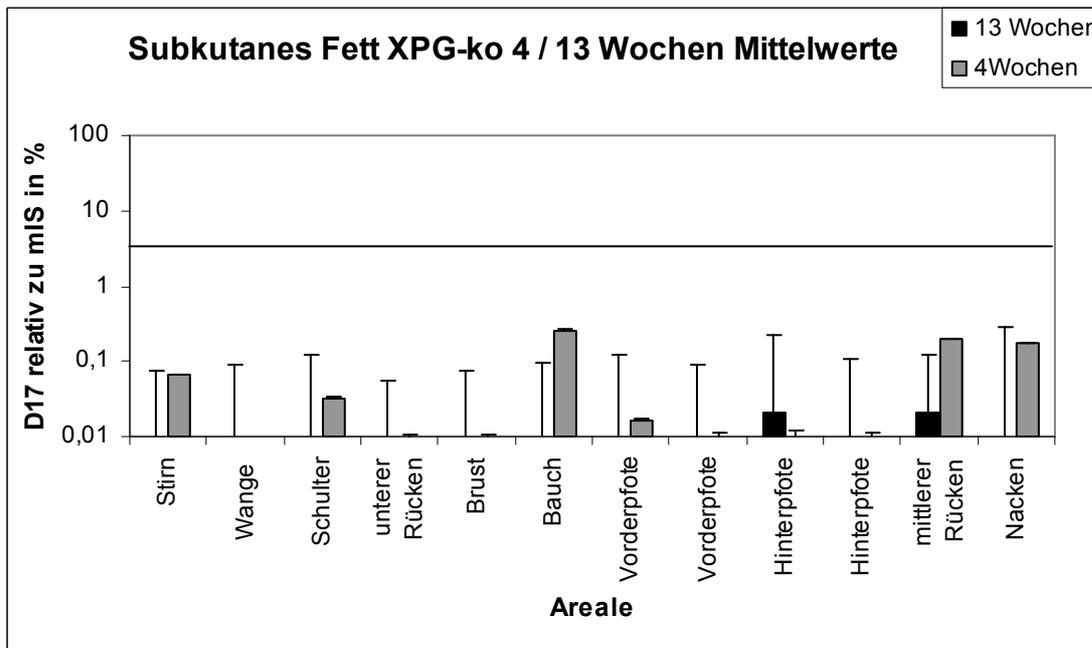


Abb. 41 Subkutanen Fett XPG-knockout-Mäuse 13 Wochen: Es wurde keine D17-Deletion gemessen

1.3 TLR2 knockout-Mäuse

Da es sehr teuer ist, Mäuse über Jahre hinweg zu halten, war die Anzahl der alten Mäuse die für die Untersuchung auf D17-Deletion zu bekommen war begrenzt. Auf der Suche nach weiteren alten Mäusen im Tierstall der Uniklinik Tübingen, die beispielsweise bei der Zucht übersehen worden waren, ergab es sich, dass zwei 16 Monate alte TLR2-knockout-Weibchen mit Balb/c-Hintergrund gefunden wurden.

Da durch die genetische Veränderung keine Veränderung in der DNA-Reparatur zu erwarten war und eine Veränderung des ROS-Haushaltes durch TLR2 nur als Signal im Infektionsfall zu erwarten ist (73), konnte davon ausgegangen werden, dass sich die D17-Deletion bei diesen Mäusen so wie im WT verhalten würde.

Die Untersuchung dieser Mäuse auf D17-Deletion ergab auch das erwartete Ergebnis. Die D17-Deletion erhöht sich vornehmlich im subkutanen Fett der älteren Mäuse, wobei hier ungewöhnlicherweise auch eine geringe Erhöhung im Bereich des Gesichts vorliegt. Epidermis und Dermis der 16 Monate alten Mäuse zeigen nur sehr wenig D17-Deletion.

a) Epidermis

In der Epidermis zeigt sich bei einer der 16 Monate alten TLR2-ko-Mäuse eine geringe Menge an D17-Deletion im Bereich der Wange.

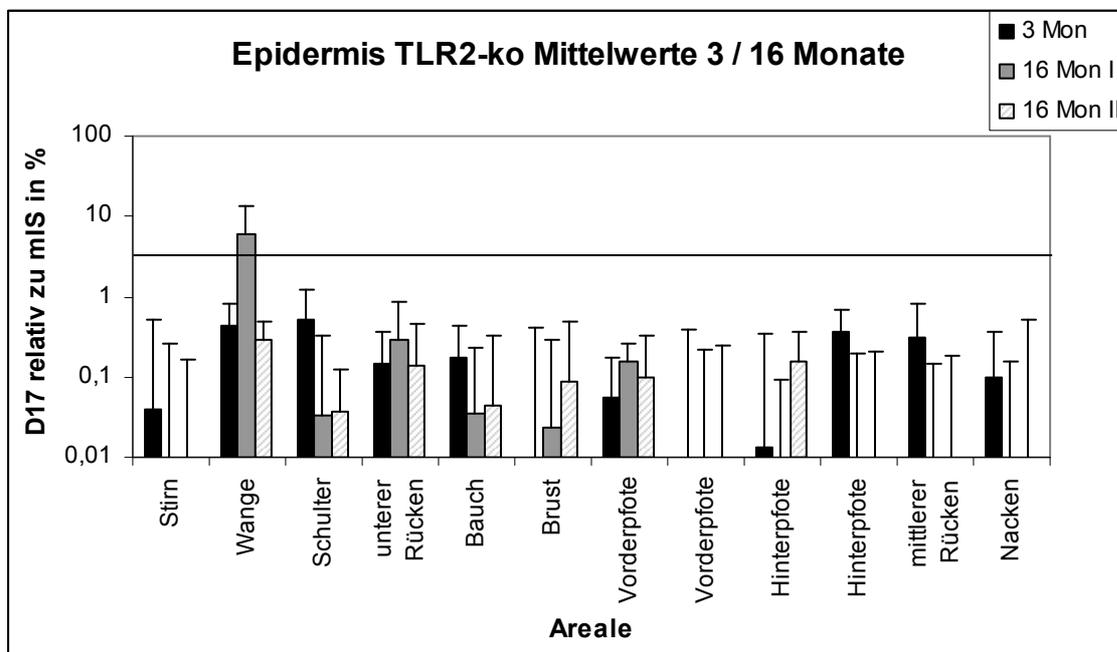


Abb. 42 D17-Deletion in Epidermis von TLR2-knockout-Mäusen im Alter von 3 bzw. 16 Monaten Im Wangenbereich der Epidermis kann eine geringfügige Erhöhung der D17-Deletion in einer der beiden 16 Monate alten Mäuse gemessen werden.

b) Dermis

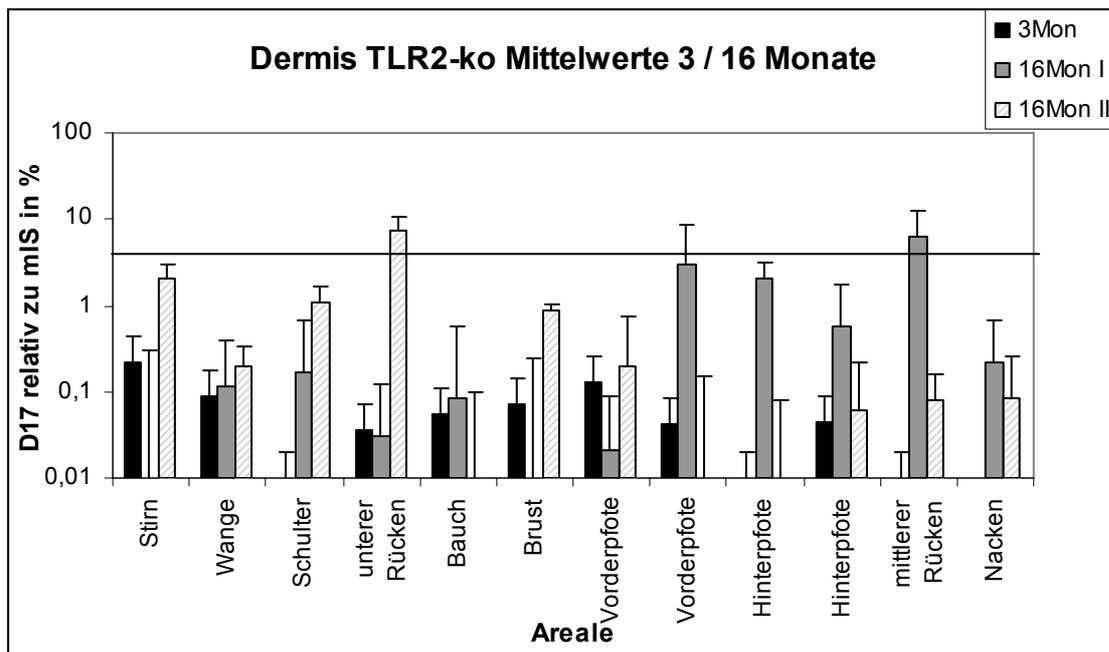


Abb. 43 D17 Deletion in Dermis von TLR2-knockout-Mäusen im Alter von 3 bzw. 16 Monaten. Im Fall der 16 Monate alten Mäuse kann eine geringe Erhöhung der D17-Deletion im Bereich des Rückens im Vergleich zu jungen Mäusen gemessen werden.

c) Subkutanen Fett

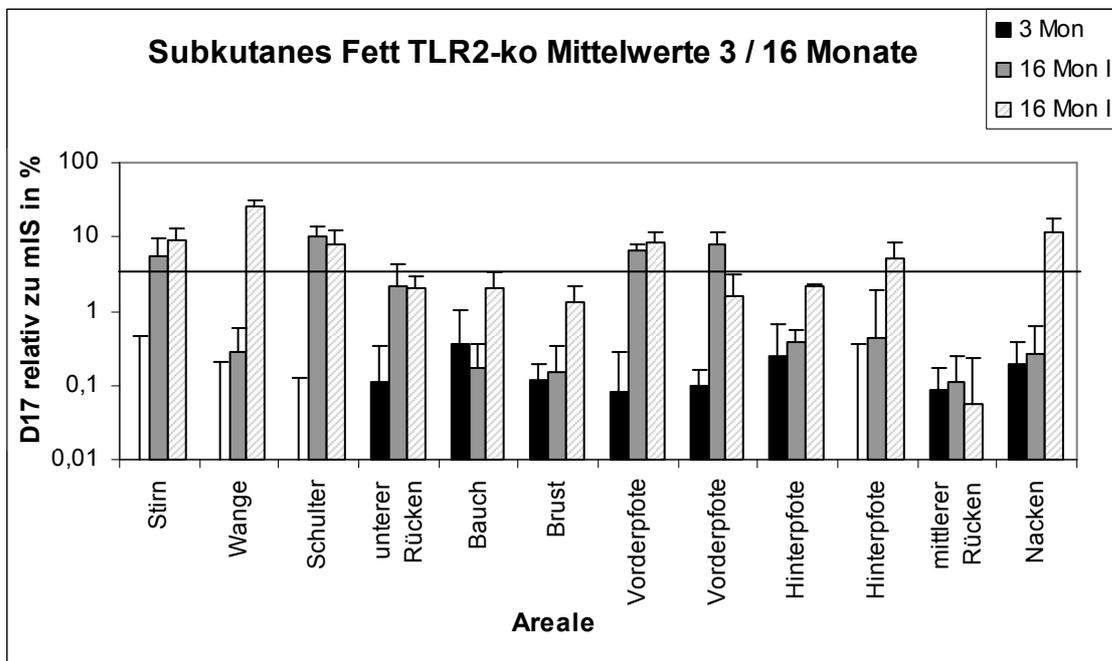


Abb. 44 D17-Deletion in subkutanem Fett von TLR2-knockout-Mäusen im Alter von 3 bzw. 16 Monaten. Bei 3 Monate alten TLR2-ko-Mäusen kann keine D17-Deletion gemessen werden. Im Fall der 16-Monate alten Mäuse kann bereits eine deutliche Erhöhung der D17-Deletion gemessen werden, die ungewöhnlicherweise auch in den Gesichtsarealen stattfindet.

d) Körperfett und Ohren

Im Körperfett von TLR2-knockout-Mäusen zeigte sich D17 Deletion sowohl im Bereich des Bauches, wie auch in den WT-Mäusen, allerdings auch bei einer Maus im Halsbereich.

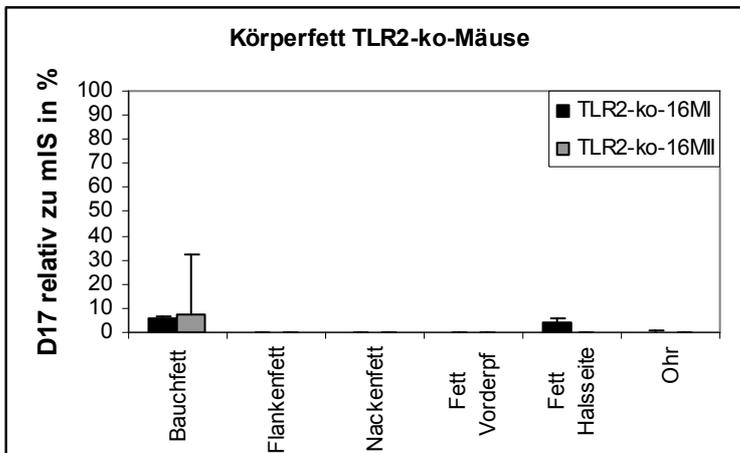


Abb. 45 D17 im Körperfett von TLR2-knockout-Mäusen. Im Körperfett von TLR2-knockout Mäusen wurde D17-Deletion vor allem im Bauchfett, in einem Fall auch im Fett seitlich am Hals gemessen.

1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zu Maushaut und Fett

1.4.1 Wildtyp

In jungen C57BL/6 Mäusen mit einem Alter von 3 Monaten war dabei in keinem der untersuchten Hautareale in Dermis oder Epidermis D17-Deletion messbar. Lediglich im subkutanen Fett der Vorder- und Hinterpfoten der 3-monatigen Mäuse war eine geringe Menge D17-Deletion messbar (Abb. 24 + Abb. 27).

Dies entspricht auch den Erwartungen, die sich hauptsächlich auf Daten humanen Common-Deletion (74-76) und auf die Ergebnisse mit Ratten und Mäusen (23, 77, 78) stützen.

Erwartet wurde dabei, dass die D17-Deletion, die in etwa der humanen Common-Deletion entspricht, im Gewebe der jungen Mäuse nicht oder fast nicht auftritt, sich mit dem Altern dann akkumuliert. Diese Akkumulation fand auch eindeutig statt und vergleicht man die Areale im subkutanen Fett junger und alter WT-Mäuse, so ist die Steigerung der CD-Menge in Schulter, Brust, Bauch, Vorder- und Hinterpfoten, mittlerem Rücken und Nacken signifikant ($p < 0,05$).

Bei den etwas älteren Mäusen mit einem Alter von 9 Monaten konnte bereits der Beginn einer Akkumulation von D17-Deletion festgestellt werden. Dabei fand sich in der Epidermis, wie auch bei 3 Monate alten Mäusen, keine Deletion.

In der Dermis dagegen fand man bereits geringe Mengen Deletion in den Bereichen Wange, Schulter und Vorderpfote, wobei in Wange und Schulter nur minimale Mengen D17-Deletion

bis ca. 3,5% (Deletionswerte immer relativ zu Housekeeping-Werten) gemessen wurden, in den Vorderpfoten bis zu knapp 9%. (Abb. 8, 11, 23)

Im subkutanen Fett von Wange, Schulter, Brust, Bauch, Vorder- und Hinterpfote und Nacken der 9-monatigen Mäuse ergab sich eine moderate Erhöhung der D17-Deletion auf maximal 20 %. (Abb. 9, 12, 18, 21, 24, 27, 33)

Bei den alten Mäusen im Alter zwischen ca. 17 Monaten bis zu 24 Monaten zeigte sich erwartungsgemäß die stärkste Erhöhung der gemessenen Deletion. Indes fand sich, wie bereits bei den jüngeren Mäusen zuvor, in der Epidermis keine messbare D17-Deletion.

Die Dermis enthielt nur im Nacken einer einzelnen Maus einen erhöhten Deletionswert (Abb. 32).

Die beinahe komplette Abwesenheit von D17-Deletion in der Haut alter Mäuse ist zwar etwas unerwartet, da Steigerungen mit dem Alter erwartet worden waren (23, 77). Allerdings passt dieses Ergebnis zu der Erkenntnis, dass beim Menschen die Common-Deletion in der Haut eher auf Photoalterung als auf chronologisches Altern zurückzuführen ist (11). Entsprechend war bei einem Vergleich der Werte von Dermis bzw. Epidermis mit denen des subkutanen Fettes bis auf die Bereiche Wange und Brust in jedem Areal die Menge an CD signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Wie in den Messungen der 9 Monate alten Mäuse, war auch bei den alten Mäusen der Hauptanteil der D17-Deletion im subkutanen Fett zu finden, der sich noch einmal stark erhöht hat. Ohne Ausnahme konnte in jedem Areal zumindest in einem Individuum eine Erhöhung der D17-Deletion des subkutanen Fettes festgestellt werden:

Im Stirn und Wangenbereich der alten Mäuse fällt diese allerdings trotzdem sehr gering aus. Im Stirnbereich liegt der einzige Messwert der Deletion bei etwa 8%, im Wangenbereich zwischen 3,5% beim niedrigsten und bis zu 13,3% beim höchsten Wert (ausgenommen sind bei diesen Angaben immer die Null-Werte ohne Deletion). Dies ist deshalb von Interesse, da die in (64) gemessenen Deletionswerte von CSB^{m/m} Mäusen gleichen Alters aus eben diesen Gesichtsbereichen stammen und deutlich stärker erhöht sind.

Die Mittelwerte aus den gemessenen Deletionswerten für den Wangen und Stirnbereich liegen logischerweise mit 2,69% und 1,56% im Mittel deutlich niedriger als die Werte in den übrigen Bereichen (Abb. 35).

Im Bereich der Schultern erreichte der Mittelwert aller Mäuse immerhin 15,41% (Abb. 35) wobei es hier Schwankungen von keiner Deletion über 3,2% als geringsten Messwert, bis hin zu 55,5% gab (Abb.12). Dabei gab es bei vier der Mäuse deutliche messbare Deletionswerte.

Im Bereich des unteren Rückens konnte ein Mittelwert von 12,74%. Der kleinste Deletionswert lag bei 14,69% und das Maximum bei 58,8%, alle anderen Werte lagen im

Ergebnisse

Bereich von Null. Wichtig ist hierbei, dass tatsächlich nur bei zwei der Mäuse in diesem Bereich Deletion messbar war (Abb. 15).

Der Brustbereich wies einen Mittelwert von 14,59% (Abb. 35) auf, der geringste Deletionswert dabei war 6,9% der höchste lag bei 57,1% (Abb. 18). In diesem Areal wiesen alle bis auf eine der Mäuse deutlich messbare Deletionswerte auf.

Im Bauchbereich ergab sich ein Mittelwert von 8,38% (Abb. 35). Das Deletionsminimum lag bei 4,1% das Maximum bei 16,1% (Abb. 21). Dabei zeigte sich bei der Hälfte der Mäuse messbare Deletion im subkutanen Fett des Bauchbereiches, die anderen ergaben bei der Messung Deletionswerte im Bereich von 0%.

Im den Bereichen der Vorder- und Hinterpfoten wurden ebenfalls sehr hohe Deletionswerte gemessen. Die Mittelwerte liegen in den Vorderpfoten bei 13,76% in den Hinterpfoten bei 17,17%, dem höchsten Mittelwert (Abb. 35). Die Deletionswerte lagen für die Vorderpfoten in Bereich zwischen 3,9% und 64,3% (Abb. 24) für die Hinterpfoten zwischen 3,6% und 89,2% (Abb. 27). In den Vorderpfoten war bei jeder Maus Deletion messbar, in den Hinterpfoten in vier der ausgewerteten Mäuse.

Der Mittlere Rücken enthält von allen gemessenen Arealen außerhalb des Gesichtes im subkutanen Fett den kleinsten Mittelwert. Er erreicht gerade 6,4% (Abb. 35) wobei die Deletionswerte im Einzelnen zwischen 4,1% und 22,6% liegen (Abb. 30). Hier konnte ebenfalls bei vier der Mäuse Deletion nachgewiesen werden.

Im Nackenbereich ergab sich ein ähnliches Bild wie im Bereich des unteren Rückens. Mit einem Mittelwert von 12,52% (Abb. 35) und einer Spannbreite zwischen 4,68% und 38,3% (Abb. 33). Der Nackenbereich wies bei allen gemessenen Mäusen, Deletion auf, aber nie so stark, wie beispielsweise in den Pfoten.

Für die Menge an Deletion im subkutanen Fett ergibt sich also aufsteigend folgende Reihenfolge:

Stirn < Wange < mittlerer Rücken < Bauch < Nacken < unterer Rücken < Vorderpfoten < Brust < Schultern < Hinterpfoten.

Bei den alten Mäusen war dabei der Unterschied in der Deletionsmenge im subkutanen Fett zwischen Stirn und Schulter, Brust, Vorder-, Hinterpfoten und mittlerem Rücken signifikant, sowie der Unterschied zwischen Wange und Schulter, Brust, Bauch, Vorder- und Hinterpfoten und der Unterschied zwischen Brust und Bauch. Das heißt, das subkutane Fett des Gesichtsbereichs unterscheidet sich signifikant (jeweils $p < 0,05$) von vielen anderen Arealen alter Mäuse.

Keine der Mäuse, egal welchen Alters wies D17-Deletion im Bereich der Ohren auf.

Im nicht mit der Haut assoziierten Körperfett der Mäuse ergab sich sowohl eine altersabhängige, als auch eine das Areal betreffende, spezifische und signifikante Verteilung der Deletion (Abb. 37 +38). In jungen Mäusen im Alter von 3 Monaten war im Körperfett keine D17-Deletion nachweisbar. In den alten Mäusen fand sich in jeder Maus im Fettgewebe des Bauch- und des Flankenbereiches eine signifikante Erhöhung der D17-Deletion (Bauch 22,86% ($p=0,0018$) und Flanken 32,12% ($p=0,0003$) im Mittel und gegenüber jungen Mäusen). Im Bereich des Nackens wurde bei einer Maus D17-Deletion gemessen (3,9% im Mittel mit den Werten ohne Deletion), im Bereich unterhalb der Vorderpfoten und im Halsbereich wurde keine D17-Deletion gemessen (0,76% bzw. 0,25%).

1.4.2 XPG-knockout-Mäuse

Die in dieser Arbeit untersuchten XPG-knockout-Mäuse einer Arbeitsgruppe aus Rotterdam, erreichten ein Alter ca. 13 Wochen und zeigten ein ausgezehrttes Erscheinungsbild mit verringertem Wachstum und Verlust des subkutanen Fettes (72).

Sie wiesen keine messbare D17-Deletion in der Dermis, der Epidermis oder dem subkutanen Fett auf (Abb. 39-41). In diesem Punkt unterscheiden sie sich nicht von den 3 Monate alten WT-Mäusen.

1.4.3 TLR2-knockout-Mäuse

Die Ergebnisse mit einem einzelnen Deletionswert in der Wange (6,02%) in der Epidermis (Abb. 42), zwei erhöhten Werten im Dermisbereich, unterer Rücken mit 7,4% und mittlerer Rücken mit 6,13% (Abb. 43) sowie Deletionen in Stirn (7,31%), Wange (12,67%), Schulter (8,96%), Pfoten (7,52% bzw. 4,7%) und Nacken (6,02%). im subkutanen Fett (Abb. 44) in den 16 Monate alten Mäusen und keiner Deletion in den jungen Mäusen entspricht dem, was an Ergebnissen erwartet worden war. Allerdings ist die Verteilung der Deletion in den beiden ausgewerteten Individuen unterschiedlich zu den bisher gemessenen WT-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund.

Im Körperfett der TLR2-knockout-Mäuse fand sich Deletion im Bauchbereich (6,06%) und in einem Fall im Halsbereich (4,44%) (Abb. 45). Zumindest was das Fett im Halsbereich angeht, unterscheidet sich diese Verteilung ebenfalls leicht von der im C57BL/6-Wildtyp (Abb. 38). Der Unterschied der Deletionsmenge im subkutanen Fett zwischen jungen und den älteren Mäusen war nur für den Bereich des unteren Rückens signifikant. Allerdings ist es schwierig, bei so wenigen Mäusen eine sinnvolle Statistik zu machen, zumal sie auch nicht das gleiche Alter wie die WT-Mäuse erreicht haben.

2. Auswirkung von UVA-Stress auf CSA- und CSB-defiziente Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen

In gealterten WT-Mäusen, sowie auch Mäusen mit mutierten CS-Proteinen zeigt sich eine Akkumulation mitochondrialer D17-Deletion zusammen mit durch Apoptose erhöhtem Zellumsatz (64). Mitochondriale Deletionen können auch durch oxidativen Stress in humaner Haut induziert werden (21). Um zu klären, ob diese induzierten Deletionen auch zum Zelltod beispielsweise in Form von Apoptose oder Nekrose in Hautzellen (Fibroblasten) von CS-defizienten Zellen und WT-Zellen führen, wurden sie oxidativem Stress ausgesetzt und danach wurde ausgewertet, ob Apoptose oder Nekrose induziert werden konnte und wie sich zeitgleich die CD verhält.

Eine Möglichkeit oxidativen Stress hervorzurufen ist, über UVA-Bestrahlung. Eine solche Bestrahlung muss repetitiv erfolgen, um messbare DNA-Schäden, zu denen auch die CD zählt, zu induzieren.

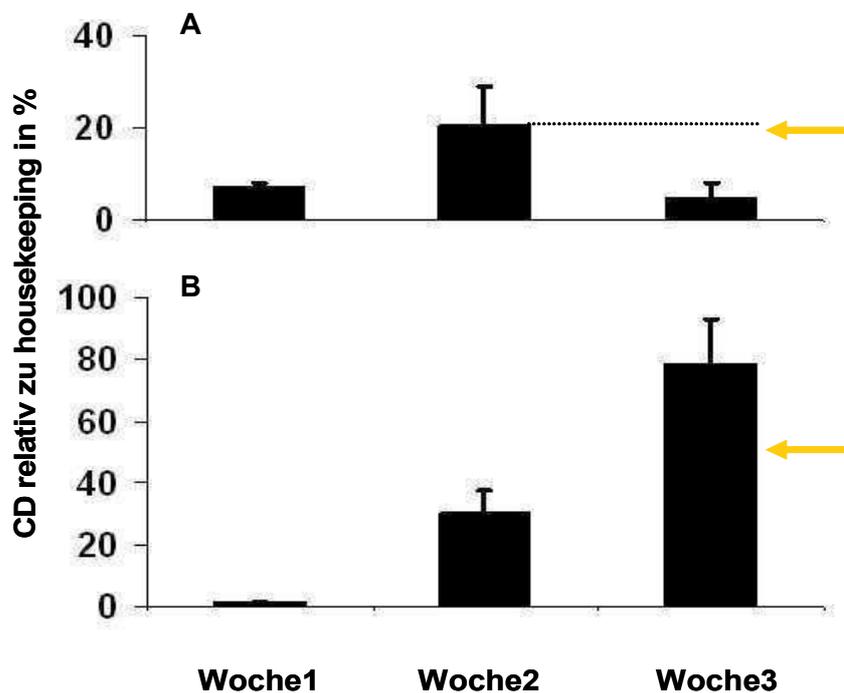


Abb. 46 CD nach UVA-Bestrahlung in CS4BR-Fibroblasten A) CD gemessen an 1, 2 oder 3 Wochen lang repetitiv mit $6\text{J}/\text{cm}^2$ bestrahlten CSB-defizienten Fibroblasten, nur adhärenente Zellen. B) CD gemessen an an 1, 2 oder 3 Wochen lang repetitiv mit $6\text{J}/\text{cm}^2$ bestrahlten CSB-defizienten Fibroblasten, adhärenente Zellen + abgestorbene Zellen aus dem Medienüberstand. (Adaptiert aus „Mitochondrial DNA in cancer and aging of the skin“ von York Kamenisch)

In vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die CD in WT-Zellen nach einer Woche repetitivem oxidativen Stress, induziert durch UVA-Bestrahlung, zunimmt. Nach zwei Wochen erfolgt eine weitere Zunahme, ebenso nach drei Wochen (22). Im Vergleich dazu nimmt der Wert bei CSB-defizienten CS4BR-Fibroblasten nach der dritten Bestrahlungswoche wieder ab (Abb. 46). Wurden dann die abgestorbenen Zellen aus dem Überstand dazugenommen und die CD gemessen, so ergibt sich auch nach der dritten Woche doch wieder ein Anstieg der CD.

Dieses in Abb. 46 gezeigte Experiment zeigt, dass in den abgestorbenen Zellen, die sich im Medienüberstand befanden, viel CD messbar war. Um nun zu sehen, ob es eine echte Korrelation zwischen CD und Zelltod nach oxidativem Stress gibt und ob dabei eher Apoptose oder Nekrose stattfindet, wurden Fibroblasten (CSA und CSB-defizient bzw. WT) mit UVA repetitiv bestrahlt und anschließend wurde untersucht, welcher Anteil der Zellen apoptotisch, nekrotisch oder viabel war und wie in diesen Anteilen die CD verteilt ist.

Um näher zu untersuchen, auf welche Art und Weise die verschiedenen Zellen durch UVA-Stress beeinflusst werden, wurde nun also zum einen gemessen, auf welchem Weg die Zellen sterben, zum anderen, ob sich dabei eine Erhöhung der mitochondrialen DNA-Schäden messen lässt.

Allgemein konnten bei diesem Experiment keine komplett einheitlichen Ergebnisse erzielt werden. Eindeutige Tendenzen gab es bei den defizienten Zellen, die immer stark von der UV-Strahlung betroffen waren. Bei den Wildtyp-Zellen gab es dabei größere Unterschiede. Dies liegt zum einen in der unterschiedlich hohen Passagenzahl der Zellen begründet, andererseits kommen diese Unterschiede aber auch durch die Variationen der genetischen Ausstattung der Donoren zustande. Zudem muss berücksichtigt werden, dass es vorkommen kann, dass ein Anteil der Zellen durch die Bestrahlung (besonders ab der zweiten Woche) so stark geschädigt wird, dass die Zellen von der FITC (Fluoresceinisothiocyanat) - Annexin und PI (Propidiumiodid)-Färbung nicht erfasst werden und fälschlicherweise als viable Zellen gezählt werden. Diese Tendenz kann man an der Messung der Größenverteilung der Zellen erkennen, wenn der Anteil besonders kleiner Zellen ($< 50 \mu\text{m}$) sich im Vergleich zur Kontrolle erhöht.

2.1 Apoptose und Nekrose

Sowohl in CSA und CSB defizienten Zellen, als auch in Wildtyp-Zellen zeigte sich nach den Bestrahlungsintervallen (1,2 und 3 Wochen repetitiver UVA-Bestrahlung) eine Erhöhung des Zelltodes. Dabei wurde insbesondere der Anteil der apoptotischen Zellen erhöht.

Nach der ersten Woche Bestrahlung ist der Anteil an apoptotischen (Gate P6) und nekrotischen Zellen (Gates P4 und P5) in den CS-defizienten Zellen stärker erhöht, als in den Wildtyp-Zellen. Nach der zweiten und dritten Woche ist die Schädigung so stark, dass kein eindeutiger Unterschied mehr zwischen Wildtyp und CS-defizienten Zellen erkennbar ist. Teils sind die Zellen so stark geschädigt, dass sie nicht mehr färbbar sind. So wäre es möglich, dass sie in der Fraktion der viablen Zellen (Gate P3) mitgezählt werden. Dieser Verdacht ergab sich bei Zellen, die in der dritten Bestrahlungswoche beinahe nur noch ungefärbte Zellen aufwiesen. Diese zeigten gleichzeitig, eine deutlich geringere Zellgröße im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollzellen und konnten so aus der Bewertung ausgeschlossen werden.

Bei einer Bestrahlung über drei Wochen (W) ergeben sich die folgenden Ergebnisse:

Die Anzahl der apoptotischen Zellen steigt mit den Wochen in allen Zellarten an. In der ersten Woche noch stärker in CS-defizienten Zellen, ab der zweiten Woche ohne Unterschied zwischen WT und CS-defizienten Zellen. Bei den nekrotischen Zellen steigt die Anzahl in der ersten Woche noch an, in der zweiten Woche nur noch geringfügig, während sie in der dritten Woche eher sinkt. Dieses Ergebnis ergibt sich dadurch, dass die Menge der nekrotischen Zellen in den Kontrollschalen mit den Wochen langsam ansteigt (Siehe auch Abb. 48).

Ergebnisse

Abb. 47 und 48 sind Beispiele für eine typische Bestrahlung von WT, CSA- und CSB-defizienten Zellen. Der Anteil apoptotischer Zellen steigt an, insbesondere bei den defizienten Zellen.

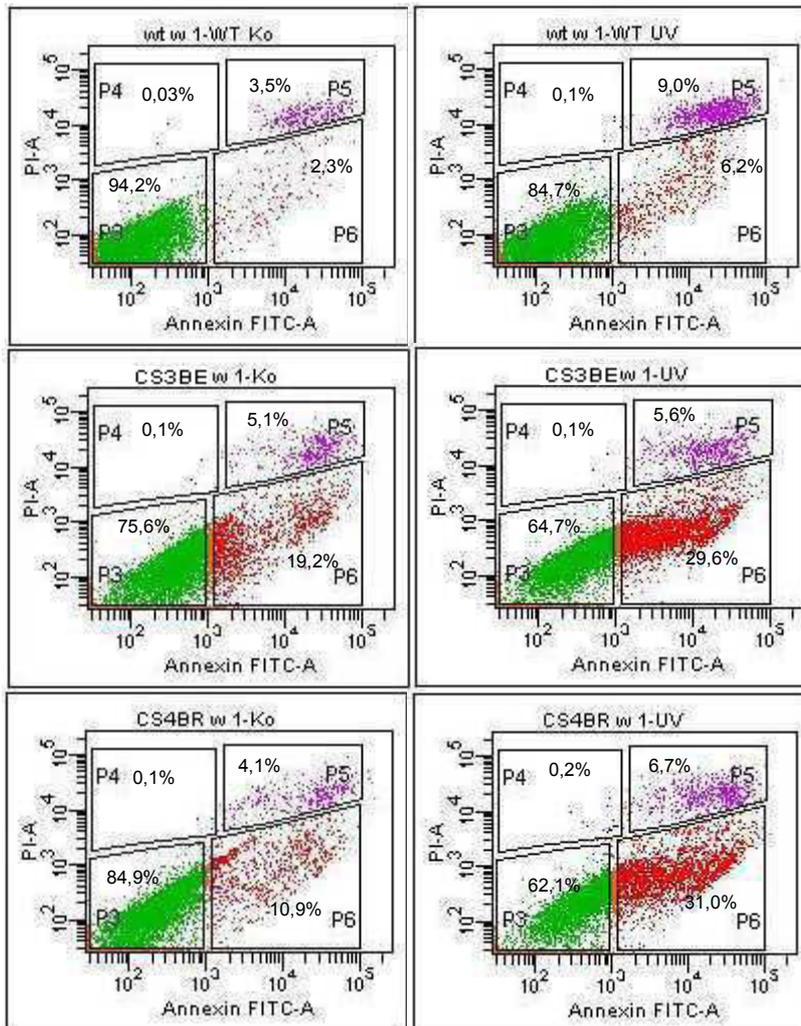


Abb. 47 FACS-Sort –Ergebnisse nach einer Woche Bestrahlung. Repräsentativ die Ergebnisse eines FACS-Sorts nach einer Woche repetitiver Bestrahlung mit UVA-Licht ($6\text{J}/\text{cm}^2$) Bei allen Zellen verstärkt sich die Anzahl apoptotischer und nekrotischer Zellen. Besonders betroffen sind dabei die CSA und CSB-defizienten Zellen. P3 sind die ungefärbten, deshalb viablen Zellen, P4+5 sind die stark mit PI gefärbten und somit nekrotischen Zellen, während P6 die nur mit FITC-Annexin gefärbten apoptotischen Zellen enthält.

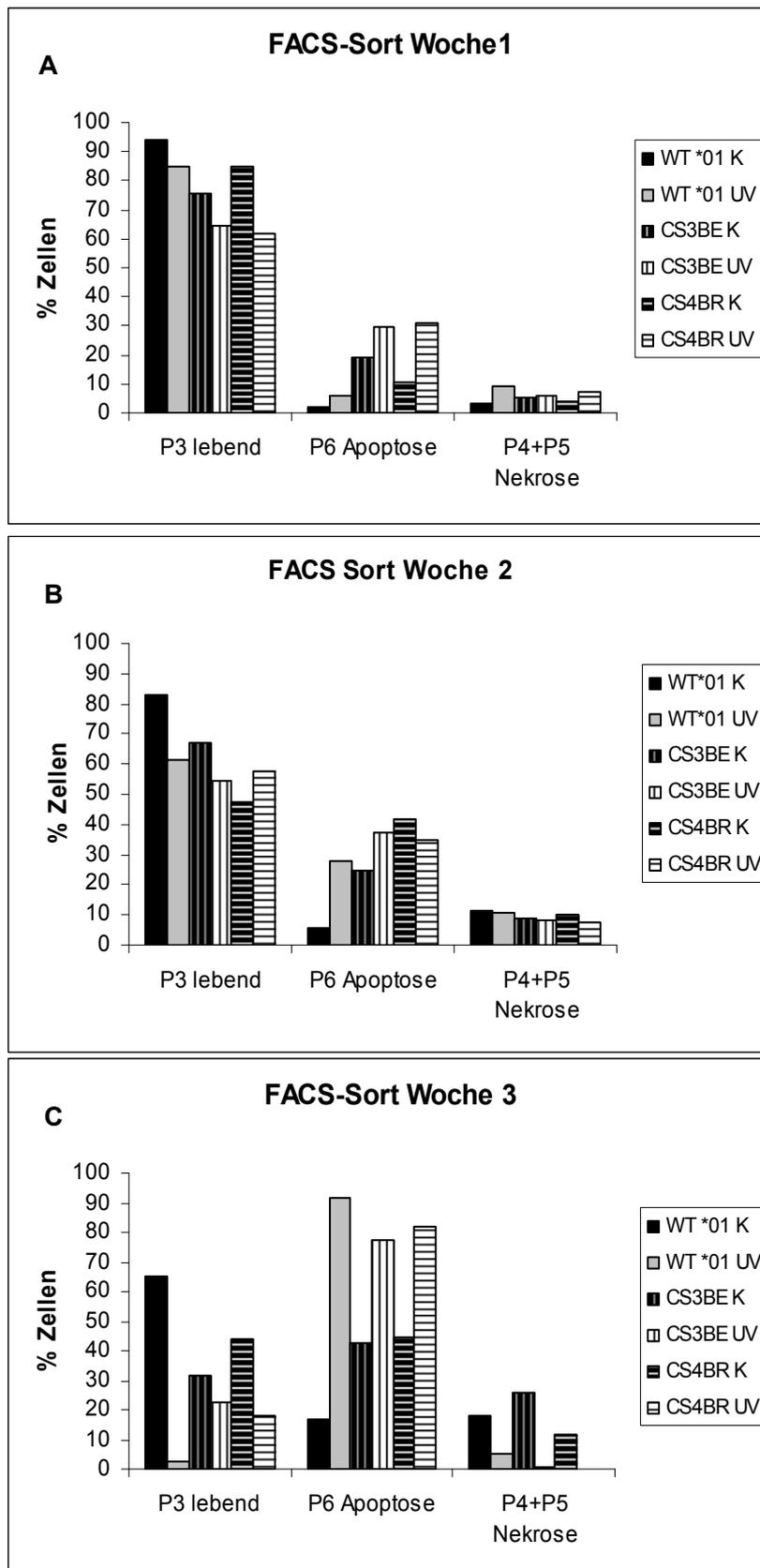


Abb. 48 FACS-Sort –Ergebnisse nach einer (A), zwei (B) und drei (C) Wochen Bestrahlung.

Ebenfalls repräsentativ, die Ergebnisse eines Experiments. Man kann deutlich erkennen, dass auch in den Kontrollen die Viabilität abnimmt, jedoch deutlich weniger als in den behandelten Zellen. Gleichzeitig nimmt die Apoptose stark zu.

Werden alle FACS-Sort Ergebnisse zusammengefasst, ergibt sich eine Zunahme von Apoptose und Nekrose in der ersten Woche, die Anzahl lebender Zellen nimmt zugleich ab.

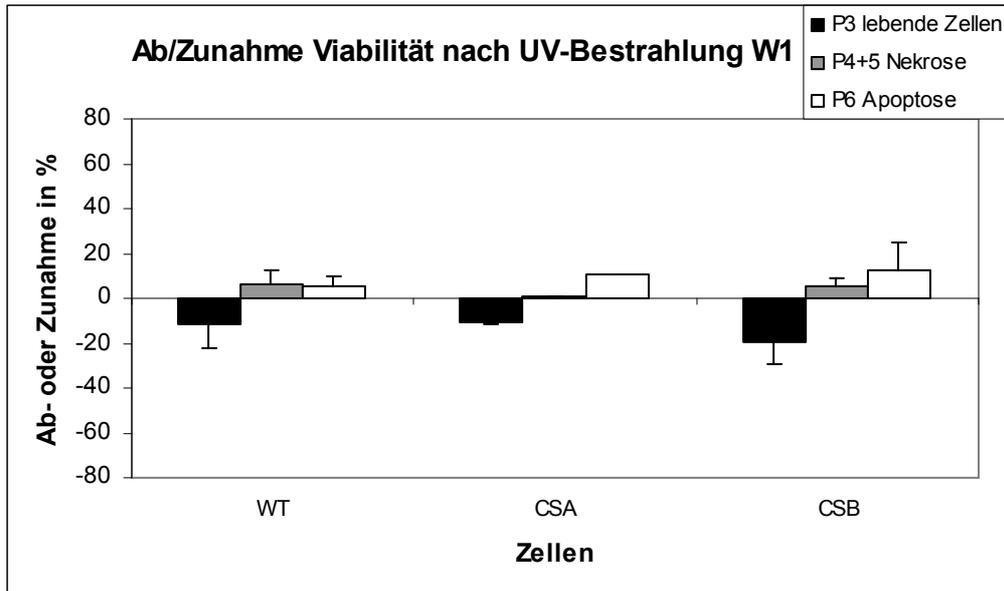


Abb. 49 Ab- und Zunahme der Viabilität verschiedener Zellen nach einer Woche UV-Bestrahlung. Die Anzahl lebender Zellen im Vergleich zur Kontrolle nimmt bei allen Zellen eindeutig ab, am stärksten in den CSB-defizienten Zellen. Apoptose und Nekrose steigen bei allen Zellen an, wobei CSA- und CSB-defiziente Zellen einen stärkeren Anstieg der Apoptose aufweisen als WT-Zellen.

Nach zwei Wochen Bestrahlung ist der Unterschied zwischen WT und defizienten Zellen nicht mehr eindeutig. Auch, weil Fibroblasten die lange Kultur nicht immer gut vertragen.

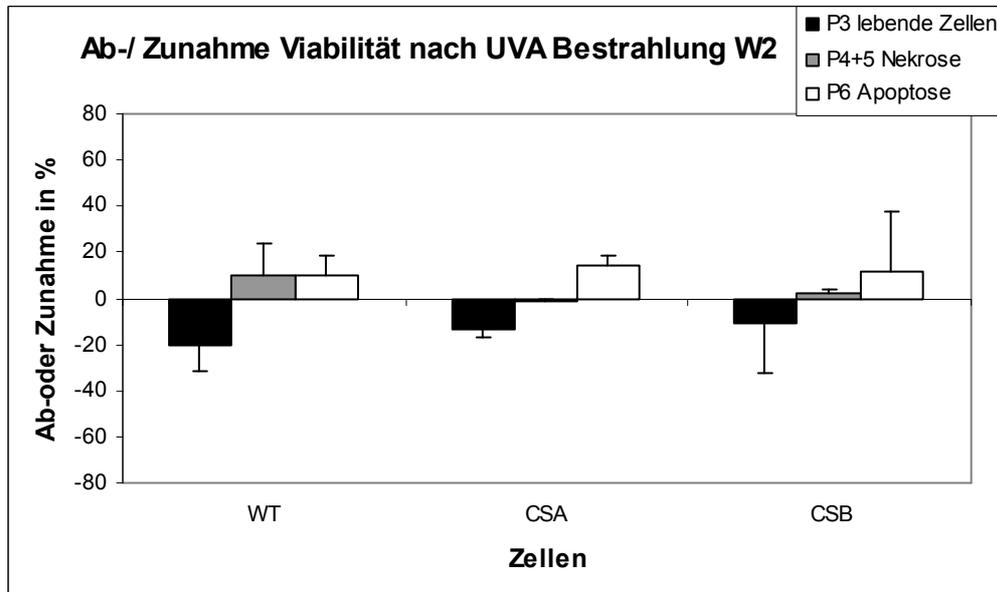


Abb. 50 Ab- und Zunahme der Viabilität verschiedener Zellen nach zwei Wochen UV-Bestrahlung. Die Anzahl lebender Zellen nimmt weiter ab. In der Differenz wird dieser Effekt nicht so deutlich, da auch in den Kontrollschalen die Viabilität abnimmt.

Nach dreiwöchiger Bestrahlung sind besonders die hohen Werte für Apoptose auffällig.

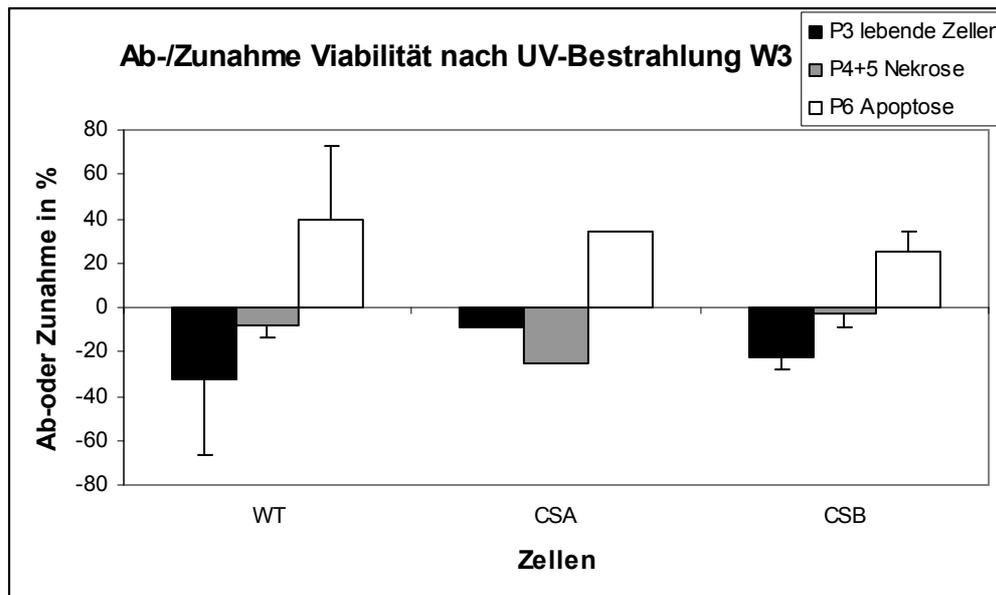


Abb. 51 Ab- und Zunahme der Viabilität verschiedener Zellen nach drei Wochen UV-

Bestrahlung. Die Anzahl lebender Zellen verändert sich im Vergleich zur zweiten Woche nicht mehr stark. Der Anteil nekrotischer Zellen wird geringer, der Anteil apoptotischer Zellen steigt noch weiter. Für die CSA-defizienten Zellen sind in der dritten Woche nur Daten von einem Experiment vorhanden, da bei den übrigen Experimenten nach drei Wochen keine lebendigen Zellen mehr vorhanden waren.

2.2 Common-Deletion

Die Inzidenz der Common-Deletion ist in UVA-bestrahlten Zellen erhöht. Allerdings ergibt sich dabei kein klares Muster. Diese Erhöhung zeigt sich nämlich sowohl in den viablen Zellen, als auch in nekrotischen und apoptotischen Zellen und ist zudem unbeständig (Abb. 52). Dies liegt vermutlich an vielen Faktoren, die auf sowohl die bestrahlten, als auch die Kontrollzellen einwirken.

Um wenigstens eine gewisse Tendenz der CD aufzuzeigen, wurde die Anzahl der Zelllinien mit erhöhter CD je Experiment und Woche gezählt und durch die Gesamtzahl der entsprechenden Zelllinien dividiert um Prozentwerte zu bilden, bei wie vielen Zelllinien die CD erhöht ist (Abb. 52).

Nach einer Woche Bestrahlung weisen die Hälfte der lebendigen Zellen (aus P3), 37,5% der apoptotischen Zellen (aus P6) und ebenfalls 50% der nekrotischen Zellen aus P4+5 eine Erhöhung der CD auf. Dies bleibt im Fall der WT-Zellen in P3 auch nach zwei oder drei Wochen Bestrahlung gleich, in P4+5 steigt der Wert nach zwei Wochen auf 75%, nach drei Wochen auf 83,3%, während in P6 der Wert nach zwei Wochen auf 25% sinkt, dann auf 50%. Die lebenden CSA und CSB-Zellen zeigen nach einer Woche Bestrahlung geringfügig weniger Zelllinien mit erhöhter CD, nach zwei und drei Wochen jedoch deutlich mehr als die WT Zellen. Dasselbe Bild ergibt sich auch für apoptotische (P6) und nekrotische Zellen

(P4+5). Nach einer Woche Bestrahlung liegt die Zahl von Zelllinien mit erhöhter CD ähnlich hoch, wie beim WT, nach zwei oder drei Wochen deutlich höher. (Siehe auch Abb. 52).

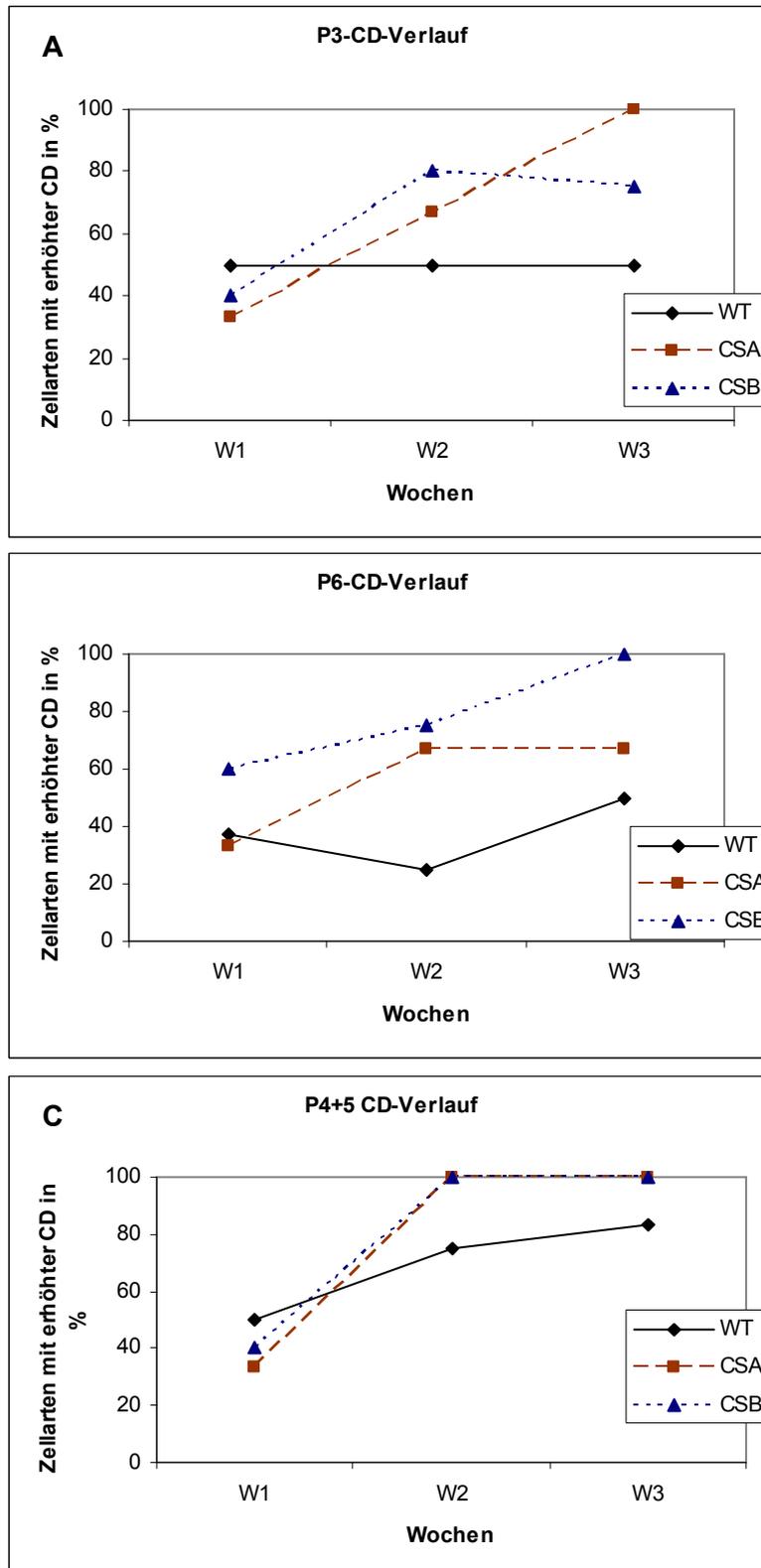


Abb. 52 Anzahl der Zellarten mit Common-Deletion-Erhöhung nach 1, 2 oder 3 Wochen in %.

Die Werte für CD wurden für jede Woche gemessen und es wurde gezählt, welche der Zelllinien eine erhöhte Menge an CD aufwiesen. Diese wurden durch die Gesamtanzahl der Zelllinien dividiert um daraus Prozentwerte zu bilden. So wurde für jedes der gesorteten Felder (P3, P4+5, P6) gemessen, in wie vielen Zelllinien die CD zunimmt.

3. Verlauf von Wasserstoffperoxid-Stress in Fibroblasten

Um oxidativen Stress hervorzurufen und dadurch die Translokation der CS-Proteine in die Mitochondrien zu induzieren, wurden in unserer Arbeitsgruppe Fibroblasten durch Behandlung mit 25 μ M Wasserstoffperoxid gestresst. Diese Konzentration an H₂O₂ erwies sich in unseren Experimenten sowohl als wirksam, als auch als sublethale Dosis, insbesondere, da zum Teil auch längere Einwirkzeiten genutzt wurden. Höhere Dosen H₂O₂ ergaben Probleme mit der Viabilität der Zellen (79). Offen blieben dabei die Fragen, wie lange verbleibt H₂O₂ im Medium, wird es von der Zelle aufgenommen und kann dort womöglich DNA- oder sonstige Schäden hervorrufen oder wird diese geringe Menge an H₂O₂ rapide durch die Zelle abgebaut und nur eine Signalwirkung sorgt für die Translokation der CS-Proteine ins Mitochondrium.

3.1 Im Medium von Fibroblasten

3.1.1 Wildtyp-Zellen

In Wildtyp-Zellen zeigte sich, dass 25 μ M H₂O₂ innerhalb von einer Stunde aus dem Medium verschwunden sind, sofern sie sich über Zellen befinden. In Medium alleine wird H₂O₂ während dieser Zeit nicht messbar abgebaut.

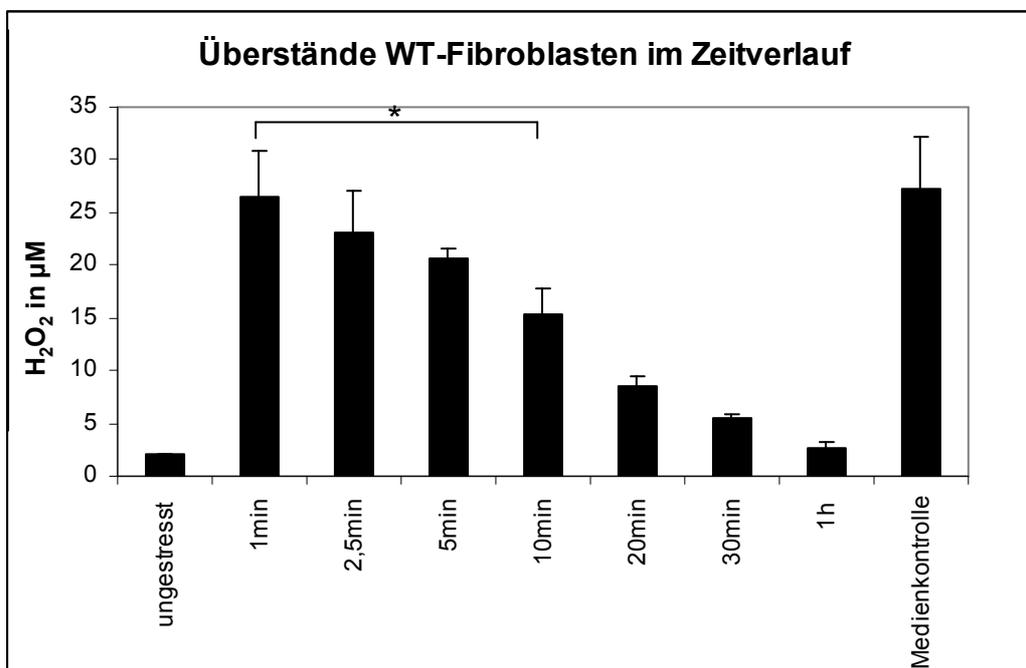


Abb. 53 H₂O₂-Gehalt der Überstände von WT-Fibroblasten im Zeitverlauf nach Stress mit 25 μ M H₂O₂: Bereits nach 5 Minuten hat die Menge an H₂O₂ im Medienüberstand signifikant abgenommen. Nach einer Stunde ist kein Wasserstoffperoxid mehr im Medium vorhanden. In der Medienkontrolle zeigt sich, dass in Medium ohne Zellen keine schnelle Abnahme des H₂O₂ stattfindet.

3.1.2 CSA und CSB-defizienten Zellen

Auch in CSA und CSB-defizienten Zellen zeigt sich dasselbe Bild. Innerhalb einer Stunde wird das H_2O_2 im Medienüberstand von Zellen abgebaut.

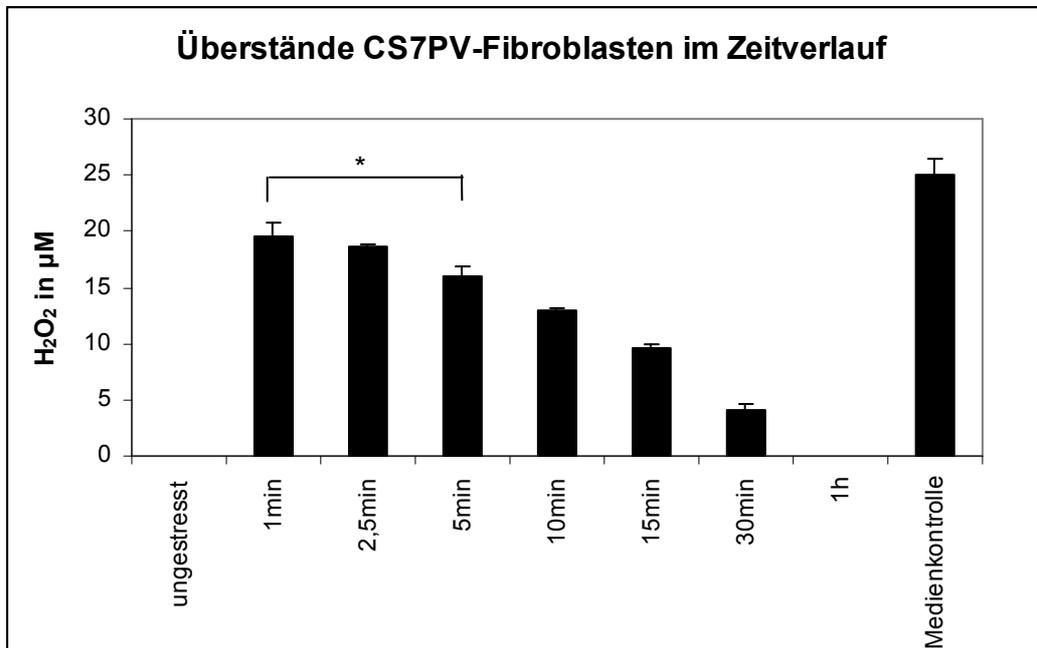


Abb. 54 H_2O_2 -Gehalt der Überstände von CSA-defizienten Fibroblasten im Zeitverlauf nach Stress mit $25\mu M H_2O_2$: Der Verlauf des Abbaus von H_2O_2 im Medienüberstand von CSA-defizienten Zellen verläuft entsprechend der WT-Zellen. Nach einer Stunde ist hier ebenfalls kein H_2O_2 mehr messbar.

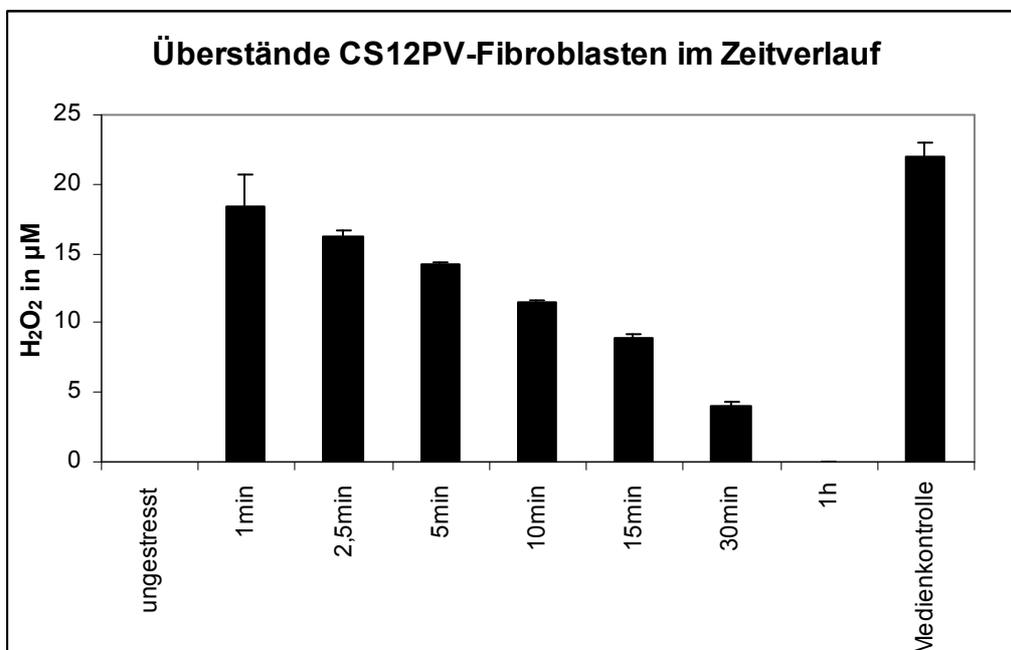
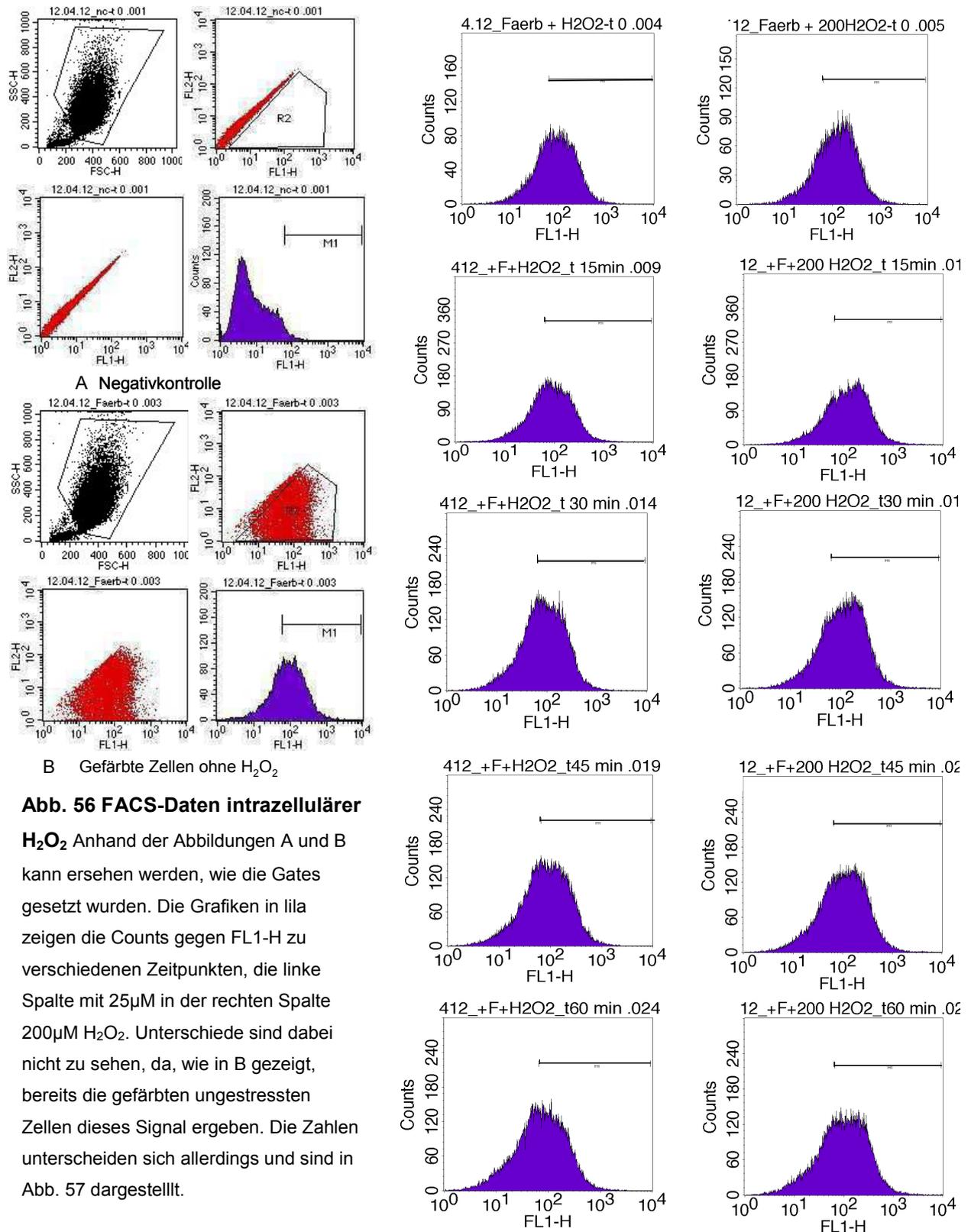


Abb. 55 H_2O_2 -Gehalt der Überstände von CSB-defizienten Fibroblasten im Zeitverlauf nach Stress mit $25\mu M H_2O_2$ Der Verlauf des Abbaus von H_2O_2 im Medienüberstand von CSB-defizienten Zellen verläuft entsprechend der WT-Zellen. Nach einer Stunde ist hier ebenfalls kein H_2O_2 mehr messbar.

3.2 In den Zellen

Um herauszufinden, ob und wie viel von den 25µM H₂O₂ im Zellinneren von Fibroblasten ankommen und wie der Zeitverlauf dabei aussieht, wurden Fibroblasten zuerst mit CM-H₂DCF-DA gefärbt dann mit 25µM H₂O₂ gestresst bzw. unbehandelt belassen und zuletzt im FACS ausgewertet.



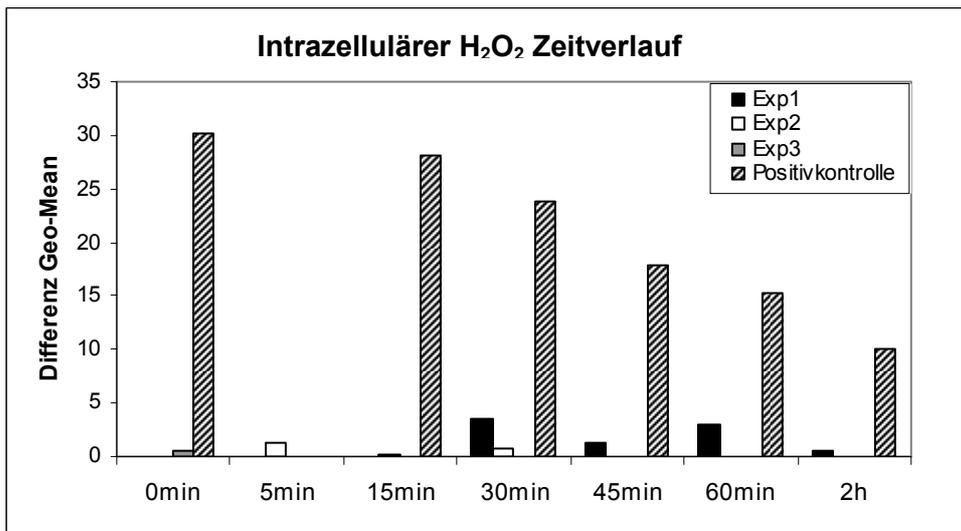


Abb. 57 Verlauf von Stress mit 25 μ M H₂O₂ im Zellinneren. Im Verlauf von zwei Stunden zeigt sich nach extrazellulärem Stress mit 25 μ M H₂O₂ keine Erhöhung des Farbstoffsignals im Zellinneren, das mit der intrazellulären Konzentration von H₂O₂ korreliert. Die Positivkontrolle, bei der mit einer extrazellulären Konzentration von 200 μ M H₂O₂ gestresst wurde, zeigt messbare Werte und eine stetige Abnahme des intrazellulären H₂O₂.

Dabei zeigte sich, dass von den eingesetzten 25 μ M im Zellinneren prinzipiell nichts mehr zu messen ist. Die Messung insgesamt wurde dadurch erschwert, dass alleine die gefärbten Zellen ein Signal ergaben (Abb. 56 B). Durch die Zählung der Zellen konnte zwar ein Zeitverlauf der intrazellulären Konzentration von H₂O₂ nach extrazellulärer Zugabe einer Konzentration von 200 μ M H₂O₂ als Positivkontrolle gemessen werden, jedoch ergab sich bei extrazellulärer Zugabe von 25 μ M H₂O₂ keine eindeutige Zu- oder Abnahme des intrazellulären Gehaltes von H₂O₂ innerhalb der nächsten zwei Stunden (Abb. 56 und Abb. 57).

E Diskussion

1. Murine D17-Deletion in Maushaut

Patienten mit CS sowie Mäuse mit CSB^{m/m}-Genotyp zeigen einen Phänotyp mit verringertem subkutanem Fett im Gesichtsbereich. Zudem ist dort, wie auch bei CSA^{-/-}-Mäusen die murine D17-Deletion im Vergleich zum WT deutlich erhöht. Als Ursache für den Verlust des subkutanen Fettes in diesem Bereich, konnte ein durch Apoptose erhöhter Zellumsatz bestätigt werden (64).

Um herauszufinden, wie sich mitochondriale Deletionen in der Haut und in subkutanem Fett von chronologisch gealterten, unbehandelten WT-Mäusen verhalten, wurden verschiedene Areale der Haut von WT-Mäusen (C57BL/6) verschiedenen Alters untersucht. Dabei wurden Dermis, Epidermis und subkutanen Fett voneinander getrennt und die Stärke der D17-Deletion in den verschiedenen Hautarealen und Körperfettbereichen (Abb. 3 und 36) gemessen.

1.1 Wildtyp-Mäuse

In der Dermis und Epidermis von jungen und gealterten WT-Mäusen wurde erwartungsgemäß beinahe keine D17-Deletion gemessen. In der Literatur findet sich wenig zur Messung von mitochondrialen Deletionen in der Haut unbehandelter Mäuse. Zur D17-Deletion in der Haut von alten Mäusen gibt es eine Publikation, die besagt, dass in Geweben mit viel respiratorischer Aktivität, zu denen auch die Haut gehört, sehr wenig D17-Deletion zu messen ist (80). Es gibt eine negative Selektion gegen Zellen mit starker Deletionslast da ihre Respiratorische Kapazität eingeschränkt ist (12, 81, 82). In diesen Publikationen wurde allerdings nicht geschaut, wie es sich bei sonnenexponierter Haut verhält.

Zur Common-Deletion in menschlicher Haut gibt es mehrere Veröffentlichungen. In allen ist die Common-Deletion in der Haut nur wenig vorhanden, selbst bei älteren Individuen (20, 83). Anders sieht das bei sonnenexponierter Haut aus, in der die CD verstärkt zu finden ist, bzw. auch induziert werden kann (21, 83). Die Mäuse die untersucht wurden, sind völlig unbehandelt gewesen und somit war auch keine solche induzierte Deletion zu erwarten. Insgesamt gesehen bestätigt dies die Ergebnisse, die in der Maushaut erzielt wurden.

Im subkutanen Fett wurde in den meisten der untersuchten Areale eine signifikante Steigerung der D17-Deletion beim Vergleich von jungen und gealterten Mäusen gefunden (Abb. 35).

Hier die Reihenfolge mit stärker werdender Deletionslast. Ein * bedeutet hierbei Signifikanz gegenüber demselben Areal in jungen Mäusen:

Stirn < Wange < mittlerer Rücken < Bauch* < Nacken* < unterer Rücken < Vorderpfoten* < Brust* < Schultern* < Hinterpfoten*.*

Im Körperfett kommt es zu einem signifikanten Anstieg von D17-Deletion im Bauch- und Flankenbereich im Vergleich von jungen und alten Mäusen (Abb. 37 und 38).

Insgesamt gesehen steigt der Anteil der D17-Deletion sowohl im subkutanen Fett als auch in anderem Körperfett mit dem Alter der Maus eindeutig an. Dabei waren signifikante Unterschiede in der Stärke und auch bei der Verteilung der Deletion vorhanden (Abb. 35 und 38).

Bei einem Vergleich mit vorherigen Daten unserer Arbeitsgruppe fällt zudem auf, dass die D17-Deletion im Gesichtsbereich der alten CSB^{m/m}-Mäuse stark erhöht ist (64). WT-Mäuse zeigen in diesem Bereich nur geringe Mengen D17-Deletion im subkutanen Fett (Abb. 6 und Abb. 9).

Die Frage, wie es in WT-Mäusen zu mitochondrialen Deletionen kommt und wie diese akkumulieren ist nicht eindeutig geklärt.

Die Entstehung von mt Deletionen ist wahrscheinlich abhängig von der Replikation der mt DNA und gleichzeitig an bestimmten Stellen vorliegenden DNA-Schäden (22, 24, 26, 27). Da die Reparatur von DNA-Schäden mit dem Alter nachlässt (84, 85), können auch in den direct-repeat Regionen der mt DNA mehr Schäden akkumulieren und so in älteren Individuen die Rate an neu entstehenden mt Deletionen steigern.

Des Weiteren ist die Rate oxidativer Schäden wie beispielsweise 8-oxo-G mit zunehmendem Alter erhöht, vermutlich durch einen Anstieg des oxidativen Stresses (86-90). Die in manchen Publikationen gezeigte Erhohtung der ROS-Produktion durch die Mitochondrien im Alter (88) ist allerdings umstritten (91). Die in dieser Arbeit gemessenen Deletionswerte sprechen auch für die von Harman postulierte „Free Radical Theory of Ageing“(6). In CSB^{m/m}-Mäusen, in denen das mutierte CSB nicht wie im WT mit den Proteinen der mt DNA-Reparatur interagieren kann (64), ist es gut vorstellbar, dass bei der Replikation der mt DNA häufiger als im WT punktuelle Mutationen vorhanden sind, die eine Entstehung von Deletionen begünstigen. Dies würde erklären, warum die Deletionen in CSB-defizienten Individuen früher und in gealterten Individuen stärker auftreten als im WT.

Bei Untersuchungen des Fettgewebes von Mäusen verschiedenen Alters fanden sich folgende Merkmale: Der Fettanteil am Körpergewicht nahm ab einem Alter von einem Jahr kontinuierlich ab. Das Verhältnis von GSH zu seiner oxidierten Form GSSG im Fettgewebe

verschlechtert sich bei einem Vergleich von 2 Monate alten Mäusen zu 26-monatigen (92). Ein verringertes Verhältnis von GSH zu GSSG wäre entweder durch langsames Recycling mittels Glutathion-Reduktase oder durch verstärkten oxidativen Stress zu erklären. Dieser wiederum kann eine Ursache für einen Anstieg mitochondrialer Deletionen sein.

Zudem konnten die Autoren zeigen, dass oxidativer Stress im Fettgewebe zu einer veränderten Differenzierung von Adipozyten führt, indem die klonale Expansion unterdrückt wird (92). Dies wäre neben der Apoptose (71) eine zusätzliche Erklärung dafür, warum es in CS-Patienten und CSB^{mm}-Mäusen nur einen verringerten Anteil subkutanen Fettes gibt (71).

Eine weitere mögliche Erklärung, wieso es in den Zellen von subkutanem- und Körperfett zu einer Akkumulation mitochondrialer Schäden kommt, wäre beispielsweise die mit dem Alter verminderte Autophagie.

Die Autophagie, die auch schon im Zusammenhang mit CSB genannt wurde (93), hängt ebenfalls mit dem Altern zusammen (94). Durch Insulin wird die Makroautophagie, die auch für den Abbau beschädigter Mitochondrien verantwortlich ist, inhibiert, während Glucagon sie induziert (95). Mit zunehmendem Alter wird dabei der induzierende Effekt von Glucagon in der Leber von Nagetieren schwächer (80, 96). Zudem wurde gezeigt, dass oxidativer Stress sich auf die Regulation der Insulin-Signaltransduktion auswirken kann und somit die Autophagie-inhibierende Funktion von Insulin verlängert (94, 97).

Durch diese Effekte wird es mit zunehmender Abnahme der Autophagie wahrscheinlicher, dass geschädigte Mitochondrien nicht abgebaut werden und sowohl Schäden akkumulieren, als auch weitere Schäden verursachen.

Das subkutane Fett in Mäusen mit mutiertem CSB zeigt eine extrem erhöhte Akkumulation von D17-Deletion, selbst im Vergleich mit alten WT-Mäusen (64).

Ob nun direkt durch den Defekt im CSB-Protein oder indirekt über oxidativen Stress gehemmt, ist in diesen Zellen die Autophagie der Mitochondrien von Beginn an reduziert (93). Zudem wird durch die gestörte NER und BER und die anderen Bereiche in denen CS-Proteine beteiligt sind, verstärkt Stress erzeugt (45-48, 62-65). Somit entsteht mehr Schaden in diesen Zellen inklusive der Mitochondrien, der weder durch die direkte DNA-Reparatur, noch durch ein umfassenderes System wie die Autophagie erfasst werden kann. Dadurch sind CS-defiziente Zellen kaum in der Lage Schäden entgegenzuwirken und altern deswegen bereits ab dem Beginn ihrer Entstehung.

Diese Theorie würde auch dazu passen, dass die entsprechenden Mausmodelle und auch CS-Patienten stark reduziertes Fettgewebe aufweisen. Ist in Adipozyten die Autophagie gestört, so findet keine vollständige Differenzierung statt. Solche Zellen enthalten deutlich mehr Mitochondrien als normale Zellen des weißen adipösen Gewebes. Diese Fettzellen funktionieren dabei nicht so gut, wie normalerweise als Speicher für Lipide (98).

Mäuse bei denen das für Autophagie benötigte Gen *atg7* (autophagy-related gene-7) ausgeknockt wird, zeigen folgenden Phänotyp: Signifikant verringertes weißes adipöses Gewebe, geringere Körpergröße, untypische weiße Adipozyten mit mehreren kleinen Lipidtröpfchen und einer stark erhöhten Mitochondrienanzahl. Des Weiteren ändert sich bei diesen Mäusen der gesamte Metabolismus. Sie sind trotz hochkalorischer Diät resistent gegen Fettleibigkeit, zeigen gleichzeitig auch keine Lipidakkumulationen an ungewöhnlichen Körperbereichen. Ihre Sensitivität gegenüber Insulin ist erhöht, ebenso wie ihre Blutwerte für Triglyceride, Cholesterol und Leptin (99, 100).

Dieser Phänotyp erinnert stark an den von $CS^{m/m}$ -Mäusen oder auch CS-Patienten, zumindest was das subkutane und Körperfett an unterschiedlichen Bereichen angeht. Auch bei diesem Phänotyp im CS gibt es eine extreme Reduktion des Fettes und keine Gewichtszunahme trotz entsprechender Diät. Möglicherweise liegt diesem Phänotyp im CS ebenfalls die gestörte Autophagie von Mitochondrien in Fettzellen zu Grunde. Dies müsste jedoch in weiteren Experimenten untersucht werden.

In WT-Mäusen zeigte sich neben der altersabhängigen Akkumulation der D17-Deletion zusätzlich auch eine Verteilung sowohl im subkutanen als auch im Körperfett. Die Bedeutung dieser Verteilung indes ist nicht geklärt.

In Untersuchungen des Fettgewebes zeigte sich, dass sich die Genexpression mit dem Alter verändert, jedoch auch depotabhängig ist (101). Zudem verändert sich die Verteilung des Fettes mit dem Altern dramatisch. Im fortgeschrittenen hohen Alter wird das Fett von subkutanen zu abdominalen Depots und ektopischen Stellen umverteilt (102, 103). Diese Umverteilung ist mit einem erhöhten Risiko für das metabolische Syndrom verbunden (104, 105). Des Weiteren wurde auch gezeigt wurde, dass bei medikamenteninduzierter Lipodystrophie auch die Mitochondrien betroffen sind, genauer genommen, dass Verluste mitochondrialer DNA zu Lipodystrophie als Nebenwirkung führen (106, 107). In welchem Zusammenhang die mitochondrialen Deletionen und die jeweiligen Fettdepots stehen, ist insbesondere für das stark mit D17-Deletion belastete Körperfett von Bauch und Flanken eine interessante, jedoch offene Frage.

Interessant wäre herauszufinden, wie diese Vorgänge sich auf das Fettgewebe im Alterungsprozess von Mäusen und Menschen auswirken und inwiefern die Akkumulation von Deletionen diesen Prozess eventuell mitbeeinflusst.

1.2 XPG-knockout-Mäuse

Das XPG-Protein ist wie auch CSA und CSB Bestandteil der Nukleotidexzisionsreparatur. Weiterhin gibt es CS-Komplex-Erkrankungen, bei denen XPG-Mutationen Ursache sein

können. Wie genau die Veränderungen sind, die bei diesen Patienten vorliegen und wie es zum entsprechenden Phänotyp kommt ist indes unklar.

XPG-knockout Mäuse zeigen ein deutlich verringertes Wachstum und eine stark verkürzte Lebensspanne von 24 Tagen im Vergleich zu WT-Mäusen (108).

Die in dieser Arbeit untersuchten XPG-knockout-Mäuse einer anderen Gruppe aus Rotterdam, erreichten ein Alter von ca. 13 Wochen und zeigten ein ausgezehrttes Erscheinungsbild mit verringertem Wachstum und Verlust des subkutanen Fettes (72).

Sie wiesen keine messbare D17-Deletion in der Dermis, der Epidermis oder dem subkutanen Fett auf (Abb. 39-41). In diesem Punkt unterscheiden sie sich nicht von den 3 Monate alten WT-Mäusen.

Dies weist darauf hin, dass allgemein die mitochondrialen Deletionen in Mäusen nicht die Ursache sondern eine Auswirkung der geschädigten Proteine sind, die entweder durch Basenschäden oder durch Alterungsproblematiken erst entstehen. In Mäusen, in denen die Reparatur möglicherweise zu Grunde liegender DNA-Schäden sowie der Abbau solcher Deletionen gestört ist (beispielsweise die Autophagie), akkumulieren mit der Zeit, je nach Gewebe, steigende Mengen der Deletion. Diesem Anstieg könnte ansonsten nur noch der Zelltod entgegenwirken, der in den einzelnen Geweben ja sehr unterschiedlich ist und möglicherweise in Mäusen mit CS-Phänotyp, wie den XPG-ko-Mäusen oder CSB^{m/m} – Mäusen dafür sorgt, dass es in der ersten Lebenszeit dieser Mäuse im subkutanen Fett keine Ansammlung der Deletion gibt.

1.3 TLR2-knockout-Mäuse

Bei den TLR-2-knockout-Mäusen war wie zuvor schon erwähnt, keine Veränderung im Vergleich zur WT entsprechenden Verteilung und Stärke der D17-Deletion erwartet worden. Vor allem, da TLR-2 nicht mit der DNA-Reparatur zusammenhängt und ROS nur im Infektionsfall beeinflusst (73).

Die Ergebnisse mit einem einzelnen Deletionswert in der Wange von 6,02% in der Epidermis (Abb. 42), zwei erhöhten Werten im Dermisbereich, unterer Rücken mit 7,4% und mittlerer Rücken mit 6,13% (Abb. 43) sowie Deletionen in Stirn (7,31%), Wange (12,67%), Schulter (8,96%), Pfoten (7,52% bzw. 4,7%) und Nacken (6,02%). im subkutanen Fett (Abb. 44) in den 16 Monate alten Mäusen und keiner Deletion in den jungen Mäusen entsprechen voll den Erwartungen. Allerdings ist die Verteilung der Deletion in den beiden ausgewerteten Individuen unterschiedlich zu den bisher gemessenen WT-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund. Im Körperfett der TLR2-knockout-Mäuse fand sich Deletion im Bauchbereich (6,06%) und in einem Fall im Halsbereich (4,44%) (Abb. 45). Zumindest was das Fett im Halsbereich angeht, unterscheidet sich diese Verteilung ebenfalls leicht von der im C57BL/6-Wildtyp (Abb. 38).

Ob es bei den Mäusen Unterschiede in der Verteilung der Deletionen nur durch individuelle Unterschiede gibt oder ob es Zusammenhänge, wie beispielsweise den genetischen Hintergrund der Maus gibt, wäre eine Frage, die durch weitere Experimente zu klären wäre. Die hier gezeigten Ergebnisse sprechen dafür, dass die TLR2-knockout-Mäuse mit Balb/c-Hintergrund sich wie WT-Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund verhalten. Die einzelnen Abweichungen sind geringfügig und dürften individuellen Unterschieden geschuldet sein.

1.4 Diskussion der Methode

1.4.1 Deletionsmessung

In verschiedenen Publikationen, in denen es um die Messung von Deletionen der mt DNA geht, sind die prozentualen Anteile der Deletion wesentlich geringer, als die in dieser Arbeit gemessenen Werte. (u.a.(20, 22, 23, 76, 109))

Auch durch das Messverfahren der murinen D17-Deletion aus Bildern von Agarosegelen ergaben sich einige Limitationen. Das Programm mit dem die densitometrische Dichte der Deletion gemessen wurde (Adobe Photoshop CS2) ist bei der Erkennung der Helligkeit von Banden an ein Maximum gebunden, das manchmal bei den Banden des Housekeeping-Produktes erreicht wurde. Hierdurch könnte es sein, dass diese Banden zu schwach bewertet wurden und deswegen die daraus errechnete Menge an Deletion stärker sein kann. Zusätzlich ist es möglich, dass je nach eingesetzter Menge DNA beim housekeeping die Plateau-Phase schneller erreicht wird. So würde die gesamte DNA-Menge als stärker eingeschätzt werden und dies würde wiederum die Werte für die Deletion erhöhen.

Dies wäre ein Ansatz, durch den erklärt werden könnte, warum die Werte der mitochondrialen Deletionen, sich in ihrer Höhe so stark unterscheiden.

Um dafür zu sorgen, dass keine Überstrahlung aus den benachbarten Bahnen einen Messwert für die Deletion erzeugt, wurde ein Grenzwert von 3% definiert. Alle berechneten Werte unter diesem wurden als „deletionsfrei“ gewertet. Dieser Prozentwert ergab sich bei der Auswertung dadurch, dass sich, wenn auch selten, geringe Werte von ca. 1% Deletion an Stellen ergaben, an denen auf dem Agarosegel definitiv keine Bande zu sehen war. Um solche durch Hintergrundlicht entstandenen Werte auszuschließen, wurde dieser Grenzwert definiert.

1.4.2 Unterschiede bei Individuen

Bei der Verteilung der D17-Deletion, besonders im subkutanen Fett ergaben sich viele Häufungen, allerdings auch deutliche individuelle Unterschiede innerhalb von altersgematchten Gruppen mit gleichem genetischem Hintergrund.

Besonders auffällig sind dabei die Unterschiede im subkutanen Fett gealterter Mäuse, die zwar das gleiche Alter und denselben genetischen Hintergrund aufwiesen, aber gleichzeitig

ein ganz unterschiedliches Verteilungsmuster der Deletion. Es bleibt ungeklärt, wie stark und durch welche Faktoren die Verteilung der D17-Deletion gesteuert wird.

2. Oxidativer Langzeitstress und seine Auswirkungen auf WT und CS-defiziente Fibroblasten

Verschiedene Veröffentlichungen zeigen, dass Apoptose in der Hautalterung eine Rolle spielt (110-112). Als Induktor für die Apoptose wurde mehrfach geschädigte mt DNA genannt (113). Solche Schäden der mt DNA können auch durch oxidativen Stress induziert werden (21). Da in unserer vorangehenden Publikation die Akkumulation mitochondrialer Schäden mit einer erhöhten Apoptose zusammenkam (64), interessierte uns, ob oxidativer Stress auch zu erhöhtem Zelltod führt und ob dabei auch Schäden der mt DNA eine Rolle spielen. Hierfür wurden WT sowie CSA- oder CSB-defiziente primäre Fibroblasten repetitiv mit UVA bestrahlt. Nach einer, zwei und drei Wochen wurde ein FACS-Sort durchgeführt, der apoptotische, nekrotische und viable Zellen unterscheidet. In den gesorteten Zellen wurde die CD gemessen.

Die Daten zum FACS-Sort nach repetitivem UVA-Stress zeigen, dass durch eine Bestrahlung der Fibroblasten die Anzahl apoptotischer Zellen deutlich erhöht wird. Bei der Nekrose ergeben sich nur geringfügige Unterschiede, während die Anzahl viabler Zellen sinkt. Gleichzeitig steigt während einer Periode von 3 Wochen die Anzahl an Zelllinien mit erhöhter CD, wobei sich durch den Sort zeigt, dass keine eindeutige Häufung bei lebenden, nekrotischen oder apoptotischen Zellen erkennbar ist.

2.1 Apoptose und Nekrose

Dieses Experiment zeigt, dass durch repetitive UVA-Bestrahlung mit geringer Dosis ($6\text{J}/\text{cm}^2$) die Anzahl apoptotischer Zellen in einer Fibroblastenkultur bereits nach einer Woche deutlich ansteigt. In den CS-defizienten Zellen ist dieser Anstieg stärker als in WT-Zellen. Nach zwei Wochen ist die Menge apoptotischer Zellen weiter erhöht und es gibt keinen eindeutigen Unterschied mehr zwischen WT und CS-Zellen. Drei Wochen repetitive UVA-Bestrahlung führen zu einer weiteren, starken Steigerung des Anteils der apoptotischen Zellen (Abb. 47-51).

Dass UVA-Bestrahlung Apoptose induzieren kann wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen bestätigt, allerdings wurden hierbei nicht mehrere Bestrahlungen in niedriger Dosis ($6\text{J}/\text{cm}^2$) sondern einzelne Bestrahlungen mit hoher Dosis UVA (ab $20\text{J}/\text{cm}^2$) verwendet (38, 41, 114). Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass langfristige,

repetitive Bestrahlung in einem als subletal angesehenen Bereich durchaus zum Zelltod in Form von Apoptose führen kann.

Dieses Experiment zeigt weiterhin, dass die Menge der nekrotischen Zellen sich uneinheitlich entwickelt (Abb. 47-51). In der ersten Woche zeigt sich eine leichte Zunahme nekrotischer Zellen, die sich in der zweiten Woche jedoch nicht weiter steigert. In der dritten Woche ist die Zahl nekrotischer Zellen sogar rückläufig. Zum Thema Nekrose und UVA-Bestrahlungen finden sich auch verschiedene Veröffentlichungen, doch auch hier wird, wie im Abschnitt über Apoptose bereits erwähnt, nicht mit mehreren niedrigen sondern mit einzelnen hohen UVA-Dosen oder mit einer niedrigen Dosis nach Zugabe verschiedener Chemikalien bestrahlt (115, 116). So erklärt sich, dass in diesem Experiment, anders als in einer der gefundenen Publikationen, Nekrose nicht der hauptsächliche Weg UVA-bestrahlter primärer Fibroblasten zum Zelltod ist (115).

2.2 Common-Deletion

Die Common-Deletion ist ein Marker sowohl für das chronologische Altern, als auch für Photoalterung und lässt sich auch in verschiedenen Tumoren nachweisen. Sie kann allerdings auch durch oxidativen Stress, beispielsweise erzeugt durch eine repetitive UV-Bestrahlung induziert werden (20, 67). Dies gilt sowohl für menschliche Haut, als auch für Fibroblasten in Zellkultur. In den untersuchten Fibroblasten ergab sich dabei eine Steigerung der CD im Verlauf einer dreiwöchigen Bestrahlung (67).

Ein anderes, vorangehendes Experiment zur Messung der CD nach repetitiver UVA-Bestrahlung von Fibroblasten ergab, dass bei CS4BR-defizienten-Fibroblasten in der dritten Bestrahlungswoche keine weitere Steigerung der CD zu finden ist, sondern eine Abnahme. Nimmt man aus diesem Experiment den Medienüberstand und isoliert daraus DNA, misst die CD und addiert die Ergebnisse, so ergab sich auch in der dritten Bestrahlungswoche wieder eine Erhöhung der CD (Abb. 46). Dieses Experiment warf die Frage auf, ob die CD dazu führt, dass die Zellen sterben oder ob es sich nur um einen gleichzeitigen Effekt handelt.

Der Basislevel an CD wird einmal durch die Passagenzahl beeinflusst, gleichzeitig auch durch eine negative Klonselktion betroffener Zellen (81, 82, 117).

Wie auch in anderen Publikationen (21) sind bei dem hier gezeigten Versuch die Level an CD auch im Vergleich zum Basislevel in vielen Zelllinien erhöht, insbesondere ab der zweiten Woche (Abb. 52). Es zeigt sich dabei jedoch kein Verteilungsmuster. Das heißt, die CD ist weder in der Fraktion der viablen, noch bei nekrotischen oder apoptotischen Zellen eindeutig stärker erhöht. Zwar ergeben sich immer wieder einzelne Peaks, doch im Gesamtbild keine Häufungen in den vorgegebenen Gruppierungen. Auch kann bei den

gesorteten Zellen die stetige Erhöhung der CD mit steigender Anzahl Bestrahlungen nicht mehr gezeigt werden.

Eindeutig ist also nur die Steigerung in der Anzahl der Zelllinien, die eine erhöhte CD aufweisen ($2^{-\Delta\Delta ct} > 1$). In der P3-Fraktion, also den viablen Zellen ist diese nur für CS-defiziente Zellen zu sehen, während die CD konstant in der Hälfte der bestrahlten Zelllinien erhöht ist. Allerdings liegt diese Erhöhung nicht immer in denselben Zelllinien vor.

In der P4+5 Fraktion steigt die Anzahl der Zellen, die eine Erhöhung der CD enthalten eindeutiger an, auch wenn die Erhöhung an sich nicht größer ist. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Auswertung der Fraktion mit nekrotischen Zellen zum Teil nur auf wenigen (> 100) Zellen basiert.

In der apoptotischen Fraktion P6 steigt über drei Wochen die Zahl der Zelllinien mit erhöhter CD sowohl in den CS-defizienten Zellen, als auch in den WT-Zellen an, auch wenn es in der zweiten Woche einen Einknick bei den WT-Zellen gibt.

Diese Ergebnisse weisen also eher darauf hin, dass die Common-Deletion und der Zelltod oxidativ gestresster Zellen nicht in direktem Zusammenhang stehen. Zwar haben beide dieselbe Ursache, wie einmal das Experiment hier und auch unterschiedliche Veröffentlichungen zeigen, doch hängen sie nicht kausal zusammen. Die Zusammenhänge zwischen UVA-Bestrahlung und einer Steigerung der apoptotischen Zellfraktion könnte stattdessen beispielsweise durch ROS-abhängige Apoptosesignale hergestellt werden (118).

Interessant wäre ein weiterführendes Experiment, in dem die Fraktion der viablen Zellen oder auch nur UVA-bestrahlte Zellen auf Seneszenz oder Zellzyklusstatus untersucht werden, ob sich dabei ein Verteilungsmuster der CD zeigt. Gerade weil die CD auch ein mit Seneszenz assoziierter Biomarker ist (119) und der Zellzyklus als Reaktion auf den oxidativen Stress oder die induzierten Schäden angehalten werden könnte. Zellzyklusarrest steht wiederum in direktem Zusammenhang mit der Alterung von Zellen und Geweben. Zudem wurde kürzlich auch ein Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, Common-Deletion und der ATM/Chk2-Checkpoint Aktivierung in HeLa-Zellen gefunden (120).

Insgesamt gesehen ist dieses Experiment vielen beeinflussenden Faktoren unterworfen, die es erschweren, die Daten eindeutig zu interpretieren. Dies beginnt bereits bei den verschiedenen primären Zelllinien, die von unterschiedlichen Donoren stammen und die sich deswegen alle in ihrer Reaktion auf Stress unterscheiden. Des Weiteren beeinflusst die Passagenzahl der Zellen die Menge an CD positiv, während die Probleme mit der Atmungskette, die betroffene Zellen aufweisen zu einer negativen Selektion führen (21, 82, 116).

Bei den CS-defizienten Zellen (insbesondere CSA-defiziente) waren nur Zellen mit hohen Passagenzahlen vorhanden, für die sich nur teilweise passende WT-Gegenstücke fanden. Zudem zeigte die Erfahrung in unserer Arbeitsgruppe, dass die Common-Deletion sich in der Zellkultur oft nicht so verhält, wie es für in-vivo-Experimente veröffentlicht wurde.

Bekannterweise enthalten Mitochondrien nicht nur eine Kopie ihres Genoms, sondern mehrere. Auch dies erschwert es, die Bedeutung einer bestimmten Menge an CD zu erfassen (121, 122).

Ein weiteres Problem liegt im Setup des Experiments. Es müssen Zellen über drei Wochen lang in Zellkulturschalen gehalten werden. Während dieses Zeitraumes gibt es nicht nur bei den behandelten Zellen Veränderungen, sondern natürlich auch bei den Kontrollen. Da die Kontrollschalen andere Bedingungen haben, finden hier andere Selektionsmechanismen statt, die man noch näher untersuchen müsste. Z.B. in welcher Zellzyklusphase befinden sich die Zellen, gibt es in einer der Gruppen vermehrt Seneszenz, welche Gene werden aktiviert oder inaktiviert, werden Mechanismen wie z.B. Autophagie aktiviert oder kann es auch bei diesen Zellen zu einer Erhöhung der CD kommen?

3. Wasserstoffperoxid-Stress

3.1 Stress im Medium

Viele der Experimente, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt und auch veröffentlicht wurden, hatten als Grundlage oxidativen Stress von Fibroblasten, der durch direkte Zugabe von 25µM H₂O₂ zum Zellkulturmedium induziert wurde (79).

Dabei war nicht bekannt, wie lange das zugegebene H₂O₂ im Medium vorhanden ist. Geklärt werden sollte zum einen, ob es beispielsweise einen Unterschied macht, ob H₂O₂ bereits einige Zeit vorher zum Medium gegeben wird und dann die Zellen damit gestresst werden, oder ob diese Zugabe direkt erfolgen sollte. Außerdem sollte auch untersucht werden, nach welcher Zeit noch welcher Anteil des H₂O₂ im Medienüberstand über den Zellen zu finden ist.

3.1.1 Wildtyp-Fibroblasten

Bei der Messung des H₂O₂-Gehaltes nach Zugabe von 25µM H₂O₂ zu verschiedenen WT-Fibroblasten zeigte sich, dass das H₂O₂ überall dort, wo sich unter dem Zellkulturmedium auch Zellen befanden, nach der Zeit von 1h aus dem Medium verschwunden war. In gleichzeitig angesetzten Kontrollen konnte nach dieser Zeit noch in etwa die ursprünglich angesetzte Menge H₂O₂ nachgewiesen werden (Abb. 53).

Die Medienkontrolle zeigte, trotz leichter Schwankungen in manchen Versuchen, dass das H₂O₂ innerhalb dieser Zeit ohne Zellen nicht abgebaut wird. Wegen der vorhandenen Schwankungen (data not shown), bei denen unklar ist, ob sie durch das Messverfahren oder durch den Ansatz der H₂O₂-Lösung oder durch eventuelle, leichte Verluste von H₂O₂ im Verlauf der Zeit entstanden sind, sollte davon abgesehen werden, Medium mit H₂O₂ vor der Anwendung länger stehen zu lassen.

Nach einer Stunde war bei der Anwesenheit von Zellen kein H₂O₂ mehr im Medium messbar. Dies deutet auf zwei Möglichkeiten hin:

Entweder wurde das gesamte H₂O₂ in die Zelle aufgenommen und dort komplett oder teilweise abgebaut, oder er wurde außerhalb der Zelle abgebaut.

H₂O₂ ist zwar als ein Molekül bekannt, das die Zellmembran ohne Probleme passieren kann, allerdings ist das so nicht ganz richtig. H₂O₂ gelangt durch die Membranen in die Zellen, jedoch nicht unlimitiert (123). Somit ist weiterhin unklar, ob und wie schnell H₂O₂ ins Zellinnere gelangt und wie lange er im Zellinneren verbleibt.

3.1.2 CS-defiziente Fibroblasten

Sowohl in CSA-defizienten als auch in CSB-defizienten Fibroblasten ergaben sich nach Stress mit 25µM H₂O₂ dieselben Ergebnisse wie für WT-Fibroblasten. Innerhalb von einer

Stunde wurde das zugegebene H_2O_2 entweder abgebaut oder in die Zellen aufgenommen (Abb. 54 und 55).

3.2 Stress im Zellinneren

Bei Messungen im Zellinneren zeigte sich, dass von $25\mu\text{M}$ H_2O_2 im Zellinneren mit dieser FACS-Färbung nichts zu messen ist (Abb. 49 und 50).

Messungen im Medium zeigen, dass nach einer Stunde bei Anwesenheit von Zellen die kompletten $25\mu\text{M}$ H_2O_2 verschwunden sind (Abb. 53). Zwar wird oft postuliert, dass H_2O_2 problemlos ins Zellinnere diffundiert, doch dies ist tatsächlich nicht der Fall. Der Durchtritt von H_2O_2 durch die Zellmembran ist nicht unlimitiert (123). Diese Limitierung hängt vermutlich auch mit dem H_2O_2 -Signalling zusammen, das normalerweise in bzw. zwischen Zellen stattfindet (124-126).

Die Ergebnisse, dass kein Wasserstoffperoxid im Zellinneren messbar ist, passt auch zu den Erkenntnissen anderer Gruppen, die zeigen konnten, dass bei externem Stress mit $30\mu\text{M}$ H_2O_2 in Endothelzellen das Glutathion-Redoxsystem aktiviert wird und das H_2O_2 schnell abbaut (127). Unsere Messungen (Abb. 49 und 50) zeigen, dass auch in Fibroblasten das H_2O_2 schnell abgebaut ist. Vermutlich erfolgt der Abbau im Fall der Fibroblasten stärker über die Katalase. In Versuchen mit $100\mu\text{M}$ extern zugegebenem H_2O_2 zeigte sich, dass ein Inhibitor für Katalase die Anzahl überlebender Zellen stark senkte, während ein Inhibitor für die Glutathion-Peroxidase, dem Enzym das für die Redoxreaktion zweier GSH mit z.B. OH^- zu GSSG und H_2O benötigt wird, keinen Einfluss auf die Zahl überlebender Zellen hat (128). Zudem ist es nur logisch, dass die Zellen H_2O_2 schnell abbauen, da es ja auch zelluläre Signale gibt, die über H_2O_2 vermittelt werden. Um diese Signale trotz externem Stress durch H_2O_2 zu erhalten, muss dieser baldmöglichst abgebaut werden (123, 127).

Im Fall des Stresses mit $200\mu\text{M}$ H_2O_2 zeigte sich ein beständiger Rückgang der intrazellulären Menge H_2O_2 (Abb. 49).

Diese Erkenntnisse schließen allerdings nicht aus, dass die Signale, die durch die Zugabe von $25\mu\text{M}$ H_2O_2 induziert werden, durch Schäden beispielsweise der mt DNA hervorgerufen werden. Etwas wahrscheinlicher scheint allerdings, dass die Anwesenheit von H_2O_2 oder die Aktivierung der Enzyme, die H_2O_2 abbauen, allgemein zu einer Signalreaktion der Zelle führt.

F Abkürzungen

8-OH-dG	8-Hydroxy-Desoxyguanosin
8-OH-dA	8-Hydroxy-Desoxyadenosin
aa	Aminosäure
Abb	Abbildung
APE1	Apurinic Endonuclease 1
APS	Ammoniumpersulfat
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Common-Deletion
cm	Zentimeter
CSA	Cockayne-Syndrome-A
CSB	Cockayne-Syndrome-B
CSN	COP9-Signalosom
CUL4A	Cullin4A
(k)Da	(Kilo)Dalton
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DDB1	DNA-damage binding protein 1
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur (double-strand-break-repair)
ERCC1-8	Excision-repair-cross-complementing protein 1-8
evtl.	eventuell
FACS	Fluorescence-activated-cell-sorting
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOXO3A	Forkhead box O3
g	Gramm
G	Gauge
GSH	Glutathion
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

Abkürzungen

HAT p300	Histon-Acetyltransferase p300
HMGN1	high mobility group nucleosome binding domain 1
hOGG1	8-oxo-dG-glycosylase/apurinic lyase
HRP	Meerrettichperoxidase
IS	interner Standard
J/cm ²	Joule pro Quadratcentimeter
kg	Kilogramm
ko	knockout
l	Liter
MEM	Minimal essential Medium
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minuten
mIS	muriner interner Standard
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MMR	Mismatchreparatur
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
mt	mitochondrial(e)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
nm	Nanometer
Nr	Nummer
OH·	Hydroxyl-Radikal
%	Prozent
p53	Protein 53
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCNA-RPF	Proliferating cell nuclear antigen - replication-factor-c
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI	Propidiumiodid
POL I-III	RNA-Polymerase I-III

Abkürzungen

Pol γ	Polymerase γ
PSU1, und	Pseudo-U1-RNA-gene locus
RN5S	rRNA-5S-gene locus
RNU1	small nuclear RNA U1- gene locus
RNU2	small nuclear RNA U2 gene locus
ROC1	Ring-box1
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPA	Replication Protein A
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecylsulphat
SSBR	Einzelstrangbruchreparatur (single-strand-break-repair)
SOD	Superoxid-Dismutase
Tab	Tabelle
TAE	Tris-acetic-acid-EDTA-buffer
Taq-Polymerase	Thermophilus-aquaticus-Polymerase
TBS-(T)	Tris-buffered-Saline-(mit Tween)
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TFIIS	Transkriptions-Elongationsfaktor IIS
TLR2	Toll-like-receptor 2
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UVA/UVB	ultraviolett-A oder B
V	Volt
W	Woche
WT	Wildtyp
XAB2	XPA-binding protein
XPA-XPG	Xeroderma Pigmentosum A-G
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
z.B.	zum Beispiel

Tab. 14 Abkürzungen

G Quellenangaben

1. B. J. Willcox *et al.*, FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13987 (Sep 16, 2008).
2. A. Brunet *et al.*, Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* **303**, 2011 (Mar 26, 2004).
3. C. B. Harley, A. B. Futcher, C. W. Greider, Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458 (May 31, 1990).
4. C. Martin-Ruiz *et al.*, Stochastic variation in telomere shortening rate causes heterogeneity of human fibroblast replicative life span. *J Biol Chem* **279**, 17826 (Apr 23, 2004).
5. F. d'Adda di Fagagna *et al.*, A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194 (Nov 13, 2003).
6. D. Harman, Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**, 298 (Jul, 1956).
7. K. Staniek, H. Nohl, Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* **1460**, 268 (Nov 20, 2000).
8. K. B. Beckman, B. N. Ames, Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* **272**, 19633 (Aug 8, 1997).
9. D. F. Bogenhagen, Repair of mtDNA in vertebrates. *Am J Hum Genet* **64**, 1276 (May, 1999).
10. D. Kang, N. Hamasaki, Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med* **41**, 1281 (Oct, 2003).
11. I. Fridovich, Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell* **3**, 13 (Feb, 2004).
12. P. Schroeder, I. Hertel, M. Schneider, J. Krutmann, The effect of processed water on constitutive and ultraviolet-A-radiation-induced level of mitochondrial DNA mutations in human dermal fibroblasts. *Skin Pharmacol Physiol* **20**, 116 (2007).
13. Z. Yu, J. Chen, B. N. Ford, M. E. Brackley, B. W. Glickman, Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen* **33**, 3 (1999).
14. A. Y. Andreyev, Y. E. Kushnareva, A. A. Starkov, Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 200 (Feb, 2005).
15. A. Trifunovic *et al.*, Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417 (May 27, 2004).
16. A. Trifunovic *et al.*, Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17993 (Dec 13, 2005).
17. D. C. Wallace, Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science* **256**, 628 (May 1, 1992).
18. Y. H. Wei, Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat Res* **275**, 145 (Sep, 1992).
19. M. A. Birch-Machin, M. Tindall, R. Turner, F. Haldane, J. L. Rees, Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging. *J Invest Dermatol* **110**, 149 (Feb, 1998).
20. H. Koch, K. P. Wittern, J. Bergemann, 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 (Oct, 2001).
21. M. Berneburg *et al.*, Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin. *J Invest Dermatol* **122**, 1277 (May, 2004).
22. M. Berneburg *et al.*, Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 15345 (May 28, 1999).
23. S. M. Tanhauser, P. J. Laipis, Multiple deletions are detectable in mitochondrial DNA of aging mice. *J Biol Chem* **270**, 24769 (Oct 20, 1995).

24. S. Mita *et al.*, Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* **18**, 561 (Feb 11, 1990).
25. H. K. Warnk, Das Auftreten der 4977 bp Deletion der mitochondrialen DNA in menschlichem Herzmuskelgewebe in Abhängigkeit vom Lebensalter und chronischer Hypoxie Universität zu Lübeck (2006).
26. T. Ozawa, Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases. *Biochim Biophys Acta* **1271**, 177 (May 24, 1995).
27. J. H. Hou, Y. H. Wei, The unusual structures of the hot-regions flanking large-scale deletions in human mitochondrial DNA. *Biochem J* **318 (Pt 3)**, 1065 (Sep 15, 1996).
28. C. Kielbassa, L. Roza, B. Epe, Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* **18**, 811 (Apr, 1997).
29. J. Cadet, E. Sage, T. Douki, Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* **571**, 3 (Apr 1, 2005).
30. G. R. Aitken, J. R. Henderson, S. C. Chang, C. J. McNeil, M. A. Birch-Machin, Direct monitoring of UV-induced free radical generation in HaCaT keratinocytes. *Clin Exp Dermatol* **32**, 722 (Nov, 2007).
31. G. T. Wondrak, M. K. Jacobson, E. L. Jacobson, Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection. *Photochem Photobiol Sci* **5**, 215 (Feb, 2006).
32. A. Valencia, I. E. Kochevar, Nox1-based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **128**, 214 (Jan, 2008).
33. J. Wehner, G. Horneck, Effects of vacuum UV and UVC radiation on dry E. coli plasmid pUC19. I. Inactivation, lacZ- mutation induction and strand breaks. *J Photochem Photobiol B* **28**, 77 (Apr, 1995).
34. M. Folkard, K. M. Prise, C. J. Turner, B. D. Michael, The production of single strand and double strand breaks in DNA in aqueous solution by vacuum UV photons below 10 eV. *Radiat Prot Dosimetry* **99**, 147 (2002).
35. R. P. Sinha, D. P. Hader, UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* **1**, 225 (Apr, 2002).
36. S. Mouret *et al.*, Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13765 (Sep 12, 2006).
37. A. Poswig *et al.*, Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. *J Invest Dermatol* **112**, 13 (Jan, 1999).
38. Y. K. Lee *et al.*, Role of NF-kappaB-p53 crosstalk in ultraviolet A-induced cell death and G1 arrest in human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res* **304**, 73 (Jan, 2012).
39. T. J. McMillan *et al.*, Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. *J Pharm Pharmacol* **60**, 969 (Aug, 2008).
40. M. Wlaschek *et al.*, Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* **63**, 41 (Oct, 2001).
41. A. Hirota *et al.*, Ultraviolet A irradiation induces NF-E2-related factor 2 activation in dermal fibroblasts: protective role in UVA-induced apoptosis. *J Invest Dermatol* **124**, 825 (Apr, 2005).
42. J. Shin, J. H. Kim, E. K. Kim, Repeated exposure of human fibroblasts to UVR induces secretion of stem cell factor and senescence. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, (Sep 20, 2011).
43. W. J. Kleijer *et al.*, Incidence of DNA repair deficiency disorders in western Europe: Xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *DNA Repair (Amst)* **7**, 744 (May 3, 2008).
44. M. Berneburg, A. R. Lehmann, Xeroderma pigmentosum and related disorders: defects in DNA repair and transcription. *Adv Genet* **43**, 71 (2001).
45. R. Groisman *et al.*, CSA-dependent degradation of CSB by the ubiquitin-proteasome pathway establishes a link between complementation factors of the Cockayne syndrome. *Genes Dev* **20**, 1429 (Jun 1, 2006).

46. M. Fousteri, W. Vermeulen, A. A. van Zeeland, L. H. Mullenders, Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo. *Mol Cell* **23**, 471 (Aug, 2006).
47. S. Lagerwerf, M. G. Vrouwe, R. M. Overmeer, M. I. Fousteri, L. H. Mullenders, DNA damage response and transcription. *DNA Repair (Amst)* **10**, 743 (Jul 15, 2011).
48. T. Nospikel, DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* **66**, 994 (Mar, 2009).
49. J. Bradsher *et al.*, CSB is a component of RNA pol I transcription. *Mol Cell* **10**, 819 (Oct, 2002).
50. X. Yuan, W. Feng, A. Imhof, I. Grummt, Y. Zhou, Activation of RNA polymerase I transcription by cockayne syndrome group B protein and histone methyltransferase G9a. *Mol Cell* **27**, 585 (Aug 17, 2007).
51. A. Lebedev, K. Scharffetter-Kochanek, S. Iben, Truncated Cockayne syndrome B protein represses elongation by RNA polymerase I. *J Mol Biol* **382**, 266 (Oct 3, 2008).
52. L. Proietti-De-Santis, P. Drane, J. M. Egly, Cockayne syndrome B protein regulates the transcriptional program after UV irradiation. *Embo J* **25**, 1915 (May 3, 2006).
53. K. J. Kyng *et al.*, The transcriptional response after oxidative stress is defective in Cockayne syndrome group B cells. *Oncogene* **22**, 1135 (Feb 27, 2003).
54. A. Yu, H. Y. Fan, D. Liao, A. D. Bailey, A. M. Weiner, Activation of p53 or loss of the Cockayne syndrome group B repair protein causes metaphase fragility of human U1, U2, and 5S genes. *Mol Cell* **5**, 801 (May, 2000).
55. J. C. Newman, A. D. Bailey, A. M. Weiner, Cockayne syndrome group B protein (CSB) plays a general role in chromatin maintenance and remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9613 (Jun 20, 2006).
56. X. W. Wang *et al.*, p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* **10**, 188 (Jun, 1995).
57. S. Filippi *et al.*, CSB protein is (a direct target of HIF-1 and) a critical mediator of the hypoxic response. *Embo J* **27**, 2545 (Oct 8, 2008).
58. P. Latini *et al.*, CSA and CSB proteins interact with p53 and regulate its Mdm2-dependent ubiquitination. *Cell Cycle* **10**, 3719 (Nov 1, 2011).
59. E. S. Fischer *et al.*, The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell* **147**, 1024 (Nov 23, 2011).
60. D. B. Bregman *et al.*, UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11586 (Oct 15, 1996).
61. Z. Luo, J. Zheng, Y. Lu, D. B. Bregman, Ultraviolet radiation alters the phosphorylation of RNA polymerase II large subunit and accelerates its proteasome-dependent degradation. *Mutat Res* **486**, 259 (Sep 4, 2001).
62. J. Tuo, P. Jaruga, H. Rodriguez, V. A. Bohr, M. Dizdaroglu, Primary fibroblasts of Cockayne syndrome patients are defective in cellular repair of 8-hydroxyguanine and 8-hydroxyadenine resulting from oxidative stress. *Faseb J* **17**, 668 (Apr, 2003).
63. J. Tuo, C. Chen, X. Zeng, M. Christiansen, V. A. Bohr, Functional crosstalk between hOgg1 and the helicase domain of Cockayne syndrome group B protein. *DNA Repair (Amst)* **1**, 913 (Nov 3, 2002).
64. Y. Kamenisch *et al.*, Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. *J Exp Med* **207**, 379 (Feb 15, 2010).
65. H. K. Wong *et al.*, Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates. *Nucleic Acids Res* **35**, 4103 (2007).
66. M. D. Aamann *et al.*, Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane. *Faseb J* **24**, 2334 (Jul, 2010).
67. M. Berneburg *et al.*, Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J Biol Chem* **274**, 15345 (May 28, 1999).

68. H. Koch, K. P. Wittern, J. Bergemann, 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 (Oct, 2001).
69. M. Lebel, N. C. de Souza-Pinto, V. A. Bohr, Metabolism, genomics, and DNA repair in the mouse aging liver. *Curr Gerontol Geriatr Res* **2011**, 859415 (2011).
70. L. A. Esposito, S. Melov, A. Panov, B. A. Cottrell, D. C. Wallace, Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4820 (Apr 27, 1999).
71. J. Milano, B. J. Day, A catalytic antioxidant metalloporphyrin blocks hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage. *Nucleic Acids Res* **28**, 968 (Feb 15, 2000).
72. J. Hoelijmakers, personal communication.
73. J. Segovia *et al.*, TLR2/MyD88/NF-kappaB pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. *PLoS One* **7**, e29695 (2012).
74. A. W. Linnane, S. Marzuki, T. Ozawa, M. Tanaka, Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* **1**, 642 (Mar 25, 1989).
75. K. Hattori *et al.*, Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: possible contributory factor to presbycardia. *Am Heart J* **121**, 1735 (Jun, 1991).
76. H. C. Lee, C. Y. Pang, H. S. Hsu, Y. H. Wei, Differential accumulations of 4,977 bp deletion in mitochondrial DNA of various tissues in human ageing. *Biochim Biophys Acta* **1226**, 37 (Apr 12, 1994).
77. L. Piko, A. J. Hougham, K. J. Bulpitt, Studies of sequence heterogeneity of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: evidence for an increased frequency of deletions/additions with aging. *Mech Ageing Dev* **43**, 279 (Jun, 1988).
78. M. N. Gadaleta *et al.*, Mitochondrial DNA copy number and mitochondrial DNA deletion in adult and senescent rats. *Mutat Res* **275**, 181 (Sep, 1992).
79. Y. Kamenisch, personal communication.
80. A. Del Roso *et al.*, Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Exp Gerontol* **38**, 519 (May, 2003).
81. J. W. Pak *et al.*, Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. *Ageing Cell* **2**, 1 (Feb, 2003).
82. Y. Kravtsov, E. Nekhaeva, N. B. Bodyak, K. Khrapko, Mutation and intracellular clonal expansion of mitochondrial genomes: two synergistic components of the aging process? *Mech Ageing Dev* **124**, 49 (Jan, 2003).
83. J. H. Yang, H. C. Lee, K. J. Lin, Y. H. Wei, A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin. *Arch Dermatol Res* **286**, 386 (1994).
84. V. Gorbunova, A. Seluanov, Z. Mao, C. Hine, Changes in DNA repair during aging. *Nucleic Acids Res* **35**, 7466 (2007).
85. D. Goukassian *et al.*, Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *Faseb J* **14**, 1325 (Jul, 2000).
86. S. Maynard, S. H. Schurman, C. Harboe, N. C. de Souza-Pinto, V. A. Bohr, Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* **30**, 2 (Jan, 2009).
87. M. Sawada, U. Sester, J. C. Carlson, Changes in superoxide radical formation, lipid peroxidation, membrane fluidity and cathepsin B activity in aging and spawning male Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Mech Ageing Dev* **69**, 137 (Jun, 1993).
88. R. S. Sohal, B. H. Sohal, Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mech Ageing Dev* **57**, 187 (Feb, 1991).
89. C. G. Fraga, M. K. Shigenaga, J. W. Park, P. Degan, B. N. Ames, Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4533 (Jun, 1990).
90. M. L. Hamilton *et al.*, Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10469 (Aug 28, 2001).

91. E. Maklashina, B. A. Ackrell, Is defective electron transport at the hub of aging? *Aging Cell* **3**, 21 (Feb, 2004).
92. H. M. Findeisen *et al.*, Oxidative Stress Accumulates in Adipose Tissue during Aging and Inhibits Adipogenesis. *PLoS One* **6**, (Apr 14, 2011).
93. M. Scheibye-Knudsen *et al.*, Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. *The Journal of experimental medicine* **209**, 855 (Apr 9, 2012).
94. A. M. Cuervo *et al.*, Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* **1**, 131 (Oct-Dec, 2005).
95. E. Bergamini *et al.*, A new method for the investigation of endocrine-regulated autophagy and protein degradation in rat liver. *Exp Mol Pathol* **59**, 13 (Aug, 1993).
96. A. Donati *et al.*, Age-related changes in the autophagic proteolysis of rat isolated liver cells: effects of antiaging dietary restrictions. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56**, B375 (Sep, 2001).
97. K. Mahadev *et al.*, The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. *Mol Cell Biol* **24**, 1844 (Mar, 2004).
98. S. J. Goldman, Y. Zhang, S. Jin, Autophagic degradation of mitochondria in white adipose tissue differentiation. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1971 (May 15, 2011).
99. R. Singh *et al.*, Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 3329 (Nov, 2009).
100. Y. Zhang *et al.*, Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19860 (Nov 24, 2009).
101. M. J. Cartwright *et al.*, Aging, depot origin, and preadipocyte gene expression. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **65**, 242 (Mar, 2010).
102. M. Zamboni *et al.*, Effects of age on body fat distribution and cardiovascular risk factors in women. *Am J Clin Nutr* **66**, 111 (Jul, 1997).
103. W. F. DeNino *et al.*, Contribution of abdominal adiposity to age-related differences in insulin sensitivity and plasma lipids in healthy nonobese women. *Diabetes Care* **24**, 925 (May, 2001).
104. B. H. Goodpaster *et al.*, Association between regional adipose tissue distribution and both type 2 diabetes and impaired glucose tolerance in elderly men and women. *Diabetes Care* **26**, 372 (Feb, 2003).
105. B. H. Goodpaster *et al.*, Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Arch Intern Med* **165**, 777 (Apr 11, 2005).
106. C. Deveaud *et al.*, Site specific alterations of adipose tissue mitochondria in 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT)-treated rats: an early stage in lipodystrophy? *Biochem Pharmacol* **70**, 90 (Jul 1, 2005).
107. A. Cossarizza, C. Mussini, A. Vigano, Mitochondria in the pathogenesis of lipodystrophy induced by anti-HIV antiretroviral drugs: actors or bystanders? *Bioessays* **23**, 1070 (Nov, 2001).
108. Y. N. Harada *et al.*, Postnatal growth failure, short life span, and early onset of cellular senescence and subsequent immortalization in mice lacking the xeroderma pigmentosum group G gene. *Mol Cell Biol* **19**, 2366 (Mar, 1999).
109. V. W. Liu, C. Zhang, P. Nagley, Mutations in mitochondrial DNA accumulate differentially in three different human tissues during ageing. *Nucleic Acids Res* **26**, 1268 (Mar 1, 1998).
110. A. R. Haake, I. Roublevskaia, M. Cooklis, Apoptosis: a role in skin aging? *J Invest Dermatol Symp Proc* **3**, 28 (Aug, 1998).
111. H. C. Lee, Y. H. Wei, Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**, 592 (May, 2007).
112. X. Wang *et al.*, Enhancement of Fas-mediated apoptosis in ageing human keratinocytes. *Mech Ageing Dev* **125**, 237 (Mar, 2004).
113. G. C. Kujoth *et al.*, Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481 (Jul 15, 2005).

-
114. D. E. Godar, UVA1 radiation triggers two different final apoptotic pathways. *J Invest Dermatol* **112**, 3 (Jan, 1999).
 115. J. L. Zhong, A. Yiakouvaki, P. Holley, R. M. Tyrrell, C. Pourzand, Susceptibility of skin cells to UVA-induced necrotic cell death reflects the intracellular level of labile iron. *J Invest Dermatol* **123**, 771 (Oct, 2004).
 116. C. V. Suschek *et al.*, Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* **8**, 515 (May, 2001).
 117. A. Terman, U. T. Brunk, Myocyte aging and mitochondrial turnover. *Exp Gerontol* **39**, 701 (May, 2004).
 118. C. Fleury, B. Mignotte, J. L. Vayssiere, Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **84**, 131 (Feb-Mar, 2002).
 119. P. Dumont *et al.*, Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free Radic Biol Med* **28**, 361 (Feb 1, 2000).
 120. R. Niu, M. Yoshida, F. Ling, Increases in Mitochondrial DNA Content and 4977-bp Deletion upon ATM/Chk2 Checkpoint Activation in HeLa Cells. *PLoS One* **7**, e40572 (2012).
 121. G. Hofhaus, M. Berneburg, M. Wulfert, N. Gattermann, Live now--pay by ageing: high performance mitochondrial activity in youth and its age-related side effects. *Exp Physiol* **88**, 167 (Jan, 2003).
 122. M. Berneburg *et al.*, Creatine supplementation normalizes mutagenesis of mitochondrial DNA as well as functional consequences. *J Invest Dermatol* **125**, 213 (Aug, 2005).
 123. G. P. Bienert, J. K. Schjoerring, T. P. Jahn, Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* **1758**, 994 (Aug, 2006).
 124. V. Danilovich lu, [Interrelation between NO and H₂O₂ formation and their role in the regulation of ion homeostasis of cells]. *Ukr Biokhim Zh* **73**, 5 (May-Jun, 2001).
 125. M. S. Wolin, Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* **3**, 1 (Mar, 1996).
 126. J. Lee, S. Giordano, J. Zhang, Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* **441**, 523 (Jan 15, 2012).
 127. V. L. Kinnula, A. R. Whorton, L. Y. Chang, J. D. Crapo, Regulation of hydrogen peroxide generation in cultured endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**, 175 (Feb, 1992).
 128. H. Masaki, Y. Okano, H. Sakurai, Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H₂O₂ or ultraviolet B light. *Arch Dermatol Res* **290**, 113 (Mar, 1998).

3. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei allen, die zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben danken. Dies sind insbesondere:

Prof. Dr. Mark Berneburg für die Bereitstellung des Themas, die stets gute Zusammenarbeit und die hervorragende Betreuung als Doktorvater.

Prof. Dr. Olaf Rieß für das Erstellen des Zweitgutachtens

Prof. Dr. Martin Röcken für die Möglichkeit der Promotion an der Hautklinik Tübingen.

Dr. York Kamenisch für die praktische Seite der Betreuung, das Troubleshooting im Labor, hilfreiche Diskussionen und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für alles hatte.

Dr. Mehrdad Ghashghaeinia Für die Unterstützung bei der Erstellung der FACS-Daten und ihrer Auswertung, sowie für die aufmunternden Worte und guten Ratschläge.

Dr. Martin Köberle Für die Hilfe bei der Auswertung der FACS-Daten.

Cornelia Grimmel für die FACS-Sort-Arbeiten.

Anna-Katharina von Thaler meiner Freundin und Kollegin, die den Weg zur Doktorarbeit mit mir gemeinsam gegangen ist, für die gute Zusammenarbeit, für viele Gespräche und für die gemeinsame Zeit.

Unsere Nachbarn **Dr. Martin Wille** und **Christine Bosse** für die mannigfaltige Hilfe auch als Babysitter und die gelegentliche Mitfahrgelegenheit.

Meine **Kollegen** im Röntgenweg 13/1 für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Meine **Eltern**, **Schwiegereltern** und meine **Schwestern**, für ihre Unterstützung.

Mein Mann **Patrick Knoch**, der diese Arbeit durch die wunderbare und liebevolle Betreuung unserer Söhne Felix und Samson überhaupt erst möglich gemacht hat. Des Weiteren für seine Liebe, Hilfe, Trost und stete Unterstützung.