

Aus dem
Medizinischen Zentrum für Hygiene und Infektionsbiologie
der Philipps-Universität Marburg
Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Roland Lill

Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer

Kreatinstoffwechsel in humaner Haut

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Humanbiologie
dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Holger Lenz
aus
Wasserlos / Bayern

Marburg 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 9.9.2004.
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer

Koreferent: Prof. Dr. Monika Löffler

*The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can,
Pursuing it with eager feet,
Until it joins some larger way
Where many paths and errands meet.
And wether then? I cannot say.*

Bilbo Baggins

1. Einleitung	1
1.1. <i>Die Haut als Organ</i>	
1.2. <i>Morphologie der Haut</i>	1
1.3. <i>Hautalterung und oxidativer Stress</i>	5
1.3.1. <i>Hautalterung</i>	5
1.3.2. <i>Oxidativer Stress</i>	6
1.4. <i>Energiestoffwechsel</i>	7
1.4.1. <i>Allgemein</i>	7
1.4.2. <i>Kreatinmetabolismus</i>	9
1.4.3. <i>Kreatintransporter</i>	11
1.5. <i>Kreatin</i>	12
1.5.1. <i>Kreatin und Muskel</i>	13
1.5.2. <i>Kreatin und das zentrale Nervensystem (ZNS)</i>	13
1.5.3. <i>Kreatin und Haut</i>	15
1.6. <i>Ziel der Arbeit</i>	15
2. Material	16
2.1. <i>Laborgeräte</i>	16
2.1.1. <i>Großgeräte</i>	16
2.1.2. <i>Kleingeräte</i>	17
2.1.3. <i>UV-Bestrahlungsquellen</i>	19
2.2. <i>Geräte und Materialien für spezielle Arbeiten und Methoden</i>	19
2.2.1. <i>Geräte und Materialien für Zellkulturarbeiten</i>	19
2.2.2. <i>Geräte und Materialien für den Kreatinkinasetest</i>	21
2.2.3. <i>Geräte und Materialien für gelelektrophoretische Arbeiten</i>	21
2.2.4. <i>Geräte und Materialien für histologische Arbeiten</i>	22
2.2.5. <i>Geräte und Materialien für die Elektronenmikroskopie</i>	23
2.2.6. <i>Geräte und Materialien für DNA und RNA Arbeiten</i>	23
2.3. <i>Chemikalien</i>	24
2.3.1. <i>Standard-Chemikalien und Puffer</i>	24
2.3.2. <i>Chemikalien für die Zellkultur</i>	25
2.3.3. <i>Chemikalien für zelluläre Extrakte und Kreatinkinasetest</i>	25
2.3.4. <i>Chemikalien für Elektrophorese- und Blotting-Techniken</i>	26
2.3.5. <i>Chemikalien für die Histologie</i>	26

2.3.6. Chemikalien für die Elektronenmikroskopie	26
2.3.7. Antikörper	27
2.3.8. Chemikalien für DNA und RNA Arbeiten	28
3. Methoden	31
3.1. Sicherheit und Abfallbeseitigung	31
3.2. Zellkultur	31
3.2.1. Isolierung epidermaler Zellsuspensionen aus Hautbiopsien	33
3.2.2. Kultivierung und Subkultivierung epidermaler Primärisolate	33
3.2.3. Kultivierung und Subkultivierung dermaler Fibroblasten	34
3.3. Kreatinkinase-modulierende und begleitende Experimente	34
3.3.1. Inkubation von Keratinozyten, Fibroblasten, HaCats und HeLaS3 mit Kreatin	34
3.3.2. Inkubation von Keratinozyten mit ¹⁴ C-markiertem Kreatin	35
3.3.3. Transfektion von HaCats und HeLaS3 mit siRNAs	35
3.3.3.1. Transfektion von HaCat und HeLaS3 mit siRNA gegen Lamin A/C	37
3.3.3.2. Transfektion von HaCats und HeLaS3 mit siRNA gegen CKb und CKmt	39
3.4. Herstellung zytoplasmatischer Extrakte	39
3.4.1. Herstellung zytoplasmatischer Extrakte aus Monokulturen	40
3.4.2. Herstellung subzellulärer Fraktionen Monokulturen	40
3.4.3. Präparation der Saugblasen aus Epidermis (Suction Blister) und Isolierung epidermaler Zellen	41
3.4.4. Proteinbestimmung mit dem BCA-Test	41
3.5. Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität	42
3.6. Untersuchung verschiedener zellphysiologischer Parameter	44
3.6.1. Bestimmung der Zytotoxizität (LDH)	44
3.6.2. Bestimmung der Zellproliferation (BrdU)	44
3.6.3. Messung der JC-1 Fluoreszenz zur Bestimmung des Mitochondrien-Membran-Potentials ($\Delta\Psi$)	45
3.3.4. Bestimmung der Apoptose (Annexin V)	46
3.7. Western-Blot-Analyse	47
3.7.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.7.2. Halb-Trocken-Blot	48
3.7.3. Immunochemische Detektion	49

3.8. Histologie	50
3.8.1. <i>Anfertigung von Kryostatschnitten</i>	50
3.8.2. <i>Objektträgerbeschichtung</i>	50
3.8.3. <i>Aussaat von Zellen für die Immunzytochemie</i>	51
3.8.4. <i>Fixierung von Kryostatschnitten und Zellen</i>	51
3.8.5. <i>Indirekte Immunchemie</i>	51
3.8.6. <i>Herstellung von Mowiol-Eindeckmedium</i>	53
3.8.7. <i>Bildanalytische Dokumentation</i>	53
3.9. Elektronenmikroskopie	54
3.9.1. <i>Fixierung und Einbettung der Zellen</i>	54
3.9.2. <i>Ultradünnschnitte und Mikroskopie</i>	55
3.10. Reverse-Transkriptase Polymerasen-Ketten-Reaktion	55
3.10.1. <i>Isolierung von Gesamt-RNA</i>	56
3.10.2. <i>Reverse-Transkriptase-Kettenreaktion (RT-PCR)</i>	56
3.10.3. <i>Agarose-Gel-Elektrophorese</i>	58
3.10.4. <i>Isolierung von DNA aus Agarosegelen</i>	59
3.10.5. <i>Restriktions-Verdau</i>	60
4. Ergebnisse	61
4.1. Kreatinkinase und Kreatintransporter in humaner Haut	61
4.1.1. <i>Histologische Untersuchungen</i>	61
4.1.2. <i>Western-Blot-Analyse</i>	64
4.1.3. <i>Kreatin-Aufnahme in vitro</i>	67
4.2. Kreatinkinase-Aktivitäts-Messung	69
4.2.1. <i>Kreatinkinase-Aktivität in verschiedenen Zelltypen</i>	70
4.2.2. <i>Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten</i>	70
4.2.2.1. <i>Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten im Altersvergleich</i>	70
4.2.2.2. <i>Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten nach Inkubation mit Kreatin</i>	71
4.2.2.3. <i>Kreatinkinase-Aktivität in subzellulären Fraktionen</i>	72
4.2.2.4. <i>Kreatinkinase-Aktivität und Inhibition durch Wasserstoffperoxid</i>	74
4.3. Kreatinsynthese in humaner Haut	76
4.3.1. <i>Guanidino-Acetat-Methyl-Transferase (GAMT) in humaner Haut</i>	76
4.3.2. <i>Arginin-Glycin-Amidino-transferase (AGAT) in humaner Haut</i>	78
4.3.3. <i>Inkubation von Keratinozyten mit Guanidinoacetat</i>	78

4.4. RNA-Interferenz Untersuchungen	80
4.4.1. Kreatinkinase in HaCat und HeLaS3	80
4.4.2. Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen Lamin A/C	82
4.4.3. Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen CK-BB und CK-mt	83
4.4.3.1. Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen CK-BB	85
4.4.3.2. Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen CK-mt	87
4.4.3.3. Transfektion von HeLaS3-Zellen mit siRNA gegen CK-BB	89
4.4.3.4. Transfektion von HeLaS3-Zellen mit siRNA gegen CK-mt	91
4.4.3.5. Zytotoxizität (LDH) nach siRNA Transfektion	93
4.4.3.6. Proliferation (BrdU) nach siRNA Transfektion	94
4.4.3.7. Kreatinkinase-Aktivität nach siRNA Transfektion	95
4.4.3.8. Messung der JC-1 Fluoreszenz zur Bestimmung des Mitochondrien-Membran-Potentials nach siRNA Transfektion	96
4.4.3.9. Annexin V-FACS-Analyse nach siRNA Transfektion	97
4.4.3.10. Elektronenmikroskopie nach siRNA Transfektion	100
5. Diskussion	102
5.1. Das Vorkommen des Kreatinkinase-Systems in humaner Haut	102
5.1.1. Immunhistologische Nachweise der Kreatinkinase und des Kreatintransporters	102
5.1.2. Western-Blot-Analyse der Kreatinkinasen und des Kreatintransporters	104
5.1.3. Funktionelle Nachweise des Kreatinkinase-Systems in vitro	104
5.2. Modell des Kreatinkinase-Systems	106
5.2.1. Kreatinkinase-Aktivität und Einfluss freier Sauerstoffspezies (ROS)	109
5.2.2. Protektive Effekte des Kreatins	111
5.2.3. Kreatinsynthese in humaner Haut	113
5.3. Inaktivierung der Kreatinkinase-Expression	114
5.3.1. HaCat- und HeLaS3-Zellen als Modell für das Kreatinkinase- System in primären, humanen Keratinozyten	114
5.3.2. Kreatinkinase-System – überlebenswichtig für die Zelle ?	116
5.3.3. Zytotoxizität und Proliferation nach Transfektion mit siRNAs	117
5.3.4. Apoptotische bzw. nekrotische Prozesse nach Transfektion mit siRNAs	118
5.3.5. Morphologische Beobachtungen nach Transfektion mit siRNAs	120

6. Zusammenfassung	122
---------------------------	------------

7. Literatur	124
---------------------	------------

Anhang

I. Abkürzungsverzeichnis

II. Messdaten

III. Publikationen

IV. Curriculum vitae

V. Akademische Lehrer

VI. Danksagung

1. Einleitung

1.1. Die Haut als Organ

Die Haut (Integumentum commune) des menschlichen Körpers stellt das Abgrenzungsorgan des Organismus zur Umwelt dar und übt als solches zahlreiche lebenswichtige Funktionen aus. Erwachsene verfügen je nach Körpergröße über Haut mit einer Gesamtoberfläche von 1,5 bis 2,0m² und einem Gewicht zwischen 5 und 10kg, welches ca. einem Sechstel des Körpergewichtes entspricht. Neben ihren Schutzfunktionen vor chemischen, physikalischen, mechanischen und mikrobiologischen Umwelteinflüssen kommt der Haut auch bei immunologischen Prozessen, sowie bei der Regulation des Temperatur-, Elektrolyt- und Wasserhaushaltes, essentielle Bedeutung zu. So tragen das Gluthationredoxsystem und das Cytochrom-P450-System in der Haut zur Entgiftung und zur Abwehr von prooxidativen Prozessen bei. Des Weiteren spielt die Haut eine wichtige Rolle im Vitamin-D-Metabolismus und somit im Kalziumhaushalt. Letztendlich ist sie mit ihren zahlreichen Sinneszellen (Vater-Pacini-Lamellenkörperchen, Meißner-Tastkörperchen, Merkelzellen und freien Nervenendigungen) auch noch das größte Sinnesorgan des Körpers.

1.2. Morphologie der Haut

Morphologisch ist die Haut (s. Abb. 1.2.a) in mehrere Schichten untergliedert: Kutis (Epidermis und Dermis), Tela subcutanea (Subkutis und Unterhaut) und Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel, Drüsen) (Junqueira und Carneiro, 1991). Die Subkutis besteht aus einem lockeren, stark dehnbaren Bindegewebe zwischen Dermis und Muskeln oder Knochen. Sie enthält eingelagerte Fettzellen als Energiespeicher und ist abhängig vom Körperbau wenig bis voluminös ausgeprägt. Ihre Hauptaufgaben sind die Wärmeisolation und der mechanische Schutz (Niedner und Ziegenmeyer, 1992). Sie gehört im engeren Sinne nicht mehr zum Integumentum commune (Junqueira und Carneiro, 1991).

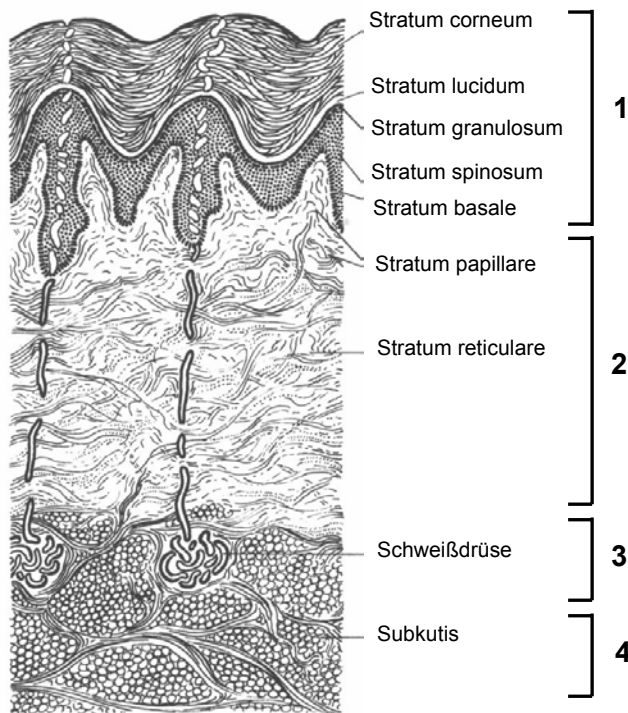


Abb. 1.2.a: Aufbau der Haut

Es ist ein stark vereinfachter Querschnitt durch die Haut dargestellt.

1: Epidermis

2: Dermis

3: Stratum glandulovasculare

4: Subkutis

nach Junqueira und Carneiro, 1991

Die Dermis (s. **2** in Abb. 1.2.a) stellt ein gut durchblutetes Bindegewebe dar, ist je nach Hautareal bis zu drei Millimeter dick, verleiht der Haut hohe Zugfestigkeit und bestimmt während der Entwicklung die Beschaffenheit der angrenzenden Epidermis (**1**). Epidermis und Dermis werden zusammen auch als Kutis bezeichnet. An sie schließt sich das Stratum glandulovasculare (**3**), eine Drüsen- und Gefäßreiche Region, und schließlich die an Fettgewebe reiche Subkutis (**4**) an. Die meisten Sinneszellen und Hautanhangsgebilde (Haare, Fingernägel, Drüsen), bei denen es sich um direkte oder indirekte Ausdifferenzierungen der Epidermis handelt, erstrecken sich über Dermis (z.B. Nervenendkörperchen), Stratum glandulovasculare (z.B. Drüsen, wie die auch als Knäueldrüsen bezeichnete Schweißdrüsen) und Subkutis (z.B. Haare und Vater-Pacini-Körper). Die Dermis ist durch die Basalmembran fest mit der Epidermis verbunden und übernimmt durch ihre ausgedehnten Gefäßnetze (Rete arteriosum subpapillare, Rete arteriosum dermidis) die Versorgung der gefäßfreien Epidermis durch Diffusionsprozesse. Die Dermis gliedert sich hierbei in folgende Schichten:

- **Stratum papillare**
- **Stratum reticulare**

Diese beiden Schichten weisen einen hohen Gehalt an wasserbindenden Glykosaminoglykanen (insbesondere Hyaluronsäure) auf. Die Dermis enthält neben den ortsständigen (Fibroblasten, Fibrozyten) auch freie (Leukozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Mastzellen) Bindegewebszellen. Hierbei sind Fibroblasten und deren ruhende Form, die Fibrozyten, für Faserbildung (Kollagene, retikuläre und elastische Fasern) und die Synthese von Grundsubstanzen (Glykosaminoglykane) verantwortlich. Dazu kommt, verstärkt im Alter, auch die Aufgabe des Faserabbaus (Kollagenasen) hinzu. Freie Bindegewebszellen stehen dagegen in erster Linie im Dienst der Immunantwort.

Das dünnere **Stratum papillare** besteht aus lockerem Bindegewebe und erleichtert durch die Verzahnung mit der Epidermis deren Nährstoffversorgung. Auffälligstes Strukturmerkmal des **Stratum reticulare** ist das faserige Netzwerk aus einzelnen, ineinander verwobenen Kollagenfaserbündeln (Kollagen Typ I). In geringem Umfang kommen auch Elastin- und Retikulinfasern vor. Dies gewährleistet zum einen die hohe Zugfestigkeit der Haut und zum anderen werden darüber ihre elastischen Eigenschaften vermittelt.

Die Epidermis (s. Abb. 1.2.b) stellt dagegen als äußerste Schicht die eigentliche Schutzhülle gegenüber der Umwelt dar. Bei ihr handelt es sich um ein mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel, welches je nach Hautareal eine Dicke von 0,04 bis 1,5mm aufweist und aus vier bis fünf lichtmikroskopisch unterscheidbaren Schichten aufgebaut ist. Diese Schichten stellen die verschiedenen Differenzierungsstadien epidermaler Zellen ektodermalen Ursprungs, der Keratinozyten, dar und verleihen der Epidermis ihre typische Morphologie.

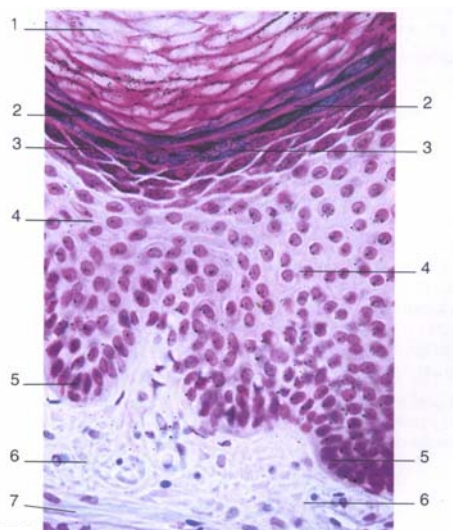


Abb. 1.2.b: Aufbau der Epidermis

Es ist eine Hämalaun-Eosin-Färbung der Epidermis dargestellt.

- 1:** *Stratum corneum*
- 2:** *Stratum lucidum*
- 3:** *Stratum granulosum*
- 4:** *Stratum spinosum*
- 5:** *Stratum basale*
- 6:** *Stratum papillare*
- 7:** *Stratum reticulare*

nach Kühnel, 1995

Die fünf funktionell unterschiedlichen Schichten lassen sich von basal nach apikal wie folgt unterscheiden:

- **Stratum basale**
- **Stratum spinosum**
- **Stratum granulosum**
- **Stratum lucidum**
- **Stratum corneum**

Das **Stratum basale** besteht aus kubischen bis hochprismatischen, mitotisch hochaktiven Keratinozyten. Aus ihnen erfolgt innerhalb von ca. 30 Tagen die Regeneration des epidermalen Gewebes. Hierbei wird zwischen Stammzellen und sogenannten „transient amplifying cells“ unterschieden (Barrandon, 1993; Fuchs und Serge, 2000). Stammzellen haben eine hohe Zellteilungsfähigkeit und können zu verschiedenen Zellen differenzieren. Die „transient amplifying cells“ gehen aus ihnen hervor und sind, auch wenn sie eine niedriger Zellteilungsfähigkeit besitzen, die größte Gruppe sich teilender Zellen.

Die basalen Keratinozyten exprimieren niedermolekulare Intermediärfilamente (Zytokeratine) und sind untereinander über Desmosomen sowie über Hemidesmosomen und Wurzelfüßchen mit der Grenzschicht zur Dermis, der Basalmembran, verbunden. Daneben stehen auch die, im Vergleich zu den Keratinozyten, etwas größeren Melanozyten, die über die Bildung des Pigmentes Melanin Einfluß auf Hautfarbe und UV-Schutz nehmen, mit der Basalmembran in Verbindung. T-Lymphozyten und Merkelzellen (Tastsinnvermittler, die mit den Nervenfasern verbunden sind) sind ebenfalls in dieser Schicht der Epidermis anzutreffen.

Für das stachelartige Aussehen der Stachelzellschicht (**Stratum spinosum**), in der mitotisch wenig aktive, polygonale Keratinozyten vorkommen, sind desmosomale Kontakte zwischen den Zellen und zahlreiche Zytoplasmaausläufer verantwortlich. Langerhanszellen, aus dem Knochenmark eingewanderte Zellen des Immunsystems, sind überwiegend im tiefen Stratum spinosum lokalisiert.

Im **Stratum granulosum** finden sich abgeflachte Zellen mit degenerativen Kernveränderungen und wenigen Organellen. Kennzeichnend für diese Schicht ist allerdings das Vorkommen von Tonofibrillen sowie Keratohyalin und vor allem

membranumschlossener Granula, deren Inhaltsstoffe (Glycosylceramide, Cholesterin, freie Fettsäuren) entscheidende Bedeutung in den Barriereeigenschaften der oberen Hautschichten, sowie im Desquamationsprozess haben. Keratohyalin granula sind dagegen aggregierte Intermediärfilamente (z.B. Cytokeratine und das histidinreiche Filagrin) verbunden mit basischen, intermediärfilament-bindenden Proteinen.

Das Auftreten des **Stratum lucidum** ist charakteristisch für eine extrem dicke Epidermis. Es zeichnet sich lichtmikroskopisch durch seine homogene Eosinophile und das Fehlen subzellulärer Kompartimente aus.

Das **Stratum corneum** besteht aus stark abgeflachten Keratinozyten, die sich im Differenzierungsprozess zu Hornschuppen ohne Zellbestandteile umgestaltet haben.

1.3. Hautalterung und oxidativer Stress

1.3.1. Hautalterung

Auch wenn die Faltenbildung eines der am deutlichsten sichtbaren Merkmale der Hautalterung darstellt, lassen sich noch zahlreiche andere Veränderungen mit fortschreitendem Alter beobachten (Gilchrist, 1996). Neben dem Verlust der Elastizität (s. unten) der Haut, flacht z.B. auch die Verzahnung der Epidermis und Dermis im Stratum papillare ab. Die Zellproliferation und damit die Erneuerung der Epidermis verlangsamt sich, was zudem eine Vergrößerung der Keratinozyten zu Folge hat. Zudem nimmt die Gefäßversorgung der Haut mit zunehmendem Alter ab (Chung *et al.*, 2002).

Für den Prozess der Hautalterung ist nicht allein das Lebensalter ausschlaggebend. Hinsichtlich des Erscheinungsbildes und der Funktion der Haut im Alter kommt vielmehr dem Wechselspiel verschiedener intrinsischer und extrinsischer Faktoren eine wesentliche Bedeutung zu. Als endogene Quellen sind hier vor allem die Mitochondrien (Sohal, 1991) und als exogene Noxen Ozon (Thiele *et al.*, 1997) und UV-Licht (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997) über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu nennen.

Der Schädigung von mitochondrialen Protein-Komplexen und Enzymen sowie von Membranen und DNA, durch ROS - sowohl intrinsisch verursacht, als auch durch

UV-Licht hervorgerufen („Lichtalterung“) - wird eine entscheidende Rolle im Alterungsprozess beigemessen (Harman, 1956). Steigende ROS-Konzentrationen führen zu verstärkten Redox-Signalen und letztlich zur Aktivierung von spezifischen Zielgenen, wie z.B. Matrixmetalloproteinasen, welche dermale Kollagenbündel abbauen und dadurch einen Beitrag zur Bildung von Falten leisten (Fisher *et al.*, 1997).

Daneben vermehrt sich im Alter die Zahl der Kollagenquervernetzungen und die Anzahl an elastischen Fasern und deren Dehnbarkeit verringert sich deutlich. Zudem führt die Abnahme des Gehaltes an Glykosaminoglykanen zur Flüssigkeitsverarmung der Haut und trägt neben den oben genannten Veränderungen entscheidend zur Bildung von Falten bei.

1.3.2. Oxidativer Stress

Die negativen Auswirkungen von vermehrt entstehenden ROS auf die Zelle bezeichnet man auch als oxidativen Stress. Ursache für die stärkere Bildung von ROS ist ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antioxidativen Prozessen. Neben den negativen Folgen spielen ROS, in bestimmten Konzentrationen, aber auch eine Rolle als Signalmoleküle in der Signaltransduktion (Kimata und Hirata, 1999; Finkel, 2000) und können zudem proliferationssteigernde Wirkung haben (Kim *et al.*, 2001).

Der Begriff ROS umfasst sowohl radikalische als auch nicht-radikalische Sauerstoffverbindungen, die insgesamt aufgrund ihrer Reaktivität von großer Bedeutung für biologische Systeme sind und jeweils an der Entstehung anderer ROS beteiligt sein können (Sies, 1986). Die wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies, nach abnehmender Reaktivität geordnet, sind: $\text{OH}^\cdot > {}^1\text{O}_2 > \text{H}_2\text{O}_2 > \text{O}_2^{\cdot-}$.

Zur Vermeidung langfristiger Schäden durch oxidativen Stress müssen zelluläre Oxidationsprodukte beseitigt werden. Zu den Schutzmechanismen zählen eine Reihe enzymatischer und nicht-enzymatischer, antioxidativer Systeme, die in der Epidermis, als direkte Barriere zur Umwelt, in vergleichsweise höherer Konzentration vorkommen als in der Dermis (Vessey, 1993). Zu den nichtenzymatischen Antioxidantien in der Haut zählen sowohl hydrophile (reduziertes Gluthation, Ascorbinsäure) als auch lipophile (α -Tocopherol, Ubichinon) Moleküle. Unter den

enzymatischen Antioxidantien der Haut sind vor allem das enzymatische Glutathionsystem (Glutathion-Peroxidase, -Reduktase, -Transferase), die Superoxiddismutasen und die in den Peroxisomen lokalisierte Katalase von Bedeutung (Pugliese, 1998).

Diese antioxidativen Reaktionswege sind zum Teil über Energiestoffwechselwege eng miteinander verbunden. Reduktionsäquivalente, die in redoxmodulierenden Abwehrmechanismen erforderlich sind, werden in Form von NADH aus dem Energiestoffwechsel bereitgestellt.

1.4. Energiestoffwechsel

1.4.1. Allgemein

Der Energiebedarf der Zellen wird durch die Oxidation biologischer Moleküle bereitgestellt. Die aus der Nahrung aufgenommenen Proteine, Fette und Kohlenhydrate werden dabei an unterschiedlichen Stellen in den Energiestoffwechsel eingeschleust (Alberts *et al.*, 1994; Koolman und Röhm, 1994).

Die aus dem Abbau von Proteinen gewonnenen Aminosäuren können hierbei über 2-Oxoglutarat, Succinyl-CoA, Fumarat, Oxalacetat, Pyruvat oder Acetyl-CoA in den Zitratzyklus gelangen.

Die Fette als die wichtigste Energiereserve des tierischen Organismus. Die aus dem Fettgewebe nach Lipolyse durch das hormonsensitive Enzym Lipase freigesetzten Fettsäuren werden schließlich in die Mitochondrien der Zellen energieverbrauchender Organe (mit Ausnahme des Gehirns) eingeschleust. Dort findet die β -Oxidation der Fettsäuren statt, bei der die Fettsäuren sukzessive zu Acetyl-CoA abgebaut werden, welches wiederum in den Zitratzyklus eingeschleust werden kann.

Kohlenhydrate werden zunächst in der unter anaeroben Bedingungen stattfindenden Glycolyse zu Pyruvat, um dann schließlich auch in den Zitratzyklus eingespeist zu werden. In der in mehreren Schritten ablaufenden Glykolyse wird ein Molekül Glucose, nach Phosphorylierung zu Glucose-6-phosphat, zu 2 Molekülen Pyruvat abgebaut, welches dann über Oxalacetat bzw. Acetyl-CoA in den Zitratzyklus gelangt.

Dabei werden schon sowohl zwei Reduktionsäquivalente in Form von NADH als auch Energie als Adenosintriphosphat (zwei ATP) gewonnen. Als Nebenweg der Glykolyse ist noch der Pentose-Phosphat-Weg zu erwähnen, der nicht nur Reduktionsäquivalente (zwei NADPH), sondern auch die für die DNA-Synthese wichtigen Ribosen (Ribose-5-phosphat) liefert. In den meisten Zellen werden weniger als 10% des Glucose-6-phosphats über den Pentose-Phosphat-Weg abgebaut.

Der wie die Glykolyse in mehreren Schritten ablaufende Zitratzyklus dient als Hauptquelle von Reduktionsäquivalenten wie NADH und FADH_2 und reduziert das aus den oben geschilderten Abbauwegen eingeschleuste Acetyl-CoA (ebenso wie die oben erwähnten anderen, eingeschleusten Zitratzyklus-Zwischenprodukte) schließlich zu Kohlendioxid. Aus ein Acetyl-CoA werden hierbei zwei Moleküle Kohlendioxid freigesetzt. Die Reduktionsäquivalente werden letztlich im Mitochondrium bei dem Prozess der oxidativen Phosphorylierung benötigt. Unter Verbrauch von Sauerstoff und Reduktionsäquivalenten wird über die Mitochondrienmembran ein Protonengradient aufgebaut, welcher dann zur Gewinnung von ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und Phosphat dient. Der Sauerstoff wird hierbei zu Wasser reduziert. Verantwortlich für die oxidative Phosphorylierung ist die so genannte Elektronentransportkette, welche aus drei Proteinkomplexen (I, III, IV), die in die innere Mitochondrienmembran integriert sind, beweglichen Überträgermolekülen (Cytochrom c und Ubichinon) und der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), welche eigentlich Bestandteil des Zitratzyklus ist, aufgebaut ist. Das ATP wird dann von der ATP-Synthase aus ADP unter Ausnutzung des in der Elektronentransportkette aufgebauten Protonengradienten gewonnen.

Das gewonnene ATP hat jeweils eine energiereiche Bindung zwischen den beiden endständigen Phosphaten. Die durch Abspaltung der Phosphatgruppen freiwerdende Energie kann für alle energieverbrauchenden Prozesse (Biosynthese, enzymatische Aktivität, Zellteilung, Muskelkontraktion, usw.) eingesetzt werden. Dadurch dient ATP der Zelle als so genannte „Energiewährung“ und ermöglicht die Durchführung ihrer spezifischen Funktionen.

1.4.2. Kreatinmetabolismus

Der Kreatinmetabolismus unterscheidet sich von den anderen Stoffwechselwegen vor allem dadurch, dass zur Energiegewinnung bzw. Energiespeicherung nur ein einziger Reaktionsschritt notwendig ist (s. Abb. 1.4.2.a).

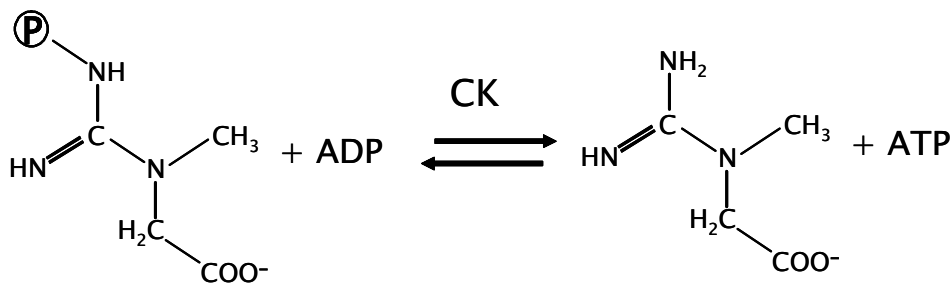


Abb. 1.4.2.a: Kreatinmetabolismus

Es ist die Umsetzung von Phosphokreatin und Adenosindiphosphat ADP (links) durch das Enzym Kreatinkinase (CK) in Kreatin und Adenosintriphosphat ATP (rechts) dargestellt.

Zur Speicherung von Energie wird Kreatin unter Verbrauch von ATP durch das Enzym Kreatinkinase (CK) phosphoryliert. Die dadurch entstandene energiereiche Bindung des Phosphokreatins kann zur Energiegewinnung wiederum durch die CK eingesetzt werden und somit erneut ATP bilden. Durch die in nur einem Schritt ablaufende Reaktion stellt Phosphokreatin somit im Gegensatz zur Gewinnung von ATP aus dem sehr komplexen Prozess der Oxidativen Phosphorylierung (s. 1.4.1.) einen schnell verfügbaren Energiespeicher dar.

Die durch die Kreatinkinase bereitgestellte Energie wird unter anderem für die Kontraktion von Skelett- und Herzmuskeln, sowie für die Aufrechterhaltung des internen Zellmilieus durch energetische Versorgung von Ionenpumpen (Kalzium- und Natrium/Kalium-Pumpen; Guerrero, 1997) benötigt. Hierbei stellt die CK an Ort und Stelle des Energieverbrauchs durch Bildung von ATP die benötigte Energie zur Verfügung.

Je nach Gewebe liegen verschiedene Isoenzyme der zytosolischen CK jeweils als Dimer vor. Im Muskel ist die sarkomerische CK-MM (M steht für englisch „muscle type“), in verschiedenen anderen Geweben, einschließlich dem Gehirn, die ubiquitäre CK-BB (B steht für englisch „brain type“) und im Herzen die heterodimere CK-MB vertreten (Eppenberger *et al.*, 1967). Ferner existieren zwei oktamere, mitochondriale

Isoformen: die ubiquitäre und die sarkomere CK-mt (Schlegel *et al.*, 1988 und 1990). Die Kreatinkinasen gehören zur Familie der Guanidino Kinasen (ATP: Guanidino-phosphotransferase). Die Monomere haben dabei eine Molekülgröße von ca. 40kDa. Neben den bereits erwähnten Lokalisationen konnte vor kurzem die CK-BB auch in der Haut nachgewiesen werden (Schlattner *et al.*, 2002).

Sowohl die zytosolischen als auch die mitochondrialen Kreatinkinasen dienen der Energiebereitstellung aus Phosphokreatin bzw. der Energiespeicherung durch Phosphorylierung von Kreatin. Daneben haben zytosolische und mitochondriale Kreatinkinasen aber noch unterschiedliche Bedeutungen im Energiestoffwechsel (s. Abb. 1.4.2.b).

Die CK-mt ist in den Cristae und dem Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Die CK-mt als ein peripheres Membranprotein bindet hier in ihrer oktameren Form an die Transmembranproteine Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) in der inneren Membran und an Porin in der äußeren Membran (Brdiczka *et al.*, 1994, Wallimann *et al.*, 1998, Dolder *et al.*, 2001). Während die oktamere CK-mt stabilisierend auf den Komplex mit ANT und Porin wirkt, kann das Dimer dieses nicht bewerkstelligen. Ferner gibt es Hinweise, dass Kreatin als Substrat wiederum das Gleichgewicht von Dimer und Oktamer Richtung Oktamer verschiebt (O’Gorman *et al.*, 1997).

Die Funktion der zytosolischen CK (CK_c) besteht dahingegen vor allem in der Energiebereitstellung. Allerdings kommt die CK nicht nur frei im Zytosol vor, sondern kann auch mit anderen Enzymen assoziiert (CK_a) vorliegen. Ein Beispiel hierfür ist das sarkoplasmatische Retikulum, bei dem es funktionell verbundene Mikrokompimente mit der Myosin-ATPase und der SR-Ca²⁺-ATPase bildet. So kann ATP durch CK_a direkt aus Phosphokreatin gebildet und damit die lokale ATP-Konzentration in direkter Umgebung dieser ATPasen hoch gehalten werden (Wallimann *et al.*, 1998) Neben solchen Stellen mit hohem Energieverbrauch (z.B. auch Ionenpumpen, wie die Na,K-ATPase; Guerrero *et al.*, 1997), kann die CK auch an Orten mit energieproduzierenden Prozessen, wie z.B. in den Mitochondrien (s. oben) auftreten. Auf diese Weise kann das Phosphokreatin als „Shuttle“ zwischen Energiebildung und -verbrauch dienen (Wallimann *et al.*, 1992).

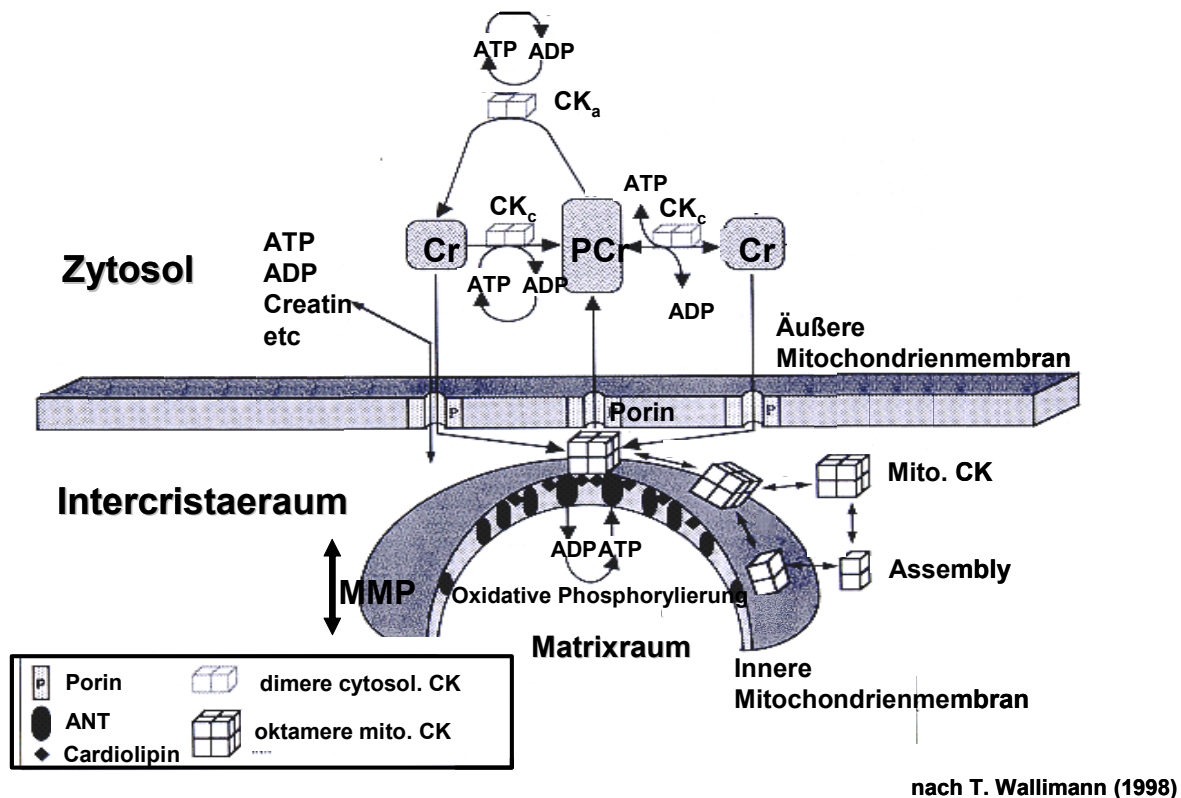


Abb. 1.4.2.b : Intrazelluläre Lokalisation und Funktion der Kreatinkinase

Die schematische Darstellung der intrazellulären Lokalisation der Kreatinkinasen CK-BB und CK-mt und deren Funktion im Energiestoffwechsel sind dargestellt.

1.4.3. Kreatintransporter

Die Sequenz des Kreatintransporters CT besteht aus 635 Aminosäuren (ca. 70,5kDa) und enthält 12 Transmembrandomänen (Guimbal und Kilimann, 1993), welche denen der anderen Mitglieder der GABA/Taurin-Familie ähnlich sind. Der CT ist in der Plasmamembran lokalisiert (Murphy *et al.*, 2001). Zudem ist er Natrium- und Chlorid- abhängig und für Kreatin spezifisch, auch wenn die Erkennungssequenz bislang unbekannt ist. Die Spezifität lässt sich gut mit einem kompetitiven Inhibitor, der Guanidinopropionsäure GPA, zeigen (Guimbal und Kilimann, 1993).

Die Regulation der Aktivität des Transporters erfolgt im Zeitraum von Minuten bis Stunden durch die extrazelluläre Konzentration von Kreatin, aber auch durch Faktoren, welche die Natrium-Konzentration beeinflussen. Der Mechanismus durch

den die Aktivität des CT beeinflusst wird, ist hierbei noch ungeklärt. Eine langfristige Regulation über Tage bis hin zu Wochen kann durch die Anzahl der exprimierten CT-Proteine geschehen (Guerrero-Ontiveros und Wallimann, 1998). So gibt es Hinweise, dass über längere Zeit erhöhte, extrazelluläre Kreatinspiegel zu einer verminderten Aufnahme von Kreatin führen (Harris *et al.*, 1992).

Der CT wird in verschiedenen Geweben, wie z.B. Herz, Zerebellum, Skelettmuskulatur, Niere und Leber exprimiert. In anderen Geweben (Plazenta, Lunge, Retina, Pankreas, Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Ovar, Dünn- und Dickdarm) kann zwar mRNA, aber kein funktioneller CT nachgewiesen werden (Guimbal und Kilimann, 1993; Nash *et al.*, 1994). Erst kürzlich konnte der Kreatintransporter auch in der humanen Haut als Protein nachgewiesen werden (Schlattner *et al.*, 2002).

1.5. Kreatin

Kreatin ist schon seit mehr als 170 Jahren bekannt und wurde 1834 von Chevreul als Bestandteil von Fleischbrühe entdeckt. Justus von Liebig wies 1847 dann Kreatin methodisch zuverlässig nach. Kreatin, als körpereigene Substanz, ist in einer Person von 70kg mit einer Menge von ca. 120g, überwiegend in Skelettmuskeln, Herz und Gehirn, vorhanden. Die Hälfte des täglichen Bedarfs (ca. 2g) wird mit der Nahrung (Balsom *et al.*, 1994) aufgenommen, der Rest im Körper synthetisiert. Die Synthese findet vor allem in der Leber und im Pankreas statt (Walker, 1979). Braissant *et al.* wiesen 2001 aber auch die Synthese von Kreatin im Hirn von Ratten nach. Die beiden Schlüsselenzyme der Kreatinsynthese sind die Arginin-Glycin-Amidino-transferase (AGAT) und die Guanidino-Acetate-N-Methyl-Transferase (GAMT), ein monomeres zytosolisches Protein. Abbildung 1.5. zeigt die schematische Darstellung der Kreatinsynthese (nach Ilas *et al.*, 2000). Die AGAT katalysiert den ersten Schritt der Biosynthese von Kreatin. Dabei wird eine Amidinogruppe von Arginin auf Glycin übertragen und es entstehen Ornithin und Guanidinoacetat, welches dann zur Synthese von Kreatin durch GAMT zur Verfügung steht. Dabei wird eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Guanidinoacetate übertragen

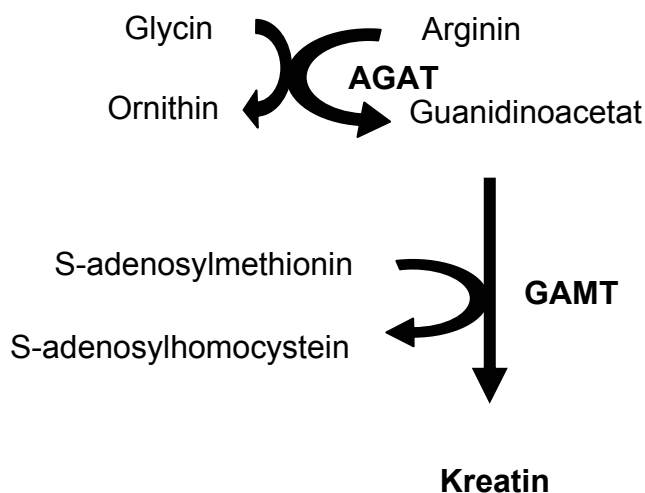


Abb. 1.5 : Kreatinsynthese

Die schematische Darstellung Kreatinsynthese aus Glycin, Arginin und S-adenosylmethionin ist dargestellt.

1.5.1. Kreatin und Muskel

Aufgrund der Ergebnisse aus der Grundlagenforschung wurde Kreatin zunächst als Nahrungsergänzung im Sport eingesetzt. Durch gezielte Supplementation mit Kreatin kann nicht nur die Sprint-, sondern auch die Ausdauerleistung verbessert und die Erholungszeiten bei hartem Training verkürzt werden. Für die positiven Effekte bei Sportlern gibt es eine Reihe von Untersuchungen (Balsom *et al.*, 1994; Wyss und Wallimann, 1994; Greenhaff, 1995; Guerrero-Ontiveros und Wallimann, 1998). Die längerfristige Einnahme von Kreatin führt hierbei zu einer direkten Zunahme der Muskelmasse (Vergrößerung des Durchmessers von schnellen TypII Muskelfasern) und zu einer signifikanten Abnahme von Fettgewebe (Vandenberghé *et al.*, 1997).

1.5.2. Kreatin und das zentrale Nervensystem (ZNS)

Kreatin und die CK-BB sind auch in Hirn und Nervenzellen in relativ hohen Konzentrationen vorhanden. Besonders trifft dieses auf Zellen zu, die für die Koordination von Bewegungen (Purkinje-Zellen im Kleinhirn), sowie auch für Lernen

und Gedächtnis (Pyrimidalzellen des Hippocampus) verantwortlich sind (Kaldis *et al.*, 1996). Dieses weist darauf hin, dass Kreatin für die Energetik dieser Hirnfunktionen eine wichtige Rolle spielt und dass Kreatin diese Leistungen verbessern kann.

Die Bedeutung von Kreatin zeigt sich bei verschiedenen genetischen Defekten, bei denen wichtige Enzyme der Kreatinsynthese (GAMT oder AGAT, s. 1.5.) fehlen. Die dabei auftretenden massiven neurologischen Störungen können durch die Gabe von Kreatin deutlich gemildert werden (Schulze, 2003).

Es gibt auch Befunde für eine positive Wirkung bei neuro-degenerativen Veränderungen, wie Alzheimer- und Huntington-Krankheit, aber auch Multiple Sklerose und Parkinson. Am Tiermodell konnten diese neuroprotektiven Eigenschaften bei Amyotropher Lateralsklerose ALS (Klivenyi *et al.*, 1999) und Parkinson gezeigt werden. Bei entsprechenden Versuchen mit einem selektiven Inhibitor des Komplex I - Elektronentransporter - Gens, welches zu ähnlichen biochemischen und histopathologischen Befunden wie bei Parkinson führt, zeigte Kreatin eine positive Wirkung (Beal, 2003). Ferner wurden auch protektive Effekte bei traumatischen Hirnverletzungen nachgewiesen (Sullivan *et al.*, 2000). So konnte bei mit Kreatin vorbehandelten Mäusen und Raten der Gewebeschaden nach einer Hirnverletzung deutlich reduziert werden.

Alle diese Resultate bestätigen, dass Kreatin eine Schutzfunktion für Hirn- und Nervenzellen ausübt. Dieses gilt insbesondere für Schäden, die entweder durch Sauerstoffmangel (Berger *et al.*, 2004) oder durch Sauerstoffradikale (Klivenyi *et al.*, 1999) verursacht werden. Als möglicher Mechanismus kann zum einen die Schutzwirkung Kreatins auf die Mitochondrien (s. 1.4.2.) und zum anderen die generelle Verbesserung des „Energistatus“ der mit Kreatin behandelten Zellen (Guerrero-Ontiveros und Wallimann, 1998) angesehen werden. Unter Verbesserung des „Energistatus“ ist in diesem Zusammenhang die erhöhte Bereitstellung von Energie in Form von ATP, resultierend aus der Umsetzung von Phosphokreatin durch die CK, zu verstehen. Damit steht der Zelle mehr Energie in Form von ATP zur Verfügung, um die zur Behebung verursachter Zellschäden benötigten Reperaturmechanismen zu betreiben. So zeigt Kreatin in verschiedenen Zellen einen Schutz vor Apoptose (O’Gorman *et al.*, 1997), welche u.a. durch mitochondrielle Prozesse ausgelöst wird.

1.5.3. Kreatin und Haut

Die CK-BB, CK-mt und der CT wurden erst kürzlich in humaner Haut entdeckt (Schlattner *et al.*, 2002) und hier im Zusammenhang mit Wundheilung und Psoriasis untersucht. Zudem ist das Vorkommen von Phosphokreatin in der Haut auch schon länger bekannt (Zemtsov *et al.*, 1993).

Über die Bedeutung und Funktion des Kreatinmetabolismus in gesunder, humaner Haut gibt es bislang keine weiteren Erkenntnisse.

1.6. Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll der Kreatinmetabolismus in humaner Haut genauer untersucht werden. Dazu soll neben dem Nachweis der entsprechenden Kreatinkinasen und des CT an Biopsiematerial humaner Haut auch die Kreatinkinase-Aktivität an primären, humanen Keratinozyten untersucht werden. Hierbei soll besonders auch ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Kreatin-Stoffwechsel und dem Alterungsprozess der Haut untersucht werden.

Aufgrund der bekannten positiven Effekte von Kreatin auf Muskulatur und Gehirn (s. 1.5.1. und 1.5.2.) soll auch die Auswirkung von Kreatin-Supplementation auf Hautzellen untersucht werden. Dieses gilt wiederum insbesondere für mögliche protektive Effekte im Zusammenhang mit der Hautalterung und oxidativem Stress.

Ferner soll die Möglichkeit der Kreatinsynthese in humaner Haut näher betrachtet werden. Dazu sollen die Synthesenzyme GAMT und AGAT in der Haut bzw. in primären Hautzellen nachgewiesen werden.

Um die Bedeutung der Kreatinkinase für die Haut näher untersuchen zu können, soll die Expression der entsprechenden Enzyme ausgeschaltet werden. Dieses soll durch Experimente mit siRNA-Transfektionen an humanen Zelllinien von Keratinozyten (HaCat) durchgeführt werden.

2. Material

2.1. Laborgeräte

2.1.1. Großgeräte

Reinstwasseranlage:

Seralpur Pro 90C

Seral, Ransbach-Baumbach

Wasserbad:

Typ 1002

GFL, Burgwedel

Schüttler:

Vibrofix VF2

Janke & Kunkel, Staufen

Thermomixer 5436

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer Comfort

Eppendorf, Hamburg

Polymax 1040

Heidolph, Kehlheim

Magnetrührer:

MR 3001

Heidolph, Kehlheim

MR 1000

Heidolph, Kehlheim

Autoklaven:

3850 EC

Systemec, Wettenberg

GVA 570

Fritz Gössner, Hamburg

Eismaschine:

ZBE 30-10

Ziegra-Eismaschinen,
Isernhagen

Zentrifugen:

5415C	Eppendorf, Hamburg
5415R	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0R	Kendro, Hanau

Trockenschrank:

TK/L 4028	Ehret, Emmendingen
-----------	--------------------

Vakuumpzentrifuge:

Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
-------------------	--------------------

Kühlgeräte:

-196°C	Cryostorage System K10	Taylor-Wharton, Theodore(USA)
-80°C	Typ 6480	GFL, Burgwedel
-80°C	ProfiMaster	National Lab, Mölln
-20°C		handelsübliche Geräte
+4°C		handelsübliche Geräte

Ultraschallbad:

Sonorex RK 100 Transistor	Bandelin, Berlin
---------------------------	------------------

2.1.2. KleingeräteMikropipetten:

Reference	500-2500µl	Eppendorf, Hamburg
Reference	100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Reference	20-200µl	Eppendorf, Hamburg
Reference	10-100µl	Eppendorf, Hamburg
Reference	2-20µl	Eppendorf, Hamburg
Reference	0,5-10µl	Eppendorf, Hamburg
Research	0,1-2,5µl	Eppendorf, Hamburg

Mehrkanalpipetten:

FinpipetteBioControl Eur.(8-Kanal) 300-1500µl	Labsystems, Helsinki
FinpipetteBioControl Eur.(8-Kanal) 50-300µl	Labsystems, Helsinki
Finpipette manuell (8-Kanal) 50-300µl	Labsystems, Helsinki
Finpipette manuell (8-Kanal) 5-50µl	Labsystems, Helsinki
Eppendorf Research (12-kanal) 30-300µl	Eppendorf, Hamburg

Pipetierhilfe:

Easypet	Eppendorf, Hamburg
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg

Analysenwaage:

BP 211 D	Sartorius, Göttingen
----------	----------------------

Laborwaage:

3713 MP	Sartorius, Göttingen
---------	----------------------

pH-Meter:

763 Multi-Calimatic	Knick, Berlin
---------------------	---------------

UV-Dosimeter:

IL 1700	International light, Newsburyport (USA)
---------	--

Mikrotiterplattenphotometer und Software:

Spectra Max 250	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
SoftMax Pro Version 2.0.1	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)

Mikrotiterplattenphotometer und Software:

Safire	Tecan, Crailsheim
X-Fluor-Beta Version 4.22	Tecan, Crailsheim

Szintillationszähler:

Wallac 1410	Pharmacia, USA
-------------	----------------

2.1.3. UV-BestrahlungsquellenUVA-Strahler:

Dermalight 2020	Dr. Hönle, Planegg
-----------------	--------------------

2.2. Geräte und Materialien für spezielle Arbeiten und Methoden**2.2.1. Geräte und Materialien für Zellkulturarbeiten**Sterile Werkbänke:

Gelaire BSB 4A	Flow Laboratories, Meckenheim
Herasafe HSP 15	Kendro, Hanau

Inkubatoren:

WTB Typ 3615018000310	Binder, Tutlingen
HeraCell	Kendro, Hanau

Zellzähler:

Zählkammer (Neubauer mod.)	Schreck, Hofheim
Casy®Cell-Counter	Schärfe System, Reutlingen

Mikroskope:

Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
Axiovert 135	Zeiss, Göttingen

Wasserbad:

GFL 1002	GFL Burgwedel
----------	---------------

Absauggerät:

Miniport	Servox, Köln
Vacusaft confort	Integra Biosciences, Fernwald

CCD-Kamera:

MPU-F100P time base corrector	Sony, Japan
Intas	Intas, Göttingen

Digitalkamera und Software:

ColourViewII	SIS, Münster
analysis Version 3.2	SIS, Münster

Fluoreszenz-aktivierte-Zellsortierung (FACS):

Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
---------	------------------------------

Verbrauchsmaterial:

Gewebekulturflaschen, 75cm ² und 185cm ²	Nunc, Roskilde
6-Loch-Platten	Greiner, Nürtingen
96-Loch-Mikrotiterplatten, F-Form	Greiner, Nürtingen
Zellschaber, Nr.3010	Costar, Corning (USA)
Zentrifugenröhrchen, 12ml, 15ml und 50ml	Greiner, Nürtigen
Pipetten, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml und 50ml	Greiner, Nürtingen
Sterilfilter Minisart	Sartorius, Göttingen

2.2.2. Geräte und Materialien für den Kreatinkinasetest

Vakuumsystem für Mikrotiterplatten:

Multiscreen Vakuumfiltrationssystem Millipore, Eschborn

Vakuumpumpe:

Typ 026.3 AN.18 Günther, Wilke, Hamburg

Mikrotiterplatten:

Multiscreen™ Filterplatte, 0,22µm,
hydrophilic, low protein binding Millipore, Eschborn
UVMax™ Whatman, Clifton (USA)

Inkubator:

B5060 EC/CO2 Heraeus, Karlsruhe

2.2.3. Geräte und Materialien für gelelektrophoretische Arbeiten

Netzgerät:

EPS 600 Pharmacia, Freiburg

Gelkammer:

Criterion™ Cell Bio-Rad, München

Gele:

Criterion™ Tris-HCL, 10%, 18 well Comb Bio-Rad, München

Blot-Membran:

Criterion™ Blotting Sandwiches,
Nitrocellulose, 8,5 x 13,5cm Bio-Rad, München

Filter:

Criterion™ Blotter, Filter Paper	Bio-Rad, München
----------------------------------	------------------

Halb-Trocken Blotter:

Trans-Blot SD	Bio-Rad, München
---------------	------------------

Scanner und Software:

Lumi-Imager	Boehringer, Mannheim
LumiAnalyst Version 3.1.00.00	Boehringer, Mannheim

Klarsichtfolien:

Photogene Development Folders	Life Technologies, Eggenstein
-------------------------------	-------------------------------

2.2.4. Geräte und Materialien für histologische ArbeitenGefriermikrotom:

Jung, Frigocut 2800 E	Leica, Cambridge
Messer: c-schliff	

Feuchtekammer:

Eigenbau

Mikroskop:

Axiovert 135	Zeiss, Göttingen
Axiovert S100	Zeiss, Göttingen

CCD-Kamera:

MPU-F100P time base corrector	Sony, Japan
Intas	Intas, Göttingen

Digitalkamera und Software:

ColourViewII	SIS, Münster
analySIS Version 3.2	SIS, Münster

Objektträger und Deckgläser:

Objektträger mit Mattrand	Menzel Gläser, Braunschweig
Deckgläser 24 x 50mm	Omnilab, Hamburg
LabTek Chamber Slide (8-Kammern)	Nunc, Wiesbaden

2.2.5. Geräte und Materialien für die ElektronenmikroskopieMikrotom:

Ultracut FC 4E	Reichert-Jung, Nußloch
----------------	------------------------

Elektronenmikroskop:

EM 109	Zeiss, Göttingen
--------	------------------

2.2.6. Geräte und Materialien für DNA und RNA ArbeitenThermocycler:

Robocycler Gradient 40	Stratagene, Heidelberg
------------------------	------------------------

Gelkammer:

Horizon™ 58	BRL Life Technologies, Gaithersburg (USA)
-------------	--

Netzgerät:

ECPS 3000/150	Pharmacia, Erlangen
---------------	---------------------

Videodokumentation:

CS1	Cybertech, Berlin
Video Copy Processor	Mitsubishi, Singapore
UV-Schirm TFX-20M	Vilber Lourmant, Marne la Vallee (France)

2.3. Chemikalien

Alle Lösungen wurden mit bidestilliertem oder äquivalent entionisiertem Wasser sowie mit Chemikalien in p.A.-Qualität angesetzt, sofern sie nicht fertig bezogen wurden.

2.3.1. Standard-Chemikalien und Puffer

Natriumchlorid	Sigma, München
Kaliumchlorid	Sigma, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma, München
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma, München
Albumin, bovines (Fraktion V)	Sigma, München
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Salzsäure, rauchend	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Fluka, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, München
Borsäure	Sigma, München
Glycin	Sigma, München
Glycerol	Sigma, München
Ultima Gold	Packard Biosciences, Groningen, Niederlande

2.3.2. Chemikalien für die Zellkultur

KGM-2 Bulletkit	Clonetics, San Diego (USA)
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Nut. Mix. F12 (HAM) with Glutamax-1	Invitrogen, Karlsruhe
Dulbeccos PBS w/o (1x)	PAA, Linz
Penicillin-Streptomycin (5000U/ml, 5000µg/ml)	Life Technologies, Eggenstein
Glutamax I (100x)	Life Technologies, Eggenstein
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Life Technologies, Eggenstein
Trypsin-EDTA-Lösung (10x)	Life Technologies, Eggenstein
Trypsin (2,5%)	Roche, Mannheim
Dispase II (2,5U/ml)	Roche, Mannheim
Trypan-Blau-Lösung	Serva, Heidelberg
Ethidiumhomodimer-1 (EthD)	Molecular Probes, USA
5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl- benzimidazolylcarbocyanin-jodid (JC-1)	Molecular Probes, USA
Kreatin, Anhydrous	Sigma, München
¹⁴ C-Kreatin	Biotrend, Köln
Guanidinopropionsäure	Sigam, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA, Linz
Zellproliferations-ELISA, BrdU	Roche, Mannheim
Vitalitätstest, LDH	Roche, Mannheim
Lipofectamine PLUS™	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine™	Invitrogen, Karlsruhe
Oligofectamine™	Invitrogen, Karlsruhe
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen, Heidelberg

2.3.3. Chemikalien für zelluläre Extrakte und Kreatinkinasetest

SDS (10% w/v)	Life Technologies, Eggenstein
Complete™ Mini	Roche, Mannheim

BC Assay Protein Quantitation Kit	Uptima, Montlucon
ProteoExtract™ Subcellular Proteome Extraction Kit	Merck KgaA, Darmstadt
Creatine-Phosphokinase Assay 661	Sigma, München

2.3.4. Chemikalien für Elektrophorese- und Blotting-Techniken

Precision Plus Protein™, dual color	Bio-Rad, München
Kaleidoscope, prestained	Bio-Rad, München
Laemmli buffer (2x)	Sigma, München
Tween 20	Sigma, München
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Lumi-Light Plus Western Blotting Substrate	Roche, Mannheim

2.3.5. Chemikalien für die Histologie

Paraformaldehyd	Sigma, München
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Miles inc., USA
Poly-L-Lysin	Sigma, München
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Entellan®	Merck, Darmstadt
Vectashield Mounting Medium mit DAPI	Vector Lab., Burlingham, USA

2.3.6. Chemikalien für Elektronenmikroskopie

Caco-Puffer:

0,2 M Natriumcacodylat, pH7,35

Ito-Fixierungs-Lösung (10ml):

5	ml	5% Paraformaldehyd (in 0,2M Caco-Puffer)
1	ml	25% Glutaraldehyd (fertig bezogen; Sigma, München)
3	ml	Aqua bidest.
1	ml	0,5% Pikrinsäure (Sigma, München)

Osmium-Fixierungs-Lösung:

Lösung 1	2%	Osmiumtetroxid (Sigma, München)
Lösung 2	3%	Kaliumferrocyanat (Sigma, München)
Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt		

Einbettung:

p-Dimethylaminomethylphenol		Sigma, München
Propylenoxid		Sigma, München
Epon A	62ml Glycidether 100	Sigma, München
	100ml Dodecenybernstein	Sigma, München
Epon B	100ml Glycidether 100	Sigma, München
	89ml Methylnadicanhydrid	Sigma, München

Epon-Gebrauchslösung:

4ml Epon A + 6ml Epon B + 200µl p-Dimethylaminomethylphenol

Filmmaterial:

Macophot ORT25c	G.C.Bender, Frankfurt
-----------------	-----------------------

2.3.7. Antikörper

anti-CK, Isoform BB, polyklonal, Kaninchen IgG	Biotrend, Köln
anti-CT, polyklonal, Kaninchen IgG	Biotrend, Köln
anti-CK, mitochondrial, Kaninchen IgG	Prof. Walliman, ETH, Zürich
anti-Lamin A/C, Maus monoklonal, SC-7292	Santa Cruz, Heidelberg
anti-Mitochondria, monoclonal, Maus, IgG	Biotrend, Köln

Ziege anti-Kaninchen IgG, POD-konjugiert, polyklonal	Sigma, München
Ziege anti-Kaninchen IgG, AlexaFluor®488 konjugiert, polyklonal	Molecular Probes, USA
Ziege anti-Maus IgG, AlexaFluor™488 konjugiert, polyklonal	Molecular Probes, USA
Ziege anti-Maus IgG, AlexaFluor™546 konjugiert, polyklonal	Molecular Probes, USA

2.3.8. Chemikalien für DNA und RNA Arbeiten

Diethylpyrocarbonat	Sigma, München
100bp Größenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
10x blue juice Probenpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München

5fach Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE):

0,45	M	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)
0,45	M	Borsäure
7,8	mM	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
auf 1l mit A. bidest.		

1fach Tris-Acetat-Puffer (TAE):

50	mM	Tris mit Essigsäure auf pH 8,1 eingestellt
1	mM	EDTA

1fach Tris-EDTA-Puffer (TE):

10	mM	Tris mit HCl auf pH 7,4 eingestellt
1	mM	EDTA

RNA-Isolierung:

RNAzol™ B

Wak-Chemie, Steinbach

Primer:

GAMT2-upper:

5'-CTT TGA TGG GAT CCT GTA CGA-3'

Metabion, Martinsried

GAMT2-lower:

5'-CAT CTG TGG GAA GGC GTA GTA-3'

Metabion, Martinsried

AGAT1-upper:

5'-TGA GTT TGA GCC ATG CTT TG-3'

Metabion, Martinsried

AGAT1-lower:

5'-AGA GTG GAT GAT CGT CTG GG-3'

Metabion, Martinsried

PCR-Reaktion:

Superscript™ One Step, RT-PCR

Invitrogen, Karlsruhe

DNA Extraktion:

S.N.A.P. Gel Purification Kit

Invitrogen, Karlsruhe

Restriktionsenzyme:

BseR I

New England Biolabs, Frankfurt

NEBuffer 2

New England Biolabs, Frankfurt

BsaH I

New England Biolabs, Frankfurt

Ban I

New England Biolabs, Frankfurt

NEBuffer 4

New England Biolabs, Frankfurt

Asp I

Roche, Mannheim

SuRE Cut Buffer B

Roche, Mannheim

Gesamt-RNA:

Leber, human

BioCat, Heidelberg

Haut, human

Fr. Südel, Beiersdorf AG,
Hamburg

dsRNA:

MWG Biotech, München

Lamin A/C: 5'- CUG GAC UUC CAG AAG AAC A dTdT
dTdT GAC CUG AAG GUC UUC UUG U - 5'

Scramble II: 5'- GCG CGC UUU GUA GGA UUC G dTdT
dTdT CGC GCG AAA CAU CCU AAG C - 5'

CKb00A: 5'- CCU GGG CAA GCA UGA GAA G dTdT
dTdT GGA CCC GUU CGU ACU CUU C - 5'

CKb00B: 5'- GUG UUC AAG GAU CUC UUC G dTdT
dTdT CAC AAG UUC CUA GAG AAG C - 5'

CKmt001: 5'- UGA GCG UUU GGG AUA CAU C dTdT
dTdT ACU CGC AAA CCC UAU GUA G - 5'

CKmt002: 5'- UGA AGC ACA CCA CGG AUC U dTdT
dTdT ACU UCG UGU GGU GCC UAG A - 5'

3. Methoden

3.1. Sicherheit und Abfallbeseitigung

Giftige Feststoffe sowie Lösungsmittelreste wurden getrennt gesammelt und der vorgeschriebenen Entsorgung zugeführt. Biologisch kontaminiertes Material wurde durch 20minütiges Autoklavieren bei 121°C unter 5Pascal Druck oder durch Desinfektion mit 70%igem Ethanol unschädlich gemacht.

3.2. Zellkultur

Die Zellkultur wurde hauptsächlich mit aus humaner Haut isolierten Keratinozyten und Fibroblasten durchgeführt (s. 3.3.1.) Die Haut stammte hierbei von verschiedenen alten Spendern aus schönheitskosmetischen Operationen. Die Zellen aus den Primärkulturen epidermaler Keratinozyten und dermaler Fibroblasten wurden hierbei jeweils in der dritten Passage für Versuche eingesetzt. Daneben fanden die Keratinozytenzelllinie HaCat und die Zelllinie HeLaS3 aus Gebärmutterhalskarzinomzellen Verwendung.

Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter Begasung mit 7% CO₂ und 93% Luft bei 37°C kultiviert. Trypsinverdau und Zentrifugationsschritte fanden, wenn nicht anders beschrieben, bei RT statt. Die Zellzahlen wurden entweder mittels Trypanblau-Färbung und Neubauer-Zählkammer oder mit dem Casy™ Zellzähler bestimmt. Für sämtliche Zellkultivierungsarbeiten wurde sterile Einmalware verwendet. Mediumwechsel erfolgte bei primären Fibroblasten und Keratinozyten, ebenso wie bei den HaCat und HeLaS3 Zellen zweimal wöchentlich.

Verwendete Puffer und Medien:

Dulbecco's PBS w/o (1x):

(Herstellerangaben, fertig bezogen)

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
8,1	mM	Na ₂ HPO ₄

KGM-2 Kultivierungsmedium für primäre Keratinozyten:

KBM-2 (0,1mM Ca²⁺)(fertig bezogen) mit folgenden Zusätzen (Herstellerangaben):

Rinder-Hypophysenextrakt (BPE)
Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-β (hEGF-β)
Gentamicin, Amphotericin
Insulin
Transferrin
Epinephrin
Hydrocortison (HC)

DMEM Kultivierungsmedium für primäre Fibroblasten und HaCats:

DMEM (High Glucose)(fertig bezogen) mit folgenden Zusätzen:

10%	(v/v)	Fötales Kälberserum (FCS)
10	µl/ml	Glutamax (aus 100x Stammlösung, Herstellerangabe)
50	U/ml	Penicillin G (aus 100x Stammlösung, Herstellerangabe)
50	µg/ml	Streptomycinsulfat (aus 100x Stammlösung, Herstellerangabe)

Nut. Mix. F12 (HAM) Kultivierungsmedium für HeLaS3:

Nut. Mix. F12 (HAM) with Glutamax-1 (fertig bezogen) mit folgenden Zusätzen:

10%	(v/v)	Fötales Kälberserum (FCS)
50	U/ml	Penicillin G (aus 100x Stammlösung, Herstellerangabe)
50	µg/ml	Streptomycinsulfat (aus 100x Stammlösung, Herstellerangabe)

3.2.1. Isolierung epidermaler Zellsuspensionen aus Hautbiopsien

Zunächst wurden die Subkutis und die dermalen Anteile soweit wie möglich mittels Präparierbesteck von der Hautbiopsie entfernt. Die Epidermis mit den verbleibenden dermalen Anteilen wurde in Quadrate von 2mm Kantenlänge geschnitten. Alle nachfolgend beschriebenen Inkubationsschritte erfolgten in 6-Loch-Platten. Sofern eine weitere Kultivierung erfolgen sollte, wurden die Hautstücke 5-10 Sekunden in 70% Ethanol geschwenkt, kurz in PBS gewaschen und in 6,5ml Dispase-Lösung (2,0U/ml) gebracht. Es folgte eine zweistündige Dispase-Inkubation bei 37°C. Dispase ist eine Kollagenase, die sehr spezifisch für Kollagen Typ IV und Fibronectin ist. Die Zellvitalität wird durch die Dispase nicht beeinflusst (Stenn *et al.*, 1989). Nach der Inkubation wurde die Epidermis vorsichtig mittels Pinzette von der Dermis abgelöst, kurz in PBS gewaschen und danach in 3ml Trypsin-Lösung (0,5%, v/v) transferiert. Der Trypsinverdau wurde bei 37°C durchgeführt und die Epidermisstücke nach fünf bis zehn Minuten mit einer gestopften Pasteurpipette trituiert, d.h. ständig auf- und abpipettiert, um die Zellen aus dem Verband zu lösen. Sofern die epidermalen Zellen hiernach noch nicht ausreichend als Einzelzellsuspension vorlagen, wurde der Trypsinverdau für maximal fünf Minuten fortgesetzt und nochmals trituiert. Nach höchstens 15 Minuten wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 5ml 10%igem FCS in PBS gestoppt, die Zellsuspension in ein 12ml-Röhrchen überführt. Die Trypsin-Inkubationskavität nochmals mit 3ml 10%igem FCS in PBS gespült und diese Zellen mit den übrigen vereint. Es folgten 10 Minuten Zentrifugation bei 1500 UpM. Das Zellsediment wurde in 15ml KGM-2 Medium resuspendiert, auf 10ml aufgefüllt und nochmals zentrifugiert. Zur Anzucht der Keratinozyten wurde das Zellpellet mit 15ml KGM-2 Medium in eine 75cm²-Zellkulturschale überführt.

3.2.2. Kultivierung und Subkultivierung epidermaler Primärisolate

Epidermale Zellen wurden wie unter 3.2.1. beschrieben isoliert und in KGM-2 Medium aufgenommen. Nach 7 bis 15 Tagen waren die Zellen zu etwa 80% konfluent gewachsen und wurden dann zweifach mit PBS w/o gewaschen und durch fünf bis zehn Minuten Trypsin/EDTA-Inkubation bei 37°C und anschließendem Triturieren vom Boden der Kulturschale abgelöst. Der Trypsin-Verdau wurde durch

PBS mit 10% FCS gestoppt und die Zellen in 12ml Röhren transferiert. Wie unter 3.2.1. beschrieben wurde zentrifugiert, einmal mit KGM-2 gewaschen und abermals zentrifugiert. Die epidermalen Keratinozyten wurden nach dem zweiten Zentrifugationsschritt in 10ml KGM-2 aufgenommen und in eine 185cm²-Zellkulturflasche, in die 20ml KGM-2 Medium vorgelegt wurden, transferiert. Für die Gewinnung zytoplasmatischer Extrakte wurden die Zellen bei 80%iger Konfluenz erneut trypsinisiert und anschließend in einer Dichte von 5000 Zellen/cm² in 3ml KGM-2 Medium je Kavität einer 6-Loch-Platte ausgesät. Bei 80% Konfluenz wurden wie unter 3.4. beschrieben zytoplasmatische Extrakte gewonnen.

3.2.3. Kultivierung und Subkultivierung dermaler Fibroblasten

Von den bei der Epidermisisolierung nach dem Dispaseverlauf anfallenden Dermisstücken (siehe 3.2.1.) wurden in 6-Loch-Kulturplatten je Kavität drei bis fünf Stücke gebracht und mit 3ml DMEM überschichtet. Nach etwa vier Wochen waren aus den Dermisstücken genügend Fibroblasten sternförmig ausgewachsen, so dass diese, wie für die epidermalen Keratinozyten unter 3.2.2. beschrieben, geerntet werden konnten. Dermisfibroblasten aus jeweils drei Kavitäten wurden in 75cm²-Kulturflaschen in 15ml DMEM weiterkultiviert und nach weiteren 14 Tagen Kultur wiederum passagiert. Für die Gewinnung zytoplasmatischer Extrakte wurden Zellen bei 80% Konfluenz erneut trypsinisiert und anschließend in einer Dichte von 5000 Zellen/cm² in 3ml DMEM je Kavität einer 6-Loch-Platte ausgesät. Bei 80% Konfluenz wurden, wie unter 3.4. beschrieben, zytoplasmatische Extrakte gewonnen.

3.3. Kreatinkinase-modulierende und begleitende Experimente

3.3.1. Inkubation von Keratinozyten, Fibroblasten, HaCats und HeLaS3 mit Kreatin

Zellen in Monokultur wurden einen Tag nach Aussaat auf entsprechendes Medium mit Kreatin umgestellt. Hierbei wurde in der Regel eine Konzentration von 150µM

verwendet. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden erfolgten die weiteren Untersuchungen.

3.3.2. Inkubation von Keratinozyten mit ¹⁴C-markiertem Kreatin

Zellen in Monokultur wurden einen Tag nach Aussaat in 6-Loch-Platten einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Medium, welches 1mCi/ml ¹⁴C-Kreatin (mit der spezifischen Aktivität von 55mCi/mmol) enthielt, für 10, 20, 30 und 60 Minuten inkubiert. Als Inhibitor des Kreatintransporters wurde zu einem Teil der Zellen 2mM Guanidinopropionsäure nach einem Zeitraum von 20 Minuten zugegeben. Alle Zellen wurden nach Ende der Inkubationszeit dreimal mit PBS gewaschen und die zytoplasmatischen Extrakte (s. 3.4.1.) in einem Szintillationszähler ausgemessen. Die gemessenen Werte wurden anschließend auf den Proteingehalt (s. 3.4.4.) relativiert.

3.3.3. Transfektion von HaCats und HeLaS3 mit siRNAs

Bei dem posttranskriptionellen Kock-out mit small interference RNA (siRNA) resultiert das Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in Zellen (Transfektion, s.3.3.3.) in einem zielgerichteteten, posttranskriptionalen Ausschalten von Genen. Dabei wird die dsRNA von Dicer, einem Homolog der dsRNA-spezifischen RNase III, in siRNAs zerlegt und diese darauf vom RNA-induzierten-Silencing-Komplex (RISC) gebunden und entwunden. Dabei spezifiziert der Antisense-Strang RISC zur Degradation der Ziel-mRNA (s. Abb. 3.3.2).

Der Gruppe von Elbashir *et al.* gelang es 2002 erstmals mit dsRNA von einer Länge von 21-23 Basenpaaren Säugerzellen, inklusive der humanen Tumorzelllinie HeLa, zu transfizieren und entsprechende Gene auszuschalten.

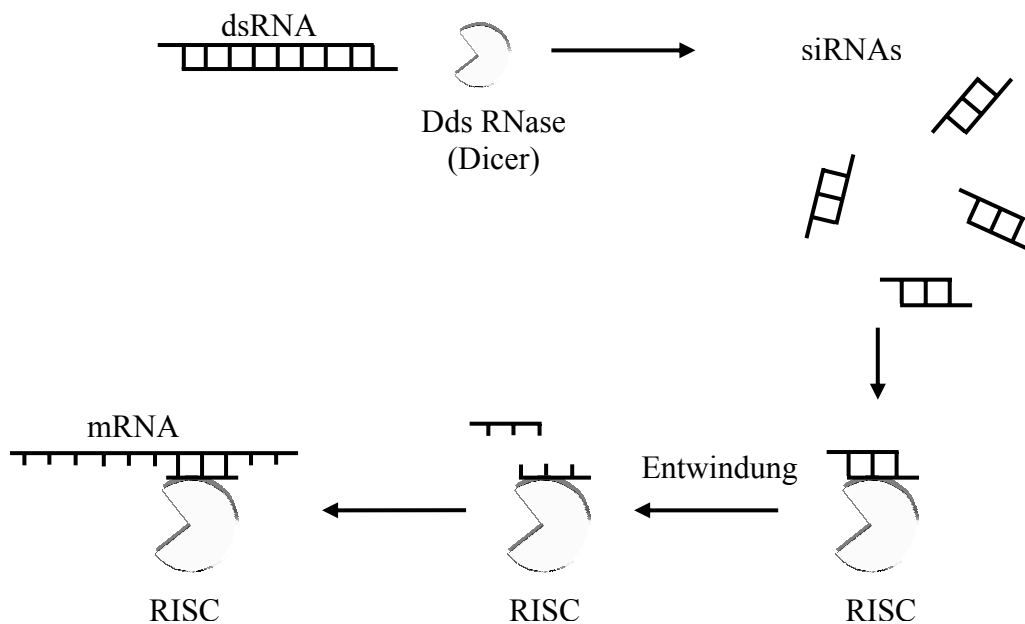


Abb. 3.3.3.: Modell für RNAi

Doppelsträngige RNA wird von Dicer (Homolog der dsRNA-spezifischen RNase III) zerlegt, siRNAs werden von RISC gebunden und entwunden und anschließend degradiert der spezifizierten RISC die Ziel-mRNA.

Beim Design der dsRNAs wurden die von Elbashir beschriebenen Auswahlkriterien befolgt und vor allem mittels eines Blast-Searchs (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) sichergestellt, dass die ausgesuchten dsRNAs für nur eine Zielsequenz spezifisch waren. Die folgenden dsRNAs wurden hierbei von der Firma Dharmacon synthetisiert und über MWG Biotech, München bezogen:

Lamin A/C: 5'- CUG GAC UUC CAG AAG AAC A dTdT
dTdT GAC CUG AAG GUC UUC UUG U - 5'

Scramble II: 5'- GCG CGC UUU GUA GGA UUC G dTdT
dTdT CGC GCG AAA CAU CCU AAG C - 5'

CKb00A: 5'- CCU GGG CAA GCA UGA GAA G dTdT
dTdT GGA CCC GUU CGU ACU CUU C - 5'

CKb00B: 5'- GUG UUC AAG GAU CUC UUC G dTdT
dTdT CAC AAG UUC CUA GAG AAG C - 5'

CKmt001: 5'- UGA GCG UUU GGG AUA CAU C dTdT
dTdT ACU CGC AAA CCC UAU GUA G - 5'

CKmt002: 5'- UGA AGC ACA CCA CGG AUC U dTdT
dTdT ACU UCG UGU GGU GCC UAG A - 5'

Zusätzlich zu den spezifischen dsRNAs fand eine so genannte Scramble dsRNA Verwendung, welche mit keinen humanen mRNAs interferieren soll und somit als Kontrolle eingesetzt wurde.

3.3.3.1. Transfektion von HaCat und HeLaS3 mit siRNA gegen Lamin A/C

Die Übertragung von DNA, bzw. RNA in Zellkulturzellen bezeichnet man als Transfektion. Für die Transfektion von dsRNA in HeLaS3 und HaCat-Zellen wurden spezielle Transfektionsreagenzien (Oligofectamine™, bzw. Lipofectamine Plus™ von Invitrogen) eingesetzt. Um die Transfektionsfähigkeit der beiden Zelllinien mit den zwei verschiedenen Reagenzien auszutesten und die idealen Transfektionsbestimmungen herauszufinden, wurden zunächst Transfektionen mit dsRNA gegen Lamin A/C durchgeführt. Die Transfektion von HeLaS3 mit Lamin A/C dsRNA war hierbei von Frau Oelschläger bereits im Labor etabliert.

Für die Bestimmung der Transfektionsbedingungen in HaCat wurden diese Zellen in verschiedenen Konzentrationen in 24-Loch-Platten ausgesät (5000, 10000 und 20000 Zellen pro Kavität mit 2,0cm²). In jede Kavität wurde zuvor ein rundes, steriles Deckgläschen gegeben, welches wie unter 3.8.3. beschrieben mit Kollagen beschichtet worden waren. 24 Stunden nach Aussaat erfolgte dann die Transfektion. Hierfür fand ausschließlich Medium (DMEM) ohne FCS Verwendung.

Transfektion mit Oligofectamine™:

2,5µl Lamin A/C dsRNA wurden in einem 1,5ml Reaktionsgefäß in 40µl Medium und 1µl Oligofectamine in einem anderen 1,5ml Reaktionsgefäß in 6,5µl Medium verdünnt. Nach einer Inkubation von 5-10 Minuten wurden die beiden Ansätze sorgfältig vermischt und die dsRNA mit dem Oligofectamine für 15-20 Minuten inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium in den Kavitäten der 24-Loch-Platte abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und danach 200µl serumfreies DMEM auf die Zellen gegeben. Nach dem Mediumwechsel wurden die 50µl Transfektionsansätze in die jeweiligen Kavitäten pipettiert und vorsichtig vermischt. Der Abbruch der Transfektion erfolgte durch Zugabe von Medium mit 30% FCS nach 4, bzw. 24 Stunden, so dass in den Kavitäten dann die normale FCS Konzentration

von 10% vorlag. Insgesamt 72 Stunden nach der Transfektion folgte dann die mikroskopische Auswertung.

Transfektion mit Lipofectamine Plus™:

Die Transfektion mit Lipofectamine Plus erfolgte analog zu der oben beschriebenen Oligofectamine-Transfektion. Die 2,5µl dsRNA wurden lediglich in 18,5µl Medium verdünnt und zusätzlich wurden noch 4µl Plus-Reagenz dazupipettiert. 1µl Lipofectamine wurde in 20µl Medium verdünnt.

Lamin A/C-Färbung:

Die Lamin A/C Färbung zur immunhistochemischen Färbung wurde in Abwandlung der unter 3.8. beschriebenen Immunhistochemie durchgeführt.

72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in der 24-Loch-Platte einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in Methanol/Aceton (1:1) bei -20°C für zehn Minuten fixiert. Nach zwei weiteren Waschsritten mit PBS erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit PBS/FCS (10%) für 20 Minuten bei RT. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurde der in PBS verdünnte Lamin A/C Antikörper (1:500) zur Inkubation für eine Stunde bei RT auf die Zellen gegeben. Auch vor der Inkubation mit dem in PBS verdünnten Sekundärantikörper für 1,5 Stunden im Dunkeln, wurde zweimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurden nach zweimal Waschen mit PBS die Deckgläschen aus den Kavitäten mit einer Pinzette herausgeholt und umgekehrt auf ein mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit DAPI (das DAPI dient hierbei zur Kernfärbung) luftblasenfrei aufgelegt und die Präparate mit Nagellack luftdicht verschlossen.

Die Auswertung erfolgte wie unter 3.8.7. beschrieben mit einem Tri-Band-Filter, der sowohl die Fluoreszenz des verwendeten Zweitantikörpers (AlexaFluor™-488), als auch des DAPIs durchlässt.

3.3.3.2. Transfektion von HaCats und HeLaS3 mit siRNA gegen CKb und CKmt

Zur Transfektion von HeLaS3 und HaCat-Zellen fanden 6-Loch-Platten Verwendung. Die Durchführung erfolgte wie unter 3.3.3.1. beschrieben. Die verwendeten Mengen wurden dabei nach Tabelle 3.3.3.2. angepasst. Als dsRNAs wurden jeweils die

beiden Oligonukleotide gegen CK-b und CK- α , sowie eine dsRNA, die keine Interaktion mit Säugerzellen mRNA zeigen soll (Scramble, bezogen von Dharmacon über MWG, München), eingesetzt.

Oligofectamine™	Lipofectamine Plus™
A: 10 μ l dsRNA (20 μ M) verdünnt in 90 μ l Medium	A: 10 μ l dsRNA (20 μ M) +4 μ l Plus-Reagenz verdünnt in 90 μ l Medium
B: 4 μ l Oligofectamine in 96 μ l Medium	B: 4 μ l Lipofectamine in 96 μ l Medium
Ansatz A mit B mischen	Ansatz A mit B mischen
800 μ l serumfreies Medium pro Kavität	800 μ l serumfreies Medium pro Kavität
200 μ l Transfektionsansatz dazupipetieren	200 μ l Transfektionsansatz dazupipetieren
nach 24 Stunden: 500 μ l Medium (30% FCS) zugeben	nach 24 Stunden: 500 μ l Medium (30% FCS) zugeben

Tabelle 3.3.3.2.: Einsatzkonzentration für die dsRNA Transfektion in 6-Loch-Platten.

3.4. Herstellung zytoplasmatischer Extrakte

Für die Untersuchung der Kreatinkinase-Aktivität (s. 3.5.) wurden zytoplasmatische Extrakte von Keratinozyten- und Fibroblastenmonokulturen sowie von HaCat und HeLaS3 Zellen gewonnen. Die Extrakte wurden zusätzlich in Western-Blot-Untersuchungen eingesetzt.

Es wurde folgender Puffer eingesetzt:

50	mM	Tris-HCl
5	mM	Ethylen-diamin-tetra-acetat EDTA
300	mM	NaCl
0,5	%	Triton X 100,

Complete™Mini (Protease-Inhibitor, laut Herstellerangaben, 1 Tablette auf 50ml Puffer)

3.4.1. Herstellung zytoplasmatischer Extrakte aus Monokulturen

Keratinocyten, Fibroblasten, HaCat- und HelaS3-Zellen wurden z.B. nach 24 stündiger Inkubation mit Kreatin zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und je Kavität mit 200µl kaltem Lysispuffer versetzt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und der Extrakt in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß pipettiert und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen bei RT wurde das gebildete Zellpellet kurz resuspendiert. Um die Zellkerne und unlösliche zytoplasmatische von den löslichen zytoplasmatischen Bestandteilen zu trennen, wurde zehn Minuten bei 14000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität (s. 3.5.), für die Proteinbestimmung (s. 3.4.4.) und für die Western-Blot-Analysen (s. 3.7.) eingesetzt.

3.4.2. Herstellung subzellulärer Fraktionen Monokulturen

Zur Herstellung subzellulärer Fraktionen aus Monokulturen fand der Subcellular Proteome Extraction Kit der Firma Merck KGaA Verwendung. Hierbei wird der Zellinhalt sequentiell, in Abhängigkeit von der unterschiedlichen Löslichkeit verschiedener subzellulärer Kompartimente, mit bis zu vier verschiedenen Puffern extrahiert. Im ersten Schritt (Puffer 1) schrumpfen die Zellen durch Freisetzung der zytosolischen Bestandteile, bleiben aber in ihrer Gesamtstruktur erhalten. Nach dem zweiten Schritt (Puffer 2), bei dem Membranen und Organellen solubilisiert werden, bleiben nur isolierte Kerne und das Zyoskelett zurück. In den beiden letzten Schritten könne diese dann wiederum voneinander getrennt werden. Für die hier durchgeführten Experimente wurden nur die beiden ersten Schritte zur Gewinnung der zytosolischen und der Organellen-Fraktion nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Hierzu wurde bei Zellen in einer 6-Loch-Platte (s. 3.2.2., bzw. 3.3.3.2.) zunächst das Medium vorsichtig abgesaugt und zweimal mit 1ml eiskaltem Waschpuffer unter

sanfter Bewegung bei 4°C für 5 Minuten gewaschen, ohne die Anhaftung der Zellen an den Plattenboden zu beeinträchtigen. Danach wurden zu jeder Kavität 150µl Puffer 1, in den direkt zuvor ein Protease-Inhibitor-Cocktail (5µl/ml) zugesetzt wurde, pipettiert und unter sanfter Bewegung für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung, dass die Zellen immer noch adherent waren, wurde der Überstand, der nun die zytosolische Fraktion enthielt, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zu weiteren Verwendung gelagert. Danach wurde mit 150µl Puffer 2, dem ebenfalls direkt zuvor ein Protease-Inhibitor-Cocktail (5µl/ml) zugesetzt wurde, wiederum unter sanfter Bewegung bei 4°C für 30 Minuten inkubiert und der Überstand mit der Organellen-Fraktion in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert.

3.4.3. Präparation der Saugblasen aus Epidermis (Suction Blister) und Isolierung epidermaler Zellen

Die Isolierung der Epidermis aus Saugblasen (Suction Blister) erfolgte ausschließlich an den Innenseiten des distalen Oberarms, wo die dünne Epidermis nur eine leichte Verzahnung mit der Dermis aufweist. Auf den sechs kreisrunden Hautarealen von 7mm Durchmesser wurde ein Unterdruck von 220-250mbar angelegt, der innerhalb von 1,5-2,5 Stunden eine mit seröser Flüssigkeit gefüllte Saugblase entstehen ließ. Diese konnte anschließend mit einem sterilen Mikropräparierbesteck abpräpariert werden (Kiistala & Mustakallio, 1964, Kiistala, 1968).

Die steril präparierte Epidermis wurde in 1ml eiskalten Lysispuffer in einen Dounce-Homogenisator gegeben und auf Eis mit 10-12 Strokes homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend für 3mal 10 Sekunden im Ultraschallbad (200Watt) auf Eis beschallt und für zehn Minuten bei 14000 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung (s. 3.4.4.) und für die Western-Blot-Analysen (s. 3.7.) eingesetzt.

3.4.4. Proteinbestimmung mit dem BCA-Test

Proteinmengen wurden für die Relativierung der Daten aus dem Kreatinkinase-Aktivitäts-Test (s.3.5.) und für den Einsatz vergleichbarer Proteinmengen im Western-Blot (s. 3.7.) mit dem BCA-Testsystem bestimmt. Dieser Test basiert auf

folgendem Prinzip: in einem ersten Schritt werden zweiwertige Kupferionen durch Protein in einem alkalischen Medium zu einwertigen Kupferionen reduziert (Biuret-Reaktion). Diese einwertigen Kupferionen werden durch einen spezifischen Chelator (Bicinchonic Acid, BCA) komplexiert. Dabei reagieren zwei Moleküle BCA mit einem Kupferion und ein violettes Reaktionsprodukt entsteht, welches bei einer Absorptionswellenlänge von 562nm detektiert wird (Smith *et al.*, 1985).

Der Test wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. 1µl der zytoplasmatischen Extrakte wurden in Dreifachbestimmung in 96-Loch-Mikrotiterplatten (die äußeren Kavitäten blieben frei) mit 200µl Reagenz versetzt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proteinmenge wurde mittels einer Standardreihe mit 0 bis 2,5µg/µl Protein (BSA) bestimmt. Die Messung wurde an dem Spectra Max Photometer bei einer Wellenlänge von 562nm durchgeführt.

3.5. Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität

Der *in vitro* Assay (Sigma, München) zur Aktivitätsbestimmung der Kreatinkinase (CK) basiert auf der Umsetzung von Kreatin zu Phosphokreatin (s. Abb. 3.5.). Die im zytoplasmatischen Extrakt (s. 3.4.) enthaltene CK setzt zugegebenes Kreatin in Anwesenheit von ATP zu Phosphokreatin um, wobei der nach Hydrolyse freigesetzte anorganische Phosphor dann schließlich durch Absorptionsmessung bei 720nm nachgewiesen wird. Als Kontrolle, d.h. um Fehler durch die Umsetzung von endogenem Kreatin zu berücksichtigen, dient eine entsprechende Probe des zytoplasmatischen Extrakts, dem kein Kreatin zugesetzt, aber ansonsten gleich behandelt wird.

Zur Umrechnung der gemessenen Werte auf Aktivität der Kreatinkinase wurde zunächst eine Kalibrierung mit verschiedenen definierten Phosphor-Konzentrationen in einer 96-Loch-Platte unter Verwendung des Spectra Max 250 durchgeführt und der aus der Eichkurve gewonnene Umrechnungsfaktor zur Bestimmung des Gehalts an anorganischem Phosphor in jeder Probe benutzt.

Zur Durchführung des Assays wurden 10µl der zytoplasmatischen Extrakte einmal für den eigentlichen Test und einmal für die Kontrolle, jeweils in Doppelbestimmung, eingesetzt. Zu den Test-Proben wurde darauf 50µl einer Kreatinlösung in TRIZMA-Puffer und zu den Kontroll-Proben 50µl TRIZMA-Puffer ohne Kreatin pipettiert.

Danach wurden Test- und Kontroll-Proben wieder vollkommen gleich behandelt, indem zuerst 50µl A. bidest. und nach einer 5 minütigen Inkubation bei 37°C 4µl ATP-Gluthation-Lösung je Kavität der 96-Loch-Platte zugegeben wurde. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 Minuten erfolgte das Abstoppen der Reaktion mit 80µl 30%iger Trichloressigsäure. Der Überstand wurde hierauf von den ausgefällten Proteinen mit einer Multiscreen™ Filterplatte mit einer Porengröße von 0,22µm und einem entsprechenden Absauggerät getrennt und jeweils 50µl in eine neue 96-Lochplatte (UVMax™) überführt. Nach Zugabe von 20µl A. bidest., 50µl einer sauren Molybdatlösung und 12,5µl des Fisk&Subbarow reduzierenden Agens wurde noch einmal für 30 Minuten inkubiert während das Phosphokreatin hydrolysiert wurde, und anschließend die Absorption bei 700nm im Spectra Max 250 gemessen.

Zur Auswertung wurden die gemessenen Absorptionswerte anhand der zuvor ermittelten Eichkurve in µg Phosphor umgerechnet. Die Differenz aus den jeweilig entsprechenden Werten für die Test- und die Kontroll-Proben ergab dann das von der Kreatinkinase umgesetzte anorganische Phosphat ΔµP. Dieses ΔµP wurde darauf anhand einer von der Firma Sigma ermittelte Tabelle in Kreatinkinase-Units (EU) umgerechnet. 1EU der Kreatinkinase setzt dabei ein µmol Phosphokreatin pro Sekunde bei 25°C um.

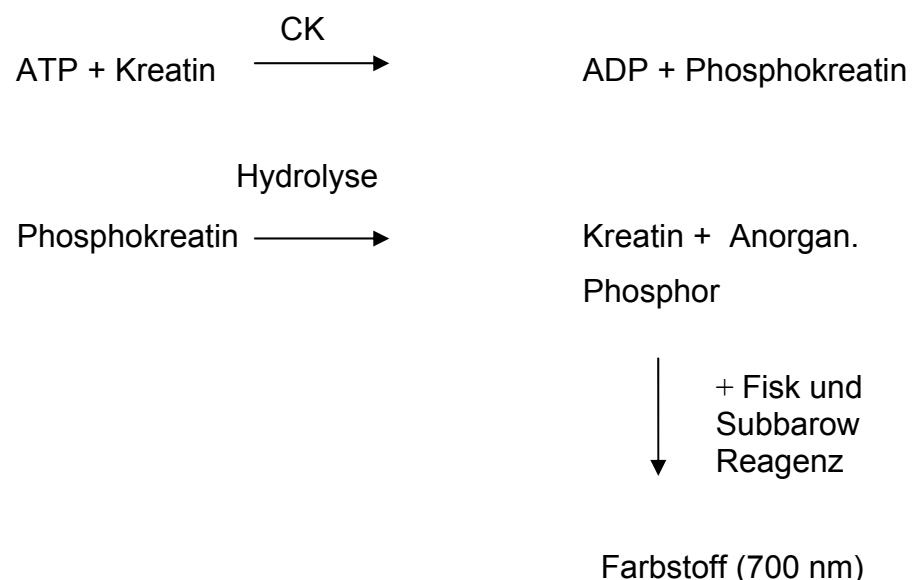


Abb. 3.5.: Prinzip der Aktivitätsbestimmung der Kreatinkinase.

3.6. Untersuchung verschiedener zellphysiologischer Parameter

3.6.1. Bestimmung der Zytotoxizität (LDH)

Zur Bestimmung der Zytotoxizität von Zellen in Monokultur fand der Cytotoxicity Detection Kit (LDH) der Firma Roche Verwendung. Ein Anstieg in der Menge von toten oder membrangeschädigten Zellen führt zu einer Erhöhung der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Aktivität in Zellkulturüberständen. Zur Bestimmung der LDH Aktivität wird bei diesem Test zunächst NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert und in einem zweiten Schritt das H/H^+ von einem Katalysator (Diaphorase) auf das Tetrazoliumsalz INT übertragen, welches dadurch zu Formazan reduziert wird und durch Absorptionsmessung bei 492nm nachgewiesen werden kann.

Die Bestimmung der LDH-Aktivität erfolgte nach der Anleitung der Firma Roche. Von jeder Kavität einer 6-Lochplatte wurden 500 μl des 1,5ml Zellkulturüberstandes (LDH-extern) in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde das restliche Medium abgesaugt und durch 1,5ml Medium, versetzt mit 2% Triton-X 100, ersetzt und 10 Minuten inkubiert. Danach wurden wiederum 500 μl des Überstandes (LDH-intern), der aufgrund der Permeabilisierung aller Zellen nun die gesamte in den Zellen zuvor vorhandene LDH enthielt, in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Der eigentliche Test fand dann als Dreifachbestimmung in einer 96-Loch-Platte statt. 100 μl der Überstände wurden hierbei mit 100 μl der LDH-Reagenz vermischt, für 30 Minuten bei RT inkubiert und abschließend die Absorption bei 492nm vermessen.

Zur Angabe der Zytotoxizität wurde der Quotient aus LDH-extern und Gesamt-LDH (LDH-extern + LDH-intern) gebildet.

3.6.2. Bestimmung der Zellproliferation (BrdU)

Der Einfluss der Transfektion mit verschiedenen siRNAs auf die Proliferationsrate von HaCat- und HelaS3-Monokulturen wurde mit dem BrdU-Proliferationstestsystem der Firma Roche in 6-Loch-Platten durchgeführt. Dieser Test basiert auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogen 5-Bromo-2'-desoxy-Uridin (BrdU) anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA. BrdU wird anschließend nach Fixierung der Zellen mit einem

spezifischen mit Peroxidase gekoppelten anti-BrdU-Antikörper durch eine Peroxidase-Substrat-Reaktion nachgewiesen.

Die Kultivierung der Zellen und die Transfektion mit siRNA erfolgte wie unter 3.3.3. beschrieben. 48 Stunden nach Transfektion erfolgte die Zugabe des BrdU-Markierungs-Reagenz und die Inkubation wurde für 24 Stunden fortgesetzt. Alle weiteren Schritte entsprachen dem vorgegebenen Roche-Protokoll und wurden bei RT durchgeführt (Roche, 2000). Nach der Fixierung der Zellen für 30 Minuten mit 1ml Fixans je Kavität wurden die Zellen 90 Minuten mit 1,5ml Anti-BrdU-POD-Lösung inkubiert, 3 mal mit 1,5ml Waschpuffer gewaschen und 30 Minuten nach Zugabe von 1ml Substratlösung bei 370nm Wellenlänge im Safire Fluoreszenz-Photometer gemessen.

3.6.3. Messung der JC-1 Fluoreszenz zur Bestimmung des Mitochondrien-Membran-Potentials ($\Delta\Psi$)

Zur Bestimmung des inneren mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) wurde das Fluorophor 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) verwendet. JC-1, das in die Mitochondrien permeiert, verändert je nach vorliegendem inneren Membranpotential des Mitochondriums seine Fluoreszenz-emissionswellenlänge von grüner Farbe in seiner monomeren Form bei niedrigem Potential (Emission 530nm) zu rot-orange bei seiner J-Aggregat-bildenden Form und vorliegendem hohem Potential (Emission 590nm). Die Exzitationswellenlänge liegt in beiden Fällen bei 485nm (Cossarizza *et al.*, 1993; Reers *et al.*, 1991; Salvioli *et al.*, 1997).

Nach Beendigung der dsRNA Transfektion (s. 3.3.3.2) wurden die Zellen zweifach mit PBS w/o gewaschen und im Anschluss 10 Minuten mit 1ml je Kavität JC-1 (10 μ g/ml Medium) in Medium bei 37°C inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte zweimaliges Waschen mit 2ml eiskaltem PBS, bevor die Zellen dann in 1ml eiskaltem PBS von der Plattenbodenseite im Fluoreszenzmessgerät Safire vermessen wurden. Eine Umrechnung der mit JC-1 quantifizierten Fluoreszenzdaten in absolute Potentialwerte in Millivolt mittels Nernst-Gleichung konnte nicht erfolgen, da weder intra- noch extramitochondriale Ionenkonzentrationen für die jeweils vorliegenden

Zellen ermittelt werden konnten. Daher wurde der relative Wert des Mitochondrienmembranpotentials als Quotient der erhaltenen hintergrundkorrigierten Fluoreszenzdaten (Ex 485nm, Em 590nm/Ex 485nm, Em 530nm) berechnet.

3.6.4. Bestimmung der Apoptose (Annexin V)

Apoptose ist ein physiologischer Prozess des selektiven Zelltodes, der während der embryonalen Entwicklung ebenso wie bei der Erhaltung der Gewebe-Homeostase auftritt. Die Apoptose ist dabei z.B. charakterisiert vom Verlust der Plasmamembran Asymmetrie, Kondensation des Zytoplasmas und des Kerns und dem Abbau der DNA. Der Verlust der Assymetrie der Plasmamembran ist hierbei einer der ersten Prozesse. In apoptotischen Zellen wird das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran transloziert, wodurch Phosphatidylserin der zellulären Umgebung exponiert wird. Annexin V ist ein 35-36kDa Ca^{2+} abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit einer starken Affinität für Phosphatidylserin. Somit kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppeltes Annexin-V zur Detektion von Phosphatidylserin und damit zur Bestimmung der Apoptoserate in einer durchflusszytometrischen Analyse eingesetzt werden. Zur Bestimmung der Apoptose wurde der Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I der Firma BD Biosciences nach deren Vorgaben verwendet.

Die Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion mit dsRNA (s. 3.3.3.2.) in 1x Trypsin/EDTA durch Inkubation für 10 Minuten bei 37°C vom Boden der 6-Loch-Platte gelöst, in Medium aufgenommen und in 15ml-Probenröhrchen überführt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 1500 UpM wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dazwischen ebenfalls für 10 Minuten bei 1500 UpM zentrifugiert. Nachdem die Zellen schließlich in 100µl 1x Bindungs-Puffer aufgenommen waren, wurden jeweils 5µl Annexin V-FITC und 5µl Propidiumjodid (PJ) dazupipettiert. PJ interagiert mit der DNA und gelangt dabei nur in die Zellen, wenn die Plasmamembran bereits aufgelöst ist. Somit markiert eine PJ Fluoreszenz bereits tote, also nicht mehr apoptotische Zellen. Nach sanftem Mischen der Proben, wurden diese bei RT im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert, weitere 400µl 1x Bindungspuffer zugegeben und die dann sofort durchflußzytometrisch im Calibur FACS-Gerät von Becton Dickinson analysiert.

3.7. Western-Blot-Analyse

Bei der Western-Blot-Analyse wird ein heterogenes Proteingemisch zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und danach auf eine geeignete Transfermembran übertragen. Hierbei entsteht eine exakte Replik des ursprünglichen Gels, wobei die aufgetrennten Proteine auf der Membran immobilisiert werden.

3.7.1. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Reibungskoeffizient und die Nettoladung eines Proteins bestimmen seine Wanderungsgeschwindigkeit während der Gelelektrophorese. Werden Proteine mit SDS behandelt, lagern sich SDS-Anionen proportional zum Molekulargewicht an die Proteine an und linearisieren diese aufgrund ihrer chaotropen Wirkung. Die natürliche Ladung der Proteine wird durch die wesentlich höhere Ladung der angelagerten SDS-Moleküle vernachlässigbar. Die Wanderungsgeschwindigkeit der denaturierten Proteine ist bei der SDS-PAGE dem Logarithmus ihrer Masse direkt proportional (Cooper, 1980).

Für die Auftrennung von Proteingemischen aus zytoplasmatischen Extrakten wurden Criterion™-Gele (10% Tris-HCl-Trenngele mit 4%-Sammelgelen) und eine entsprechende Elektrophorese-Apperatur der Firma Bio-Rad verwendet.

Verwendete Lösungen:

Elektrophorese-Puffer (10x):

250	mM	Tris/HCl, pH 8,8
1,9	M	Glycin
1%	(x/v)	SDS

Auftragspuffer (2x), reduzierend:

Laemmli-Puffer Sigma, München

Nach der Proteinbestimmung (s. 3.4.4.) wurden gleiche Mengen von Protein in Mikroreaktionsgefäßen lyophilisiert, mit reduzierendem Auftragspuffer im Verhältnis

1:1 vermischt und die Proteine bei 95°C für fünf Minuten denaturiert sowie Disulfidbrücken reduziert. Nach Abkühlung wurden die Proben und ein Proteinstandard bei 80V 20 Minuten in das Sammelgel einwandern lassen, wonach die eigentliche Elektrophorese ca. eine Stunde bei 180V betrieben wurde, bis die Bromphenolblau-Bande 0,5cm vor dem Gelende angelangt war (Laemmli, 1970).

3.7.2. Halb-Trocken-Blot

Die negative Ladung der SDS-beladenen Proteine lässt diese im elektrischen Feld zur Anode wandern. Beim Halb-Trocken-Blot befindet sich zwischen dem SDS-Gel und der Anode eine Nitrozellulose-Membran, die die Proteine immobilisiert, sobald diese auf sie treffen. Der Halb-Trocken-Blot wurde mit dem unten angegebenen Puffer in einer Blot-Apparatur der Firma Bio-Rad durchgeführt.

Der Zusammenbau des Blotes erfolgte luftblasenfrei. Der Proteintransfer wurde innerhalb von 1 Stunde bei einer Stromstärke von 120mA (ca. 1mA/cm²) durchgeführt. Für den Blot fand nur das Trenngel Verwendung.

Verwendete Puffer:

Blotting-Puffer:

1,3	mM	SDS
40	mM	Glycin
30	mM	Tris
20	%	Methanol

Aufbau des Halb-Trocken-Blots:

Kathode

3 Lagen Filterpapier, getränkt mit Blotting-Puffer

SDS-PAGE

Nitrozellulose-Membran, 5 Minuten äquilibriert in Blotting-Puffer

3 Lagen Filterpapier, getränkt mit Blotting-Puffer

Anode

3.7.3. Immunchemische Detektion

Die immunchemische Detektion des nachzuweisenden Proteins auf der Nitrozellulose-Membran erfolgte über indirekte Antikörpermarkierung. Als Detektionssystem wurden Peroxidase (POD)-gekoppelte sekundäre Antikörper verwandt. Bei der eigentlichen Detektion wurde Luminol als Substrat der POD umgesetzt, wobei Chemilumineszenz entstand. Diese Chemilumineszenz trat in den Bereichen der zu detektierenden Proteine auf der Membran auf und konnte mit dem Lumi-Imager der Firma Boehringer als distinkte Banden nachgewiesen werden. Zwischen Bandenintensität und Menge des nachzuweisenden Proteins besteht eine proportionale Beziehung.

Die Nitrozellulose-Membran wurde einmal kurz in PBS gewaschen und eine Stunde bei RT mit 5% Blocking-Reagenz abgesättigt. Die Antikörper-Lösung wurde in 5% Blocking-Reagenz verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgen drei zehnmütige Waschrinne mit PBS/Tween. Der sekundäre POD-gekoppelte Antikörper wurde ebenfalls in 5% Blocking-Lösung verdünnt und die Membran damit 45 Minuten bei RT geschwenkt. Es folgten wiederum zwei zehnmütige Waschrinne mit PBS/Tween und zwei weitere zehnmütige Waschrinne in PBS. Die Membran wurde abgetropft, fünf Minuten mit 10ml Luminolreagenz inkubiert und zur Detektion im Lumi-Imager zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Detektiert wurde mit Hilfe der LumiAnalyst-Software mit Expositionszeiten von einigen Sekunden bis zu einigen Minuten. Anschließend wurden die optische Dichte der Banden mit der oben genannten Software quantitativ ausgewertet.

Verwendete Lösungen:

Blocking-Reagenz (5%):

5%	(w/v)	Magermilchpulver
95%		Dulbecco´s PBS w/o (1x, fertig bezogen)

PBS/Tween:

0,1%	(v/v)	Tween-20
99,9%	(v/v)	Dulbecco´s PBS w/o (1x, fertig bezogen)

Luminolreagenz:

5 ml Substanz A
5 ml Substanz B
(frisch angesetzt nach Herstellerangaben)

Verwendete Antikörper:

anti-CK, BB, polyklonal, Kaninchen IgG Einsatzverdünnung 1:1000
anti-CT, polyklonal, Kaninchen IgG Einsatzverdünnung 1:1000
anti-CK, mitochondrial, Kaninchen IgG Einsatzverdünnung 1:500
Ziege anti-Kaninchen IgG, POD-konjugiert,
polyklonal Einsatzverdünnung 1:1000

3.8. Histologie

3.8.1. Anfertigung von Kryostatschnitten

Die histologischen Untersuchungen wurden an 7µm dicken Kryostatschnitten von Haut-Biopsien durchgeführt. Die Biopsien wurden über flüssigem Stickstoff in Einbettmedium (Tissue-Tek, Leica, Nussloch) eingefroren, bei -80°C gelagert und auf Trockeneis transportiert. Zum Schneiden wurde die eingebettete Biopsie mittels Einbettmedium auf einem Präparatehalter montiert. Das Schneiden der Probe erfolgte bei -30°C im Kryostaten. Die Kryostatschnitte wurden direkt vom Messer auf einen Poly-L-Lysin- beschichteten (s. 3.8.2.) Objektträger aufgezogen. Die Schnitte auf dem Objektträger wurden einige Minuten bei RT angetrocknet und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

3.8.2. Objektträgerbeschichtung

Zur Beschichtung wurden Objektträger zehn Minuten bei RT in einer Poly-L-Lysin-Lösung (Poly-L-Lysin 0,1%, in A. bidest. verdünnt) getaucht und im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

3.8.3. Aussaat von Zellen für die Immunzytochemie

Um Immunzytochemie an Zellen durchzuführen, wurden diese auf so genannten LabTeks ausgesät. Bei LabTeks handelt es sich um Glasobjektträger, auf denen mit Hilfe einer Silikondichtung Plastikkammern zur Inkubation von Zellen befestigt sind. Vor der Aussaat wurden die LabTeks mit Collagen beschichtet. Dazu werden 1ml Kollagenlösung 1:10 in 0,1%iger essigsaurer, steriler PBS-Lösung verdünnt und 250µl in jede Kammer eines 8-Loch LabTeks gegeben und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde die Kollagenlösung abgenommen und nach einer kurzen Trockenzeit einmal mit 300µl PBS gewaschen. Auf die so vorbereiteten LabTeks wurden die Zellen dann mit einer Dichte von 5000 bis 10000/cm² Zellen ausgesät.

3.8.4. Fixierung von Kryostatschnitten und Zellen

Für die indirekte Immunchemie wurden die 7µm dicken Kryostatschnitte (s. 3.8.1.), bzw. die Zellen auf den LabTeks zehn Minuten bei -20°C in Methanol/Aceton fixiert und anschließend dreimal zehn Minuten in PBS gewaschen. Diese Art der Fixierung führt zur Denaturierung von Proteinen und zur Permeabilisierung der Zellen. Letzteres ist insbesondere für den Nachweis von intrazellulären Strukturen wichtig, damit der entsprechende Antikörper zu seinem Epitop gelangen kann.

Verwendete Lösungen:

Methanol/Aceton:

50% (v/v) Aceton

50% (v/v) Methanol

3.8.5. Indirekte Immunchemie

Die Kreatinkinase BB (CK-BB), die mitochondriale Kreatinkinase (CK-mt) und der Kreatin-Transporter (CT) wurden über indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die entsprechenden Antigene wurden hierbei mit spezifischen Primärantikörpern (anti-CK-BB, anti-CK-mt, anti-CT) markiert. Die Primärantikörper ihrerseits wurden

über einen Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper fluoreszenzmikroskopisch detektiert.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Arbeitsschritte bei RT und die Antikörperinkubation in der feuchten Kammer, bei Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern zusätzlich im Dunkeln.

Antikörper-Markierung

Antikörper neigen wie alle übrigen Proteine dazu, unspezifisch an zelluläre Strukturen zu adhären. Diese unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen können durch Vorinkubation mit anderen Proteinen, gegebenenfalls mit Proteinen aus der „natürlichen“ Umgebung des jeweiligen Antikörpers verringert werden. Meistens ist dabei bovines Serumalbumin (BSA) zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen ausreichend.

Die fixierten Schnitte und Zellen wurden zunächst eine Stunde mit 1% BSA (w/v) in PBS abgesättigt. Nach der Absättigung wurde die Lösung abtropfen lassen und die verbleibende Flüssigkeit vorsichtig entfernt. Der primäre Antikörper wurde entsprechend der optimalen Einsatzkonzentration in 0,1% BSA verdünnt und die Lösung bei 4°C gelagert. Etwa 100µl der Antikörperlösung wurden auf den Schnitt bzw. etwa 200µl je Kammer eines LabTeks aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgten drei zehnmütige Waschriffe mit PBS und das oben beschriebene Abtropfen der Objektträger. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls auf seine optimale Einsatzkonzentration eingestellt und mit einem Volumen von ca. 100 bzw. 200µl für die Dauer von einer Stunde auf die Schnitte bzw. Zellen aufgebracht. Danach wurden die Schnitte wiederum dreimal zehn Minuten mit PBS gewaschen.

Für die Hintergrundbestimmung wurden zusätzlich Schnitte angefertigt, die nicht mit dem spezifischen ersten Antikörper markiert, ansonsten aber gleich behandelt wurden.

Indirekte Immunfluoreszenz:

Die fertig markierten Präparate wurden nach den Waschriffen abgetropft, von überschüssiger Flüssigkeit befreit und mit Mowiol-Eindeckmedium (s. 3.8.6.) und

einem Deckglas eingedeckt. Danach wurden die Objektträger bei 4°C im Dunkeln gelagert und innerhalb von 24 Stunden mikroskopiert.

Verwendete Antikörper:

anti-CK, BB, polyklonal, Kaninchen IgG	Einsatzverdünnung 1:1000
anti-CT, polyklonal, Kaninchen IgG	Einsatzverdünnung 1:1000
anti-CK, mitochondrial, Kaninchen IgG	Einsatzverdünnung 1:500
anti-Lamin A/C, Maus monoklonal, SC-7292	Einsatzverdünnung 1:500
anti-Mitochondria, monoclonal, Maus, IgG	Einsatzverdünnung 1:500
Ziege anti-Kaninchen IgG, AlexaFluor™488 konjugiert, polyklonal	Einsatzverdünnung 1:1000
Ziege anti-Maus IgG, AlexaFluor™488 konjugiert, polyklonal	Einsatzverdünnung 1:1000
Ziege anti-Maus IgG, AlexaFluor™546 konjugiert, polyklonal	Einsatzverdünnung 1:1000

3.8.6. Herstellung von Mowiol-Eindeckmedium

12g Mowiol wurden in 30ml A. bidest. eingerührt. Anschließend wurde unter Rühren 60ml 0,2M Tris/HCl zugegeben und der pH-Wert auf 8,5 eingestellt. Diese Lösung wurde auf 100ml mit A. bidest aufgefüllt und über Nacht bei RT gerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung für 45 Minuten auf 90°C erhitzt, auf 50°C abgekühlt und 30g Glycerin eingerührt. Die Lösung wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

3.8.7. Bildanalytische Dokumentation

Die fluoreszenzmarkierten Schnitte wurden mit dem Axiovert S100 mikroskopiert und repräsentative Aufnahmen mit der Intas-Videokamera und der Aufnahmesoftware Kamera-Control bzw. mit der ColourViewII Digitalkamera und der Software AnalySIS angefertigt.

Gleichzeitig wurden Durchlichtaufnahmen der gleichen Schnittbereiche angefertigt.

3.9. Elektronenmikroskopie

3.9.1. Fixierung und Einbettung der Zellen

Die Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion mit dsRNA (s. 3.3.3.2.) einmal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend eine Stunde bei 4°C in 1ml Gemisch von ITO und Cacodylatpuffer im Verhältnis 1:1 fixiert. Nachdem die Zellen in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1500 UpM für 10 Minuten zentrifugiert worden waren, wurden diese 4 mal mit 1ml 0,1M Cacodylatpuffer für 10 Minuten gewaschen und jeweils erneut bei 1500 UpM für 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde für 1 Stunde mit 1ml Osmium-Fixierungs-Lösung nachfixiert und mehrmals mit A. bidest. gewaschen.

Anschließend folgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (s. Tab. 3.9.1.).

Ethanol 50%	10 Minuten
Ethanol 70%	Zweimal 10 Minuten
Ethanol 90%	Zweimal 10 Minuten
Ethanol absolut	Zweimal 10 Minuten

Tab. 3.9.1.: Entwässerung der für Elektronenmikroskopie fixierten Zellen

Für die Einbettung wurden die Zellen dann zweimal für 10 Minuten mit Propylenoxid und eine Stunde in einem Gemisch aus Propylenoxid und Epon-Gebrauchslösung im Verhältnis 1:1 inkubiert und schließlich über Nacht in Epon offen stehen gelassen, damit das Propylenoxid verdampfen konnte.

Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in einem Epontropfen vorsichtig in eine Gelatine kapsel überführt, für zwei Stunden bei 60°C inkubiert und die Kapsel mit Epon aufgefüllt. Nach einer Aushärtzeit von 72 Stunden bei 60 °C und Auflösen der

Gelatinekapseln in heißem Wasser, waren die eingebetteten Zellen fertig zum Schneiden.

Verwendete Lösungen:

ITO	s. 2.3.6.
Cacodylatpuffer 0,2M	s. 2.3.6.
Osmium-Fixierungs-Lösung	s. 2.3.6.
p-Dimethylaminomethylphenol	s. 2.3.6.
Propylenoxid	s. 2.3.6.
Epon-Gebrauchslösung	s. 2.3.6.

3.9.2. Ultradünnschnitte und Mikroskopie

Die Ultradünnschnitte der eingebetteten Zellen (s. 3.9.1.) wurden im Zentrallabor für Elektronenmikroskopie am Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie der Phillips-Universität Marburg auf dem Mikrotom Ultracut FC 4E der Firma Reichert-Jung angefertigt.

Die fertigen Schnitte wurden dann an einem Zeiss EM109 Elektronenmikroskop in Vergrößerungen von 3000 bis 30000fach mikroskopiert und Fotos auf einem Schwarzweißfilm (Macophot ORT25c) angefertigt.

3.10. Reverse-Transkriptase Polymerasen-Ketten-Reaktion

Für alle Arbeiten mit RNA wurden sterile Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser eingesetzt. Für DEPC-Wasser wurde 1ml DEPC auf 1l A. bidest. gegeben, die Lösung über Nacht bei RT gerührt und anschließend für 30 Minuten autoklaviert.

3.10.1. Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte nach dem Protokoll für RNA-Isolierung mit RNAzol™ B der Firma Wak Chemie.

Die Homogenisation der Zellen erfolgte nach einmaligem Waschen mit PBS in 0,5ml RNAzol™ B je Kavität einer 6-Loch-Platte, in der Zellen, wie unter 3.2.2. und 3.2.3. beschrieben, angezogen worden waren. Die Zellen wurden in dem RNAzol™ B mit einem Zellscraper vom Boden gelöst und nach mehrmaligem auf- und abpipettieren in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Phasen durch Zugabe von 100µl Chloroform separiert. D.h. zunächst wurde für 30 Sekunden mit dem Vortexer jede Probe mit dem Chloroform gründlich durchmischt, die Proben für 5 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 4°C und 12000g zentrifugiert. Die so gebildete obere, wässrige Phase wurde in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500µl Isopropanol und Inkubation für 15 Minuten bei 4°C gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 12000g wurde der Überstand der präzipitierten RNA entfernt und zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, wobei zwischen den Waschsritten jeweils für 8 Minuten bei 4°C und 7500g zentrifugiert wurde. Das RNA-Pellet wurde nach dem letzten Waschschrift vorsichtig antrocknen gelassen, in 40µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Konzentration der in DEPC-Wasser gelösten RNA wurden 2µl der RNA-Lösung in 200µl TE-Puffer aufgenommen und photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm in einer Quarzglas-Küvette im Spectra Max Photometer ausgemessen. Der ermittelte Wert wurde mit 40 multipliziert. Dies entspricht der Konzentration der RNA in µg/2µl der RNA-Ausgangslösung. In der RT-PCR (s. 3.10.2.) wurden 100pg der RNA eingesetzt.

3.10.2. Reverse-Transkriptase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion (PCR) dient der *in vitro* Amplifikation definierter cDNA-Abschnitte aus geringen DNA-Ausgangsmengen. Notwendig sind für die Reaktion sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer), die sich jeweils am 5'- und 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Abschnitte (Templates) anlagern können. Das

Grundprinzip der PCR unterteilt sich in drei Reaktionsschritte, wobei im ersten Schritt die doppelsträngige DNA denaturiert wird, im zweiten Schritt sich Primer an die einzelsträngige DNA anlagern („annealing“) und im dritten Reaktionsschritt die DNA-Polymerase, ausgehend von den angelagerten Primern, komplementäre DNA-Stränge synthetisiert („Extension“).

Bei der RT-PCR-Reaktion ist der eigentlichen PCR-Reaktion noch die Umsetzung der RNA in cDNA vorgeschaltet. Dieser Prozess wird reverse Transkription (RT) genannt und wird von dem Enzym Reverse-Transkriptase durchgeführt.

In dem hier verwendeten SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq System finden die RT-Reaktion zur Generierung der cDNA aus RNA und die anschließende Vervielfältigung dieser DNA mittels PCR in einem Reaktionsansatz mit den gleich genspezifischen Primern statt. Hierzu liegen im RT/Platinum® Taq Mix eine Mischung von SuperScript™ II Reverse-Transkriptase und Platinum® Taq DNA Polymerase, welche von einem Antikörper inhibiert wird, vor.

Die RNA wurde in einer Menge von 100pg eingesetzt und die Reaktionsansätze entsprechend der unten angeführten Tabelle gründlich vermischt und vor Beginn der RT-PCR-Reaktion kurz anzentrifugiert. Zunächst erfolgte die Transkription der RNA bei 42°C von den spezifischen Primern ausgehend (wie bei der PCR beschrieben), durch die Reverse-Transkriptase. Danach wurde durch den ersten Denaturierungsschritt der neusynthetisierten cDNA gleichzeitig der Antikörper inaktiviert und damit die Aktivierung der Platinum® Taq DNA Polymerase herbeigeführt. Diese führte dann mit den gleichen Primern nach dem weiter unten aufgeführten Programm in 40 Zyklen die PCR-Reaktion (s. oben) zur Vervielfältigung der DNA durch. Nach weiteren 10 Minuten bei 72°, in denen die Synthese noch unfertiger cDNA-Kopien abgeschlossen wurde, wurden die Proben dann auf 6°C abgekühlt und anschließend bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz:

2fach Reaction Mix	25µl
Template RNA	100pg
Sense Primer (10µM)	1µl
Anti-sense Primer (10µM)	1µl
RT/Platinum® Taq Mix	1µl
A. bidest.	auf 50 µl auffüllen

Programm des Thermocyclers:

- | | | | | | |
|----|------|-----|----|-----------|-------------|
| 1. | 42°C | für | 30 | Minuten | |
| 2. | 94°C | für | 2 | Minuten | |
| 3. | 94°C | für | 30 | Sekunden | } 40 Zyklen |
| 4. | 55°C | für | 30 | Sekunden | |
| 5. | 72°C | für | 1 | Minute | |
| 6. | 72°C | für | 10 | Minuten | |
| 7. | 6°C | | | unendlich | |

3.10.3. Agarose-Gel-Elektrophorese

DNA kann in einem elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden. Hierzu wird die DNA auf ein so genanntes Agarosegel aufgetragen. Im elektrischen Feld wandert die durch ihre Phosphatgruppen negative geladene DNA durch das Gel zur positiven Elektrode.

Kleine Bruchstücke bewegen sich schneller durch das poröse Gel als größere. Dadurch werden die DNA-Fragmente, nach Größe sortiert, aufgetrennt.

Verwendete Lösungen und Chemikalien:

1fach TBE (Tris-Borat-EDTA):

verdünnt aus 5fach TBE (s. 2.3.8.) mit A. bidest.

1fach TAE	s. 2.3.8.
DNA Probenpuffer	s. 2.3.8.
100bp Größenmarker	s. 2.3.8.
Ethidiumbromidlösung EtBr (10 mg/ml)	s. 2.3.8.
Agarose	s. 2.3.8.

Nach Abwiegen der entsprechenden Menge Agarose (1% w/v) wurde diese in einem Erlenmeyerkolben mit 1fach TBE (Menge je nach Größe des Gels) gemischt, in der Mikrowelle aufgekocht und der Flüssigkeitsverlust beim Kochen mit A. bidest.

ausgeglichen. Dann wurde das Gel in einen Gelträger mit zuvor eingesetztem Probenkamm gegossen und bei RT erstarren gelassen. Nach Platzierung des Gels in der mit 1fach TBE-Puffer gefüllten Gelkammer wurden die vorbereiteten Proben (mit DNA Probenpuffer im Verhältnis 1 zu 10 gemischt) in die durch Entfernung des Kammes entstandenen Geltaschen pipettiert. Es wurde je nach Größe der aufzutrennenden Gele für 2-3 h eine Spannung von 70V angelegt.

Für die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde statt TBE-Puffer der oben aufgeführte TAE-Puffer eingesetzt (s. 3.10.4.).

3.10.4. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen fand der S.N.A.P.™ Gel Purification Kit der Firma Invitrogen Verwendung. Da Borat mit dem im Kit verwendeten Natriumiodid interferiert, wurde bei der Agarosegelelektrophorese TAE statt TBE eingesetzt (s. 3.10.3.). Die bei der RT-PCR (s. 3.10.2.) entstandenen DNA-Fragmente wurden daher in einem TAE-Gel (s. 3.10.3.) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Danach wurden die entscheidenden Banden aus dem Agarosegel auf einem UV-Schirm ausgeschnitten und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß abgewogen. Zu 100µg des Gels wurden 250µl der 6,6M Natrium-Jodid-Lösung gegeben, gründlich gevortext und bei 45°C für ca. 5 Minuten inkubiert, bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Danach wurde bei RT 525µl Bindungs-Puffer zugegeben und gut durchmischt.

Nach Zusammensetzen der S.N.A.P.™ Aufreinigungs-Säule und des Sammelgefäßes, wurden die DNA-Agarose-Lösung (875µl) auf die Säule gegeben und bei 3000g für 30 Sekunden zentrifugiert. Die Flüssigkeit aus dem Sammelgefäß wurde dann noch zweimal auf die Säule gegeben und zentrifugiert, um sicherzustellen, dass die gesamte DNA an dem Säulenmaterial gebunden hat. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die Flüssigkeit verworfen und die Säule zweimal mit 400µl 1fach Waschlösung gewaschen und zentrifugiert. Nachdem auch die Waschlösung verworfen worden war, erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 Minute bei 10000g, um die Restflüssigkeit aus der Säule zu entfernen. Anschließend wurde die Säule auf ein steriles 1,5ml Reaktionsgefäß gesetzt und 40µl steriles Wasser auf die Säule gegeben, eine Minute bei RT inkubiert und dann für eine

Minute bei 10000g zentrifugiert. Das Reaktionsgefäß mit der DNA-Lösung wurde sofort auf Eis gestellt bzw. zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

Ein 2 µl Aliquot der Lösung wurde dabei 1:200 in TE verdünnt und die Konzentration der DNA photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Die so bestimmten Messwerte wurden mit dem konstanten Wert 50 und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und erhielt so die Menge an DNA in µg.

3.10.5. Restriktions-Verdau

Beim Restriktions-Verdau wird mit Hilfe von aus Bakterien isolierter Enzyme DNA an genau definierten Stellen geschnitten. Die unterschiedlichen Enzyme erkennen jeweils spezifische DNA Sequenzen. Durch Auswahl bestimmter Enzyme lässt sich somit eine DNA in exakt definierte Bruchstücke zerschneiden.

Verwendete Lösungen:

10x Reaktionspuffer für Restriktionsenzyme	s. 2.3.8.
Restriktionsenzyme	s. 2.3.8.

Es wurde ein Gesamtreaktionsvolumen von 15µl für den analytischen Verdau gewählt. Dabei wurden 5µl der RT-PCR-Produkte, 1,5µl des jeweiligen Reaktions-Puffers und 7,5µl A. bidest. vermischt. Vor Zugabe des Enzyms wurde der Reaktionsansatz gründlich gevortext und kurz zentrifugiert. Danach wurde nur noch vorsichtig mit der Pipettenspitze durchmischt, um die Restriktionsenzyme zu schonen. Bei der Menge der verwendeten Enzyme ist zu beachten, dass bei einem analytischen Verdau nur 1µl verwendet wurde, um inhibitorische Effekte einer zu hohen Glyzerolkonzentration zu vermeiden. Die Reaktionsansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

4. Ergebnisse

4.1. Kreatinkinase und Kreatintransporter in humaner Haut

Zunächst wurde das Vorkommen des Kreatinkinase-Systems mit immunhistologischen Untersuchungen und Western-Blot-Analysen in humaner Haut untersucht.

4.1.1. Histologische Untersuchungen

In den immunhistologischen Untersuchungen an humaner Haut und primären, humanen Keratinozyten wurden die Kreatinkinase-Isoformen CK-BB und CK-mt sowie der Kreatinkinase-Transporter CT detektiert.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Gefriermikrotom-Schnitten gesunder, humaner Haut sind in Abb. 4.1.1.a dargestellt. Die Durchführung der Antikörperfärbungen erfolgte hierbei wie unter 3.8.5. beschrieben.

Sowohl für die zytosolisch vorkommende CK-BB (**A**), als auch für die mitochondriale CK-mt (**B**) lässt sich eine deutliche Lokalisation in der Epidermis (**Ep**) erkennen. Die Immunfluoreszenz ist hierbei jeweils im gesamten Zellinhalt der Keratinozyten, mit Ausnahme der noch deutlich erkennbaren Zellkerne, verteilt. Dieses spricht für eine zytosolische bzw. in Organellen-organisierte Lokalisation. Bei beiden Isoformen kann zudem eine teilweise stärkere Färbung im Bereich der basalen und suprabasalen Keratinozyten beobachtet werden.

Die Immunfluoreszenz-Färbung gegen den CT (**C**) ergibt hingegen eine deutliche Anfärbung der Plasmamembranen der Keratinozyten. Besonders gut lässt sich hierbei das Abflachen der Keratinozyten im Zuge der terminalen Differenzierung beobachten. Zudem scheinen die basalen Keratinozyten nur im apikalen und nicht im basalen Bereich den CT zu exprimieren.

Die Negativkontrolle mit dem Zweitantikörper (**D**) zeigt keine spezifischen Signale.

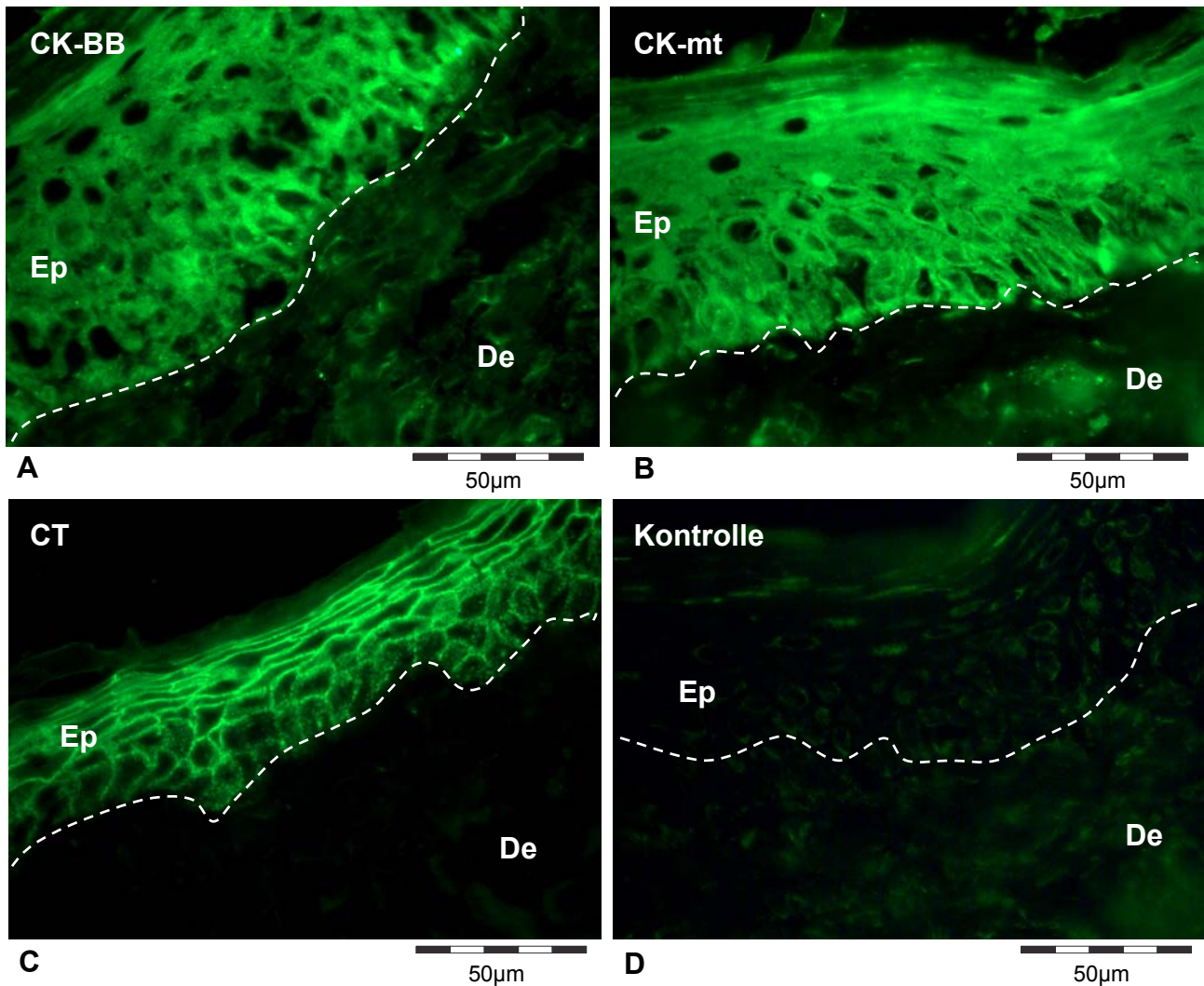


Abb. 4.1.1.a: Immunhistochemie humaner Haut

Immunfluoreszenzbilder von Gefriermikrotom-Schnitten ($7\mu\text{m}$) gesunder, humaner Haut-Biopsien sind dargestellt. Die Schnitte wurden mit polyklonalen (Kaninchen) Antikörpern gegen die Kreatin-kinase-Isoformen CK-BB (A), CK-mt (B) und den Kreatintransporter CT (C) markiert. Die entsprechende Negativkontrolle ist in D dargestellt. Als Zweitantikörper fand ein Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor®488-Konjugat Verwendung.

Ep: Epidermis; **De:** Dermis; - - -: Grenze zwischen Epidermis und Dermis; Balken = $50\mu\text{m}$

Neben den Immunfluoreszenz-Untersuchungen an Gefrierschnitten wurden auch immunocytochemische Untersuchungen an primären, humanen Keratinozyten durchgeführt. Die auf LabTeks ausgesäten (s. 3.8.3.) Keratinozyten wurden nach der Fixierung (s. 3.8.4.), wie unter 3.8.5. beschrieben, mit Antikörpern gegen CK-BB und CK-mt markiert (s. Abb. 4.1.1.2.). Zur Kolokalisation mit den Mitochondrien fand ein

spezifischer Antikörper gegen Mitochondrien Verwendung. Bei der Färbung gegen CK-BB (A) zeigt sich eine zytosolische, gleichmäßig in der Zelle verteilte Grünfluoreszenz (C), die kaum Überlappung mit der rot markierten Mitochondrien (B) erkennen lässt.

Bei der Färbung gegen CK-mt (D) lässt sich dagegen vermehrt eine Überlappung (gelb) der grünen, CK-mt-Fluoreszenz (F) und der roten Mitochondrienfärbung (E) erkennen. Sowohl die Mitochondrien, als auch die CK-mt zeigen hier im Vergleich zur CK-BB eine vor allem um den Zellkern konzentrierte Lokalisation (s. Pfeile). Dieses spricht für die Lokalisation der CK-mt in den Mitochondrien.

Die Negativkontrolle mit dem Zweitantikörper (G) zeigt keine spezifischen Signale.

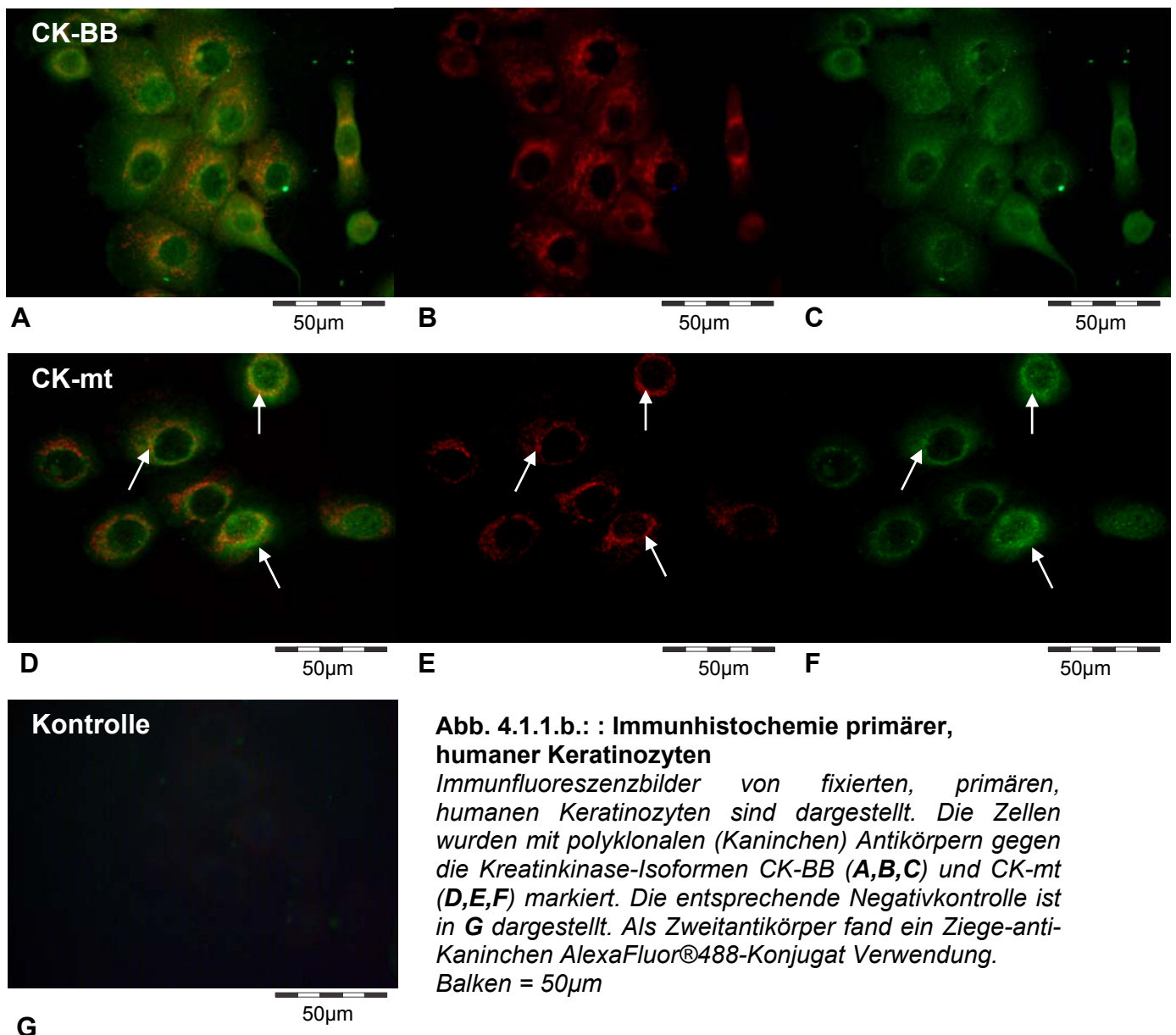


Abb. 4.1.1.b.: Immunhistochemie primärer, humaner Keratinozyten

Immunfluoreszenzbilder von fixierten, primären, humanen Keratinozyten sind dargestellt. Die Zellen wurden mit polyklonalen (Kaninchen) Antikörpern gegen die Kreatinkinase-Isoformen CK-BB (A,B,C) und CK-mt (D,E,F) markiert. Die entsprechende Negativkontrolle ist in G dargestellt. Als Zweitantikörper fand ein Ziege-anti-Kaninchen AlexaFluor®488-Konjugat Verwendung. Balken = 50µm

4.1.2. Western-Blot-Analyse

In weiteren Untersuchungen sollten die Kreatinkinasen CK-BB und CK-mt sowie der Kreatintransporter CT auch mit der Western-Blot-Analyse in humaner Haut bzw. primären, humanen Keratinozyten nachgewiesen werden.

Zum Nachweis des Kreatintransporters CT wurden Proteinextrakte aus Saugblasen (s. 3.4.4.) verschieden behandelter, humaner Hautareale gewonnen. Hierzu wurde ein unbehandeltes, ein mit einer Placebo-Formulierung und ein mit einer 0,1% Kreatin enthaltenden Formulierung für eine Woche topisch behandeltes Hautareal des distalen Oberarms miteinander verglichen. Abbildung 4.1.2.a. zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse (s. 3.7.). Bei allen Proben ist eine deutliche Bande bei ca. 70kDa zu erkennen, das der aus der Sequenz des Kreatintransporters theoretisch berechneten Proteingröße (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html) entspricht. Die entsprechende Negativkontrolle ohne Primär-Antikörper blieb ohne Signal.

Bei gleich aufgetragener Proteinmenge (10µg) lässt sich hierbei kein Unterschied in der Proteinexpression zwischen den einzelnen Proben erkennen.

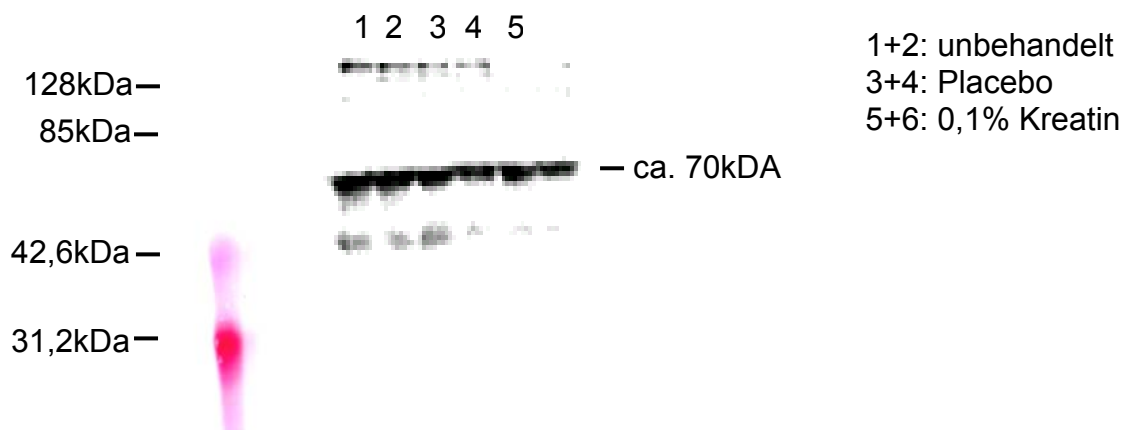


Abb. 4.1.2.a.: Western-Blot-Analyse des CT an Saugblasen-Epidermis

Proteinextrakte (jeweils 10µg) aus Saugblasenepidermis verschieden behandelter, humaner Hautareale eines Probanden wurden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und der CT mittels eines Anti-CT-Antikörpers nachgewiesen. In Spur 1 und 2 sind Proteine aus einem unbehandelten, in Spur 3 und 4 aus einem mit Placebo und in Spur 5 und 6 aus einem mit 0,1% Kreatin behandelten Hautareal aufgetragen. Als Größenstandard wurde der Kaleidoskop-Marker von Biorad eingesetzt.

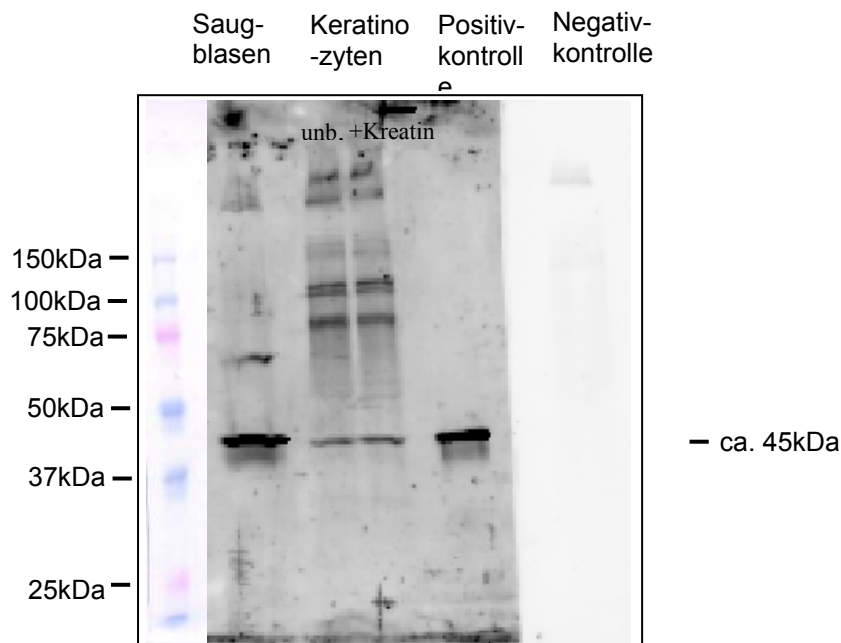
Neben dem Nachweis der Expression des CT in humaner Haut durch Immunhistochemie (s. 4.1.1.a.) und Western-Blot-Analyse, wurde die Funktionalität

des Kreatintransporters *in vitro* durch Aufnahme-Experimente mit radioaktiv markiertem Kreatin untersucht (s. 4.1.3.).

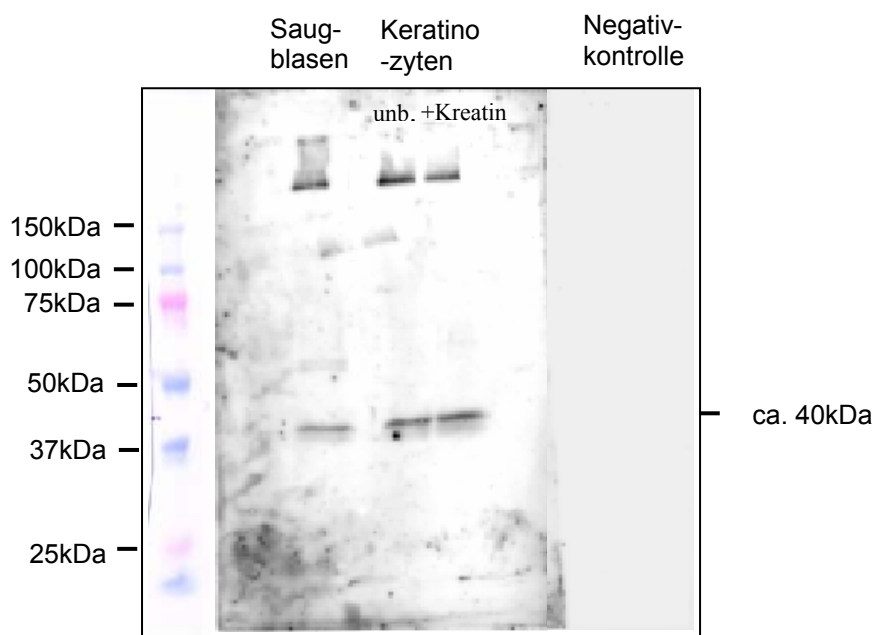
Zum Nachweis der beiden Kreatinkinase-Isoformen CK-BB und CK-mt wurden Western-Blot-Analysen (s. 3.7.) mit Proteinextrakten aus Saugblasen-Epidermis (s. 3.4.4.) von unbehandelter Haut und von zytoplasmatischen Extrakten (3.4.1.) von Keratinozyten durchgeführt.

In Abbildung 4.1.2.b und c. sind die Ergebnisse dieser Western-Blot-Analysen dargestellt. Sowohl in Saugblasen, als auch in Keratinozyten lassen sich CK-BB und CK-mt nachweisen. CK-BB liefert hierbei ein Signal bei ca. 45kDa, welches der theoretischen Größe des CK-B-Monomers entspricht (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html). Die Positivkontrolle (humane CK-BB der Firma Sigma, München) zeigt ein Signal von derselben Größe. Daneben lassen sich nur bei den Keratinozyten auch noch höhermolekulare Banden (ca. 90 und 130kDa) erkennen. Bei der Bande um 90kDa könnte es sich um nicht vollständig denaturierte Dimere der CK-BB halten. Bei der Western-Blot-Analyse gegen CK-mt lässt sich dagegen jeweils eine Bande bei ca. 40kDa erkennen. Bei den höher molekulare Banden (größer 150kDa) könnte es sich um ebenso um unspezifische Kreuzreaktivität mit nur schlecht in diesem Gel laufendenden Proteinen oder möglicherweise auch um nicht vollständig denaturierte Okatamer der CK-mt handeln. Die entsprechenden Negativkontrollen ohne Primär-Antikörper zeigen kein Signal.

Bei beiden Blots lassen sich keine Unterschiede in der Expression der CK-BB und CK-mt bei unbehandelten und für 24 Stunden mit 150 μ M Kreatin vorinkubierten Keratinozyten (s. 3.3.1.) beobachten.



b



c

Abb. 4.1.2. b und c: Western-Blot-Analyse der CK-BB (b) und CK-mt (c) an Saugblasen-Epidermis und an zytoplasmatischen Extrakten von Keratinozyten

Proteinextrakte (jeweils 15µg für CK-BB und 10µg für CK-mt) aus Saugblasenepidermis unbehandelte, humaner Haut und zytoplasmatische Extrakte von Keratinozyten wurden in einem 10%igen Tris-HCl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und die CK-BB (b) und CK-mt (c) mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen. In beiden Blots (b und c) wurden in der ersten Spur Extrakte aus Saugblasen-Epidermis und in den beiden folgenden Spuren Extrakte aus Keratinozyten (links: unbehandelt: **unb.**; rechts: mit 150µM Kreatin vorinkubiert: **+Kreatin**) aufgetragen. In b wurde zusätzlich als Positivkontrolle isolierte CK-BB eingesetzt. Daneben befindet sich die Negativkontrolle ohne Primär-Antikörper.

Als Größenstandard wurde der Dual-Colour-Precision-Plus von Biorad eingesetzt.

4.1.3. Kreatin-Aufnahme in vitro

Um die Funktionalität des Kreatintransporters zu überprüfen, wurden Fibroblasten und Keratinozyten *in vitro* mit ^{14}C -markiertem Kreatin inkubiert und die Aufnahme gemessen. Danach wurde mit 1mCi/ml ^{14}C -markiertem Kreatin für 0, 20, 30 und 60 Minuten inkubiert (s. 3.3.2.). Als Kontrolle wurde nach 20-minütiger Inkubation 2mM Guanidinopropionsäure GPA, ein kompetitiver Inhibitor des CT, zugegeben. Die im Szintillationszähler gemessenen Werte der zytoplasmatischen Extrakte wurden anschließend auf ihren Proteingehalt relativiert.

Abbildung 4.1.3.a. zeigt die Aufnahmekurve des ^{14}C -markierten Kreatin in Keratinozyten (Doppelbestimmung). Es lässt sich ein starker Anstieg des in die Zellen aufgenommenen radioaktiven Kreatins beobachten, der auch nach 60 Minuten noch keine Sättigung erkennen lässt. Die Zugabe des spezifischen Inhibitors GPA führt zu einer deutlich verlangsamten Kreatin-Aufnahme.

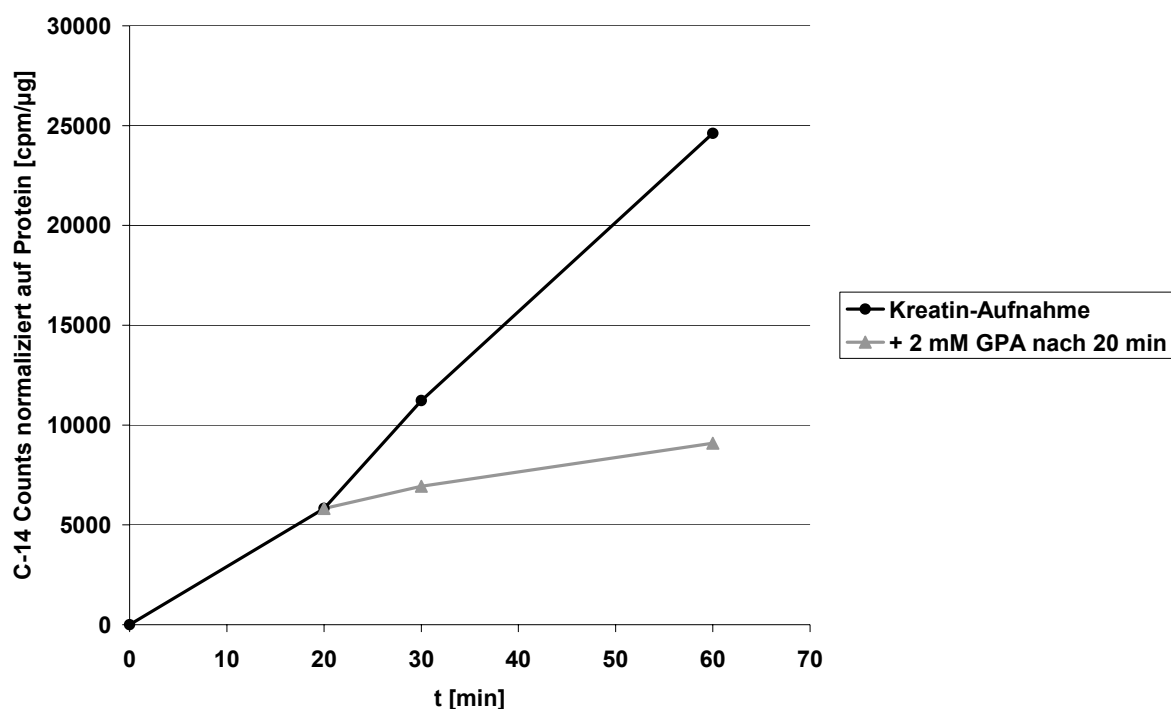


Abb. 4.1.3.a.: Aufnahme von ^{14}C -markiertem Kreatin in Keratinozyten

Primäre, humane Keratinozyten wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und für 0, 20, 30 und 60 Minuten mit ^{14}C -markiertem Kreatin inkubiert. Zu einem Teil der Zellen wurde nach 20 Minuten 2mM GPA zugegeben. In den Zell-Extrakten wurde darauf die ^{14}C -Aktivität mit einem Szintillationszähler gemessen und die Daten auf den Proteingehalt relativiert.

Abbildung 4.1.3.b. zeigt die Aufnahmekurve des ^{14}C -markierten Kreatin in Fibroblasten (Doppelbestimmung). Ebenfalls lässt sich ein Anstieg des in die Zelle aufgenommenen radioaktiven Kreatins beobachten, der allerdings nach 60 Minuten bereits eine Sättigung erkennen lässt. Zudem sind die gemessenen Aktivitäten um ein Vielfaches (ca. 10fach) geringer als bei den Kreatinozyten.

Die Zugabe des spezifischen Inhibitors GPA führt hier nicht nur zu einer deutlich verlangsamten Aufnahme, sondern zunächst sogar zu einem Absinken im intrazellulären Gehalt an radioaktivem Kreatin.

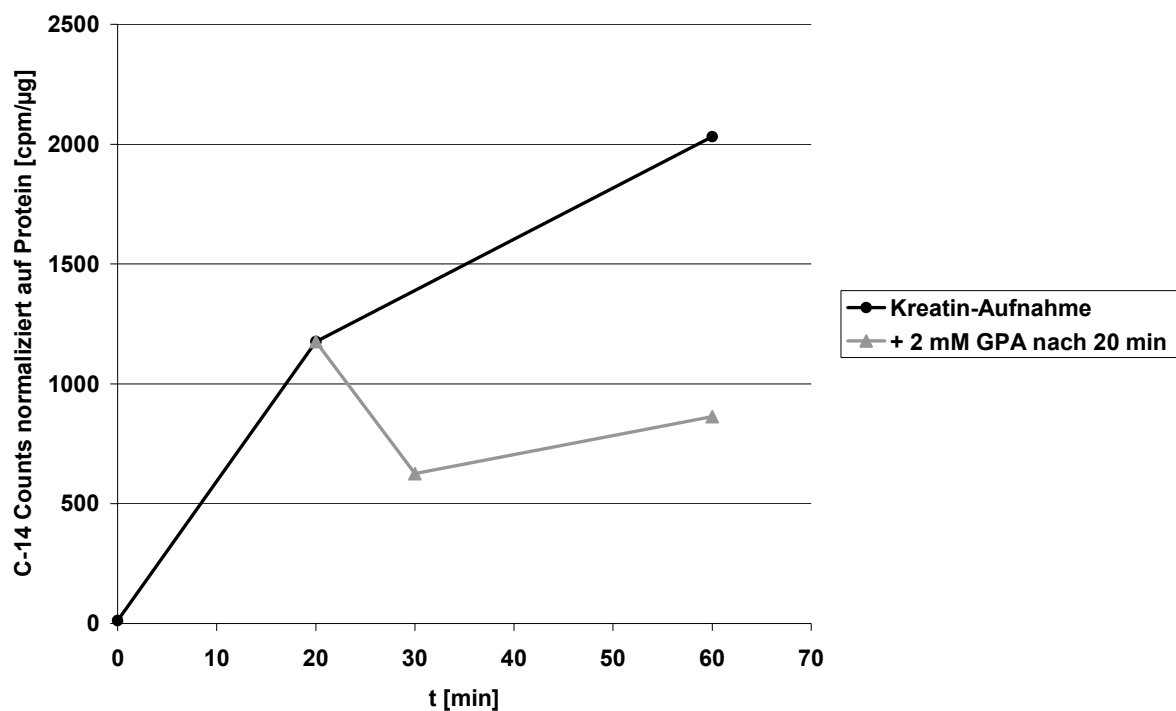


Abb. 4.1.3.b.: Aufnahme von ^{14}C -markiertem Kreatin in Fibroblasten

Primäre, humane Fibroblasten wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und für 0, 20, 30 und 60 Minuten mit ^{14}C -markiertem Kreatin inkubiert. Zu einem Teil der Zellen wurde nach 20 Minuten 2mM GPA zugegeben. In den Zell-Extrakten wurde darauf die ^{14}C -Aktivität mit einem Szintillationszähler gemessen und die Daten auf den Proteingehalt relativiert.

4.2. Kreatinkinase-Aktivitäts-Messung

Zur Messung der Kreatinkinase-Aktivität (s. 3.5.) wurden zytoplasmatische Extrakte verschiedener primärer, humaner Zelltypen, unterschiedlicher Spenderalter und mit bzw. ohne Kreatin-Vorinkubation verwendet. Um die in dem Test gemessenen Absorptionswerte bei 720nm in Bezug zu dem im Assay gebildeten, anorganischen Phosphat zu setzen, wurde zunächst eine Eichkurve ermittelt (s. Abb. 4.2.). Die Eichgerade ($y=0,0209x$) wurde im folgenden zur Berechnung des im Kreatinkinase-Test umgesetzten Phosphats verwendet. Die berechneten Phosphat-Werte wurden dann wiederum anhand einer vom Hersteller (Sigma, München) zur Verfügung gestellten Tabelle (s. Anhang) in Enzym-Einheiten EU umgerechnet. 1EU der Kreatinkinase setzt dabei ein μmol Phosphokreatin pro Sekunde bei 25°C um.

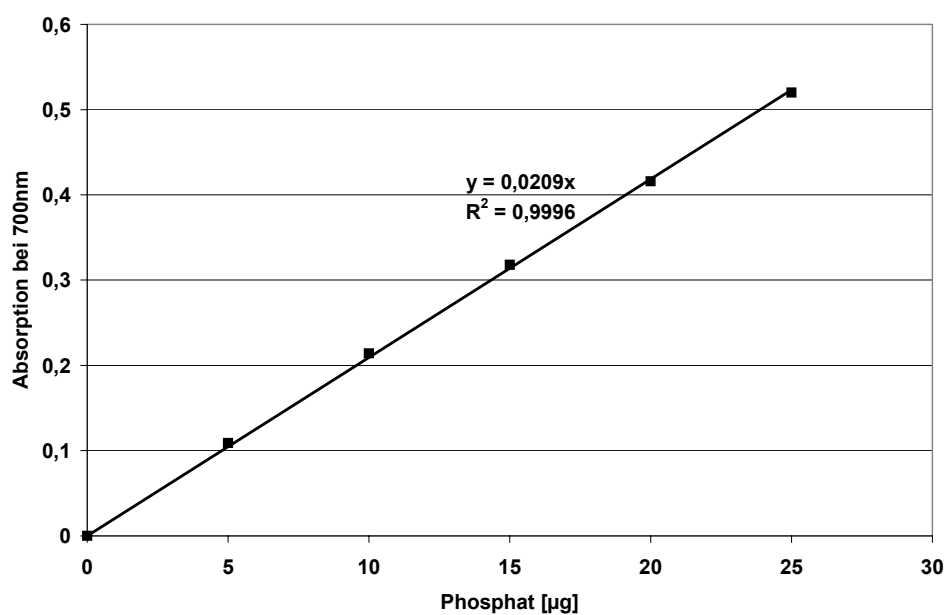


Abb. 4.2.: Phosphor-Kalibrierungskurve für Kreatinkinase-Aktivitäts-Messung

Zur Kalibrierung der beim Kreatinkinase-Aktivitäts-Test gemessenen Absorptionswerte, wurden verschiedene Phosphat-Standard-Konzentrationen eingesetzt und deren Absorption bei 720nm in Gegenwart der sauren Molybdatlösung und des Fiske und SubbaRow reduzierenden Agens gemessen und eine lineare Eichkurve ($y=0,029x$) interpoliert (R^2 =Korrelationskoeffizient).

4.2.1. Kreatinkinase-Aktivität in verschiedenen Zelltypen

Zum Vergleich der Kreatinkinase-Aktivität in primären, humanen Keratinozyten und Fibroblasten wurden zytoplasmatische Extrakte dieser beiden Zelltypen im Kreatinkinase-Test untersucht. Wie in Abbildung 4.2.1. zu sehen ist, zeigen Keratinozyten (n=20) eine höhere Kreatinkinase-Aktivität als Fibroblasten (n=5). Aufgrund dieses Befundes und der Ergebnisse aus der Immunhistologie (s. 4.1.1.1. und 4.1.1.2.), die hauptsächlich eine Lokalisation in der Epidermis zeigen, wurden die folgenden Versuche an Keratinozyten durchgeführt.

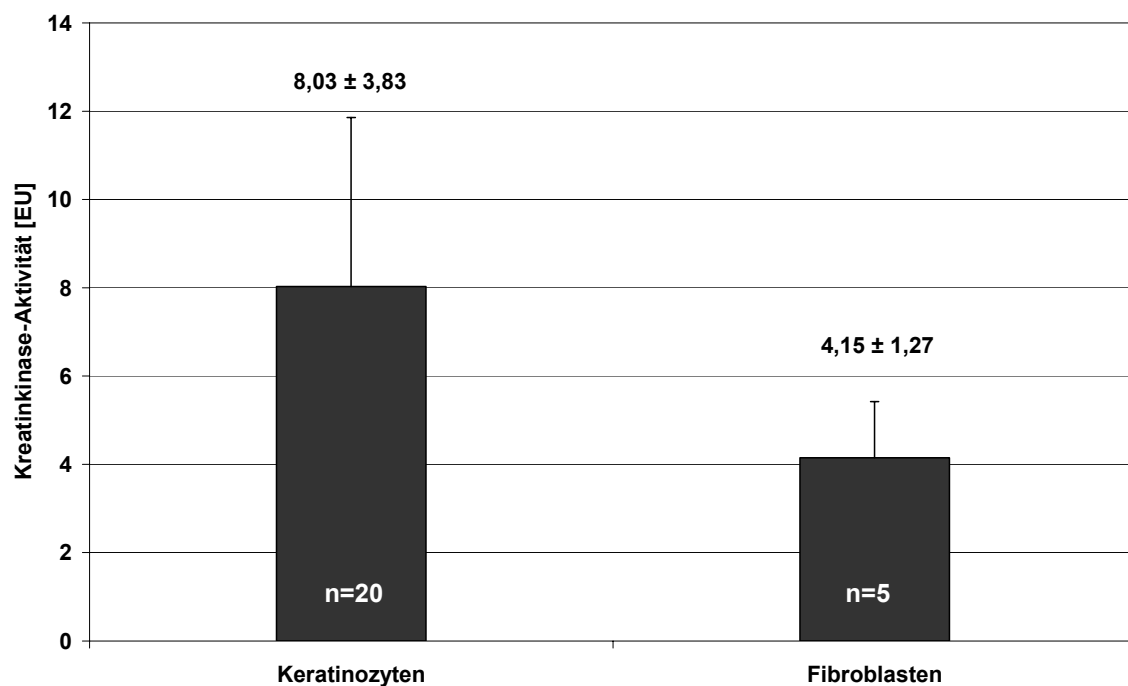


Abb. 4.2.1.: Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten und Fibroblasten

Die Kreatinkinase-Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten von primären, humanen Keratinozyten (n=20) und Fibroblasten (n=5) sind hier gegenüber gestellt. EU: $\mu\text{mol PCr/sec}$ bei 25°C

4.2.2. Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten

4.2.2.1. Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten im Altersvergleich

In Abbildung 4.2.2.1. ist der Vergleich der Kreatinkinase-Aktivität primärer, humaner Keratinozyten von jungen und alten Spendern dargestellt. Im Gegensatz zu Zellen von jungen Spendern (als 100% gesetzt) zeigen Zellen von alten Spendern *in vitro*

nur eine Aktivität von 84%. Aufgrund der relativ hohen Standardabweichung hat eine statistische Überprüfung für $n=10$ keine Signifikanz ergeben, so dass hier lediglich von einem Trend gesprochen werden kann.

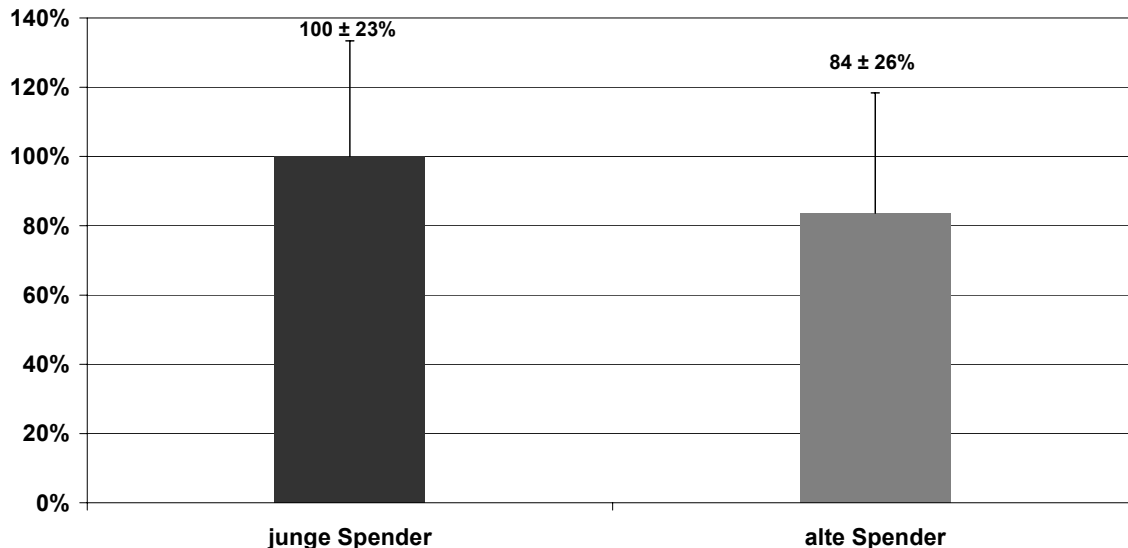


Abb. 4.2.2.1.: Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten unterschiedlich alter Spender
Kreatinkinase-Aktivität primärer, humaner Keratinozyten junger, d.h. nicht älter als 35 Jahre ($n=10$) und alter, d.h. nicht jünger als 60 Jahre ($n=10$) Spender sind gegenüber gestellt. Die Daten sind auf den jeweiligen Proteingehalt und auf junge Spender (=100%) relativiert.

4.2.2.2. Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten nach Inkubation mit Kreatin

Im Folgenden wurden primäre, humane Keratinozyten alter und junger Spender für 24 Stunden mit $150\mu\text{M}$ Kreatin inkubiert (s. 3.3.1.) und in den zytoplasmatischen Extrakten (s. 3.4.1.) die Kreatinkinase-Aktivität bestimmt (s. 3.5.). In Abbildung 4.2.2.2. sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Die Kreatinkinase-Aktivität von unbehandelten Zellen alter Spender (Kontrolle) ist als 100% gesetzt. In Bezug hierauf zeigen unbehandelte Zellen junger Spender eine um 15% höhere Aktivität (vgl. 4.2.2.1.). Nach Behandlung mit $150\mu\text{M}$ Kreatin steigert sich die Kreatinkinase-Aktivität alter Spender-Zellen um 23%, während die Aktivität in Zellen junger Spender nahezu unverändert bei 116% bleibt. Eine Signifikanzberechnung nach dem Students T-Test zeigt zwar eine Signifikanzniveau von $p=0,045$, aber angesichts der relativ geringen Fallzahlen und der nur moderaten Steigerung um 23% kann man hier wohl auch eher von einem Trend sprechen.

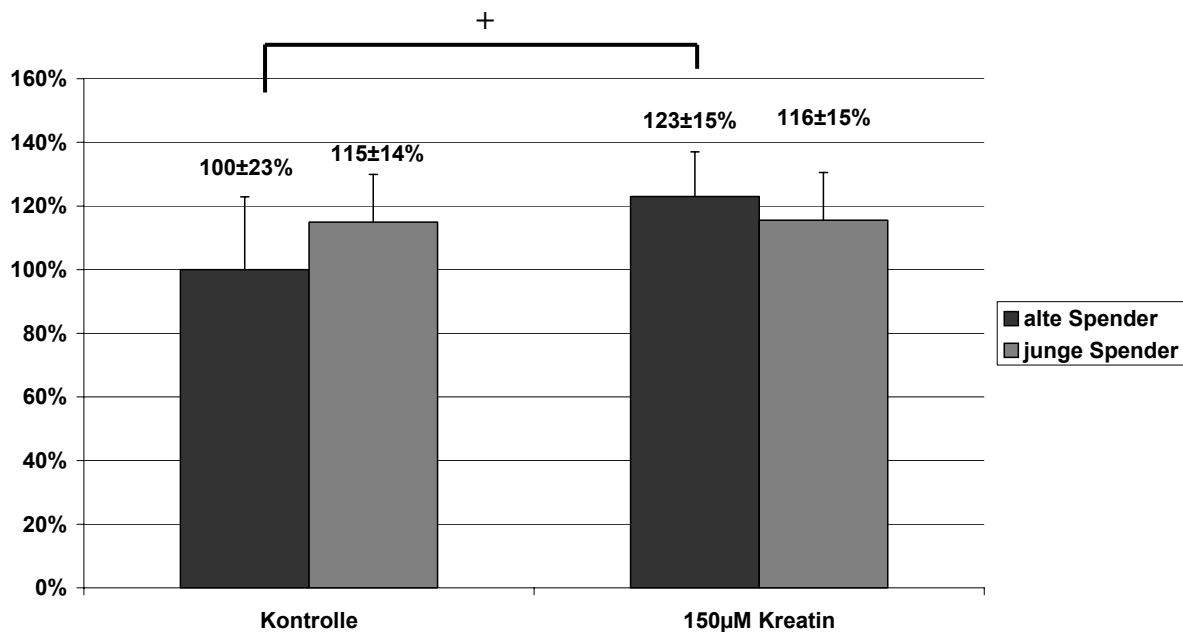


Abb. 4.2.2.2.: Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten verschieden alter Spender nach Inkubation mit 150µM Kreatin

Kreatinkinase-Aktivität primärer, humaner Keratinozyten junger d.h. nicht älter als 35 Jahre (n=10) und alter, d.h. nicht jünger als 60 Jahre (n=13) Spender mit und ohne 150µM Kreatin-Inkubation für 24 Stunden sind gegenüber gestellt. Die Daten sind auf den jeweiligen Proteingehalt und auf die Kontrolle der alten Spender (=100%) relativiert. +: signifikant (p=0,045)

4.2.2.3. Kreatinkinase-Aktivität in subzellulären Fraktionen

Vor der Messung der Kreatinkinase-Aktivität in subzellulären Fraktionen (s. 3.4.2.) primärer, humaner Keratinozyten wurde die Auftrennung der CK-BB in der zytosolischen Fraktion und der CK-mt in den Mitochondrien der Organellen-Fraktion mit einer Western-Blot-Analyse (3.7.) überprüft. In Abbildung 4.2.2.3.a ist die Western-Blot-Analyse gegen CK-BB der beiden Fraktionen dargestellt. Ausschließlich in der zytosolischen Fraktion (**Cyt**) lässt sich die, wie in der Positivkontrolle, ca. 45kDa große Bande erkennen. Dahingegen zeigt sich in der Western-Blot-Analyse gegen CK-mt (Abb. 4.2.2.3.b) die 40kDa große Bande in der Organellen-Fraktion (**Org**). Die Negativkontrolle, ohne Primärantikörper, blieb in beiden Fällen ohne detektierbare Signale.

Anhand dieser Experimente konnte sicher gestellt werden, dass die sub-zellulären Fraktionen primärer, humaner Keratinozyten, welche im Folgenden zur Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität Verwendung fanden, ausschließlich CK-BB in der zytosolischen Fraktion, bzw. CK-mt in der Organellen-Fraktion enthielten.

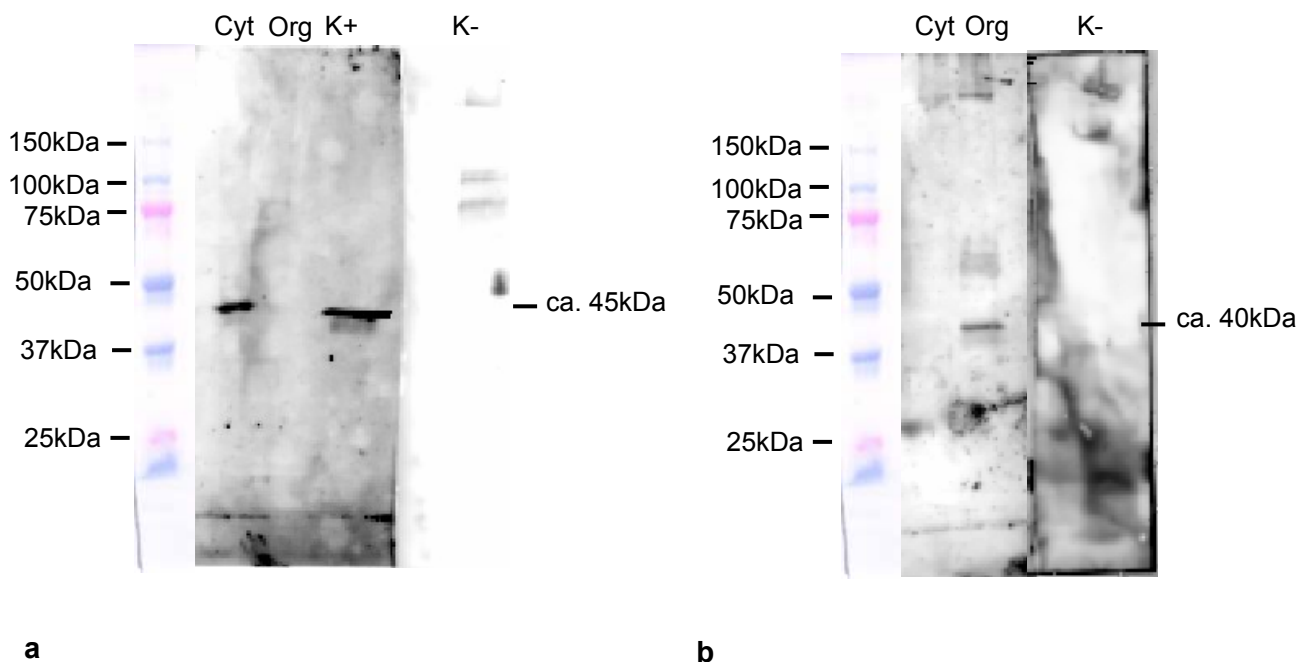


Abb. 4.2.2.3.a und b: Western-Blot-Analyse der subzellulären Fraktionen

Proteinextrakte (jeweils 15µg für CK-BB und 10µg für CK-mt) aus subzellulären Fraktionen primärer, humaner Keratinozyten wurden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und die CK-BB (a) und CK-mt (b) mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen. In beiden Blots (a und b) wurden in der ersten Spur die zytosolische Fraktion (Cyt) und in der zweiten Spur die Organellen-Fraktion (Org) aufgetragen. In a wurde zusätzlich als Positivkontrolle (K+) isolierte CK-BB eingesetzt. Daneben befindet sich die Negativkontrolle (K-ohne Primär-Antikörper. Als Größenstandard wurde der Dual-Colour-Precision-Plus von Biorad eingesetzt.

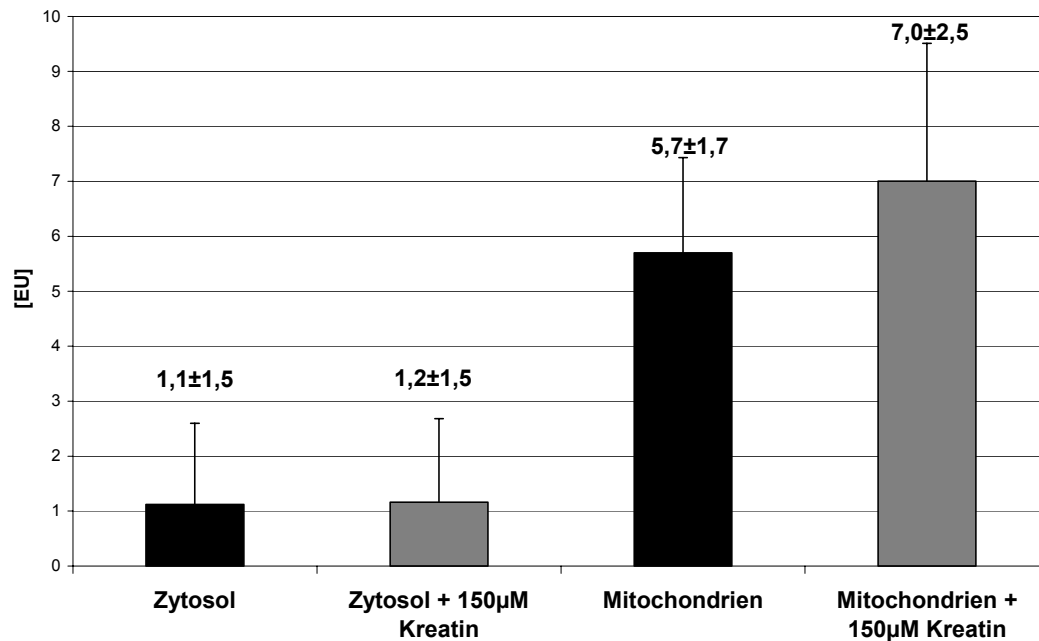
Es wurde die Kreatinkinase-Aktivität (s. 3.5.) in Zytosol- und Organellen-Fractionen (s. 3.4.2.) primärer, humaner Keratinozyten, die einmal mit und einmal ohne 150µM Kreatin für 24 Stunden vorinkubiert waren (s. 3.3.1), bestimmt.

In Abbildung 4.2.2.3.c. sind die Ergebnisse dieser Untersuchung gezeigt. Sowohl in unbehandelten als auch in mit Kreatin vorinkubierten Zellen, ist die Kreatinkinase-Aktivität der zytosolischen Fraktion auf die CK-BB zurückzuführen (s. 4.2.2.3.a), mit 1,1EU bzw. 1,2EU deutlich schwächer als die in der Organellen-Fraktion mit 5,7EU bzw. 7,0EU, welche die Aktivität der CK-mt widerspiegelt (s. 4.2.2.3.b). Die Vorinkubation mit 150µM Kreatin zeigte auf die Kreatinkinase-Aktivität der

zytosolischen Fraktion keine Auswirkung. Dahingegen ließ sich die Kreatinkinase-Aktivität in der Organellen-Fraktion durch Vorinkubation mit 150µM Kreatin von 5,7EU auf 7,0EU, d.h. um ca. 23% tendenziell steigern.

Abb. 4.2.2.3.c.: Kreatinkinase-Aktivität in subzellulären Fraktionen

Kreatinkinase-Aktivität in zytosolischer und Organellen-Fraktion isoliert aus primären,



humanen Keratinozyten (n=4) mit und ohne 150µM Kreatin-Inkubation für 24 Stunden sind gegenüber gestellt. Die Daten sind auf den jeweiligen Proteingehalt relativiert. EU: µmol PCr/sec bei 25°C

4.2.2.4. Kreatinkinase-Aktivität und Inhibition durch Wasserstoffperoxid

Zur Untersuchung des Einflusses von Wasserstoffperoxid auf die Kreatinkinase-Aktivität wurden in zytoplasmatischen Extrakten (s. 3.4.1.) aus unbehandelten und für 24 Stunden mit 150µM Kreatin inkubierten (s. 3.3.1.) primären, humanen Keratinozyten die Kreatinkinase-Aktivität bestimmt (s. 3.5.). In Abbildung 4.2.2.4. sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Die Kreatinkinase-Aktivität von Zellen ohne Wasserstoffperoxid-Zugabe (Kontrolle) ist jeweils als 100% gesetzt. In Bezug hierauf geht die Kreatinkinase-Aktivität unter Anwesenheit von 1µM bzw. 55µM Wasserstoffperoxid auf 60%, bzw. 51% zurück. Zytoplasmatische Extrakte von

mit 150 μ M Kreatin vorinkubierten Keratinozyten zeigen jeweils nur eine Abnahme in der Kreatinkinase-Aktivität auf 70%.

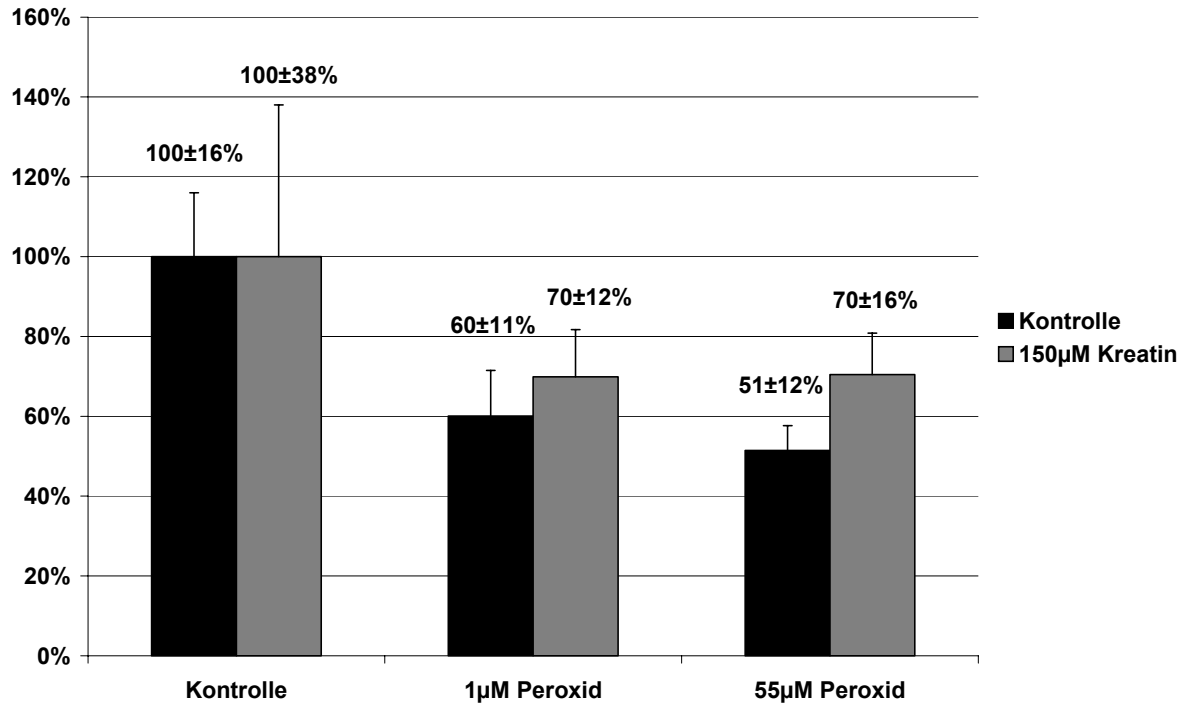


Abb. 4.2.2.4.: Kreatinkinase-Aktivität in primären, humanen Keratinozyten und Inhibition durch Wasserstoffperoxid

Die Kreatinkinase-Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten ($n=3$) mit und ohne Zugabe von Wasserstoffperoxid (1 μ M bzw. 55 μ M vor Messung der Kreatinkinase-Aktivität) ist auf die Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten von unbehandelten, ungestressten Kontrollzellen relativiert (100%). Daneben ist die Kreatinkinase-Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten ($n=3$) von mit 150 μ M Kreatin für 24 Stunden vorinkubierten Keratinozyten unter den gleichen Stressbedingungen dargestellt. Die Daten sind auf den jeweiligen Proteingehalt relativiert.

4.3. Kreatinsynthese in humaner Haut

4.3.1. Guanidino-Acetat-Methyl-Transferase (GAMT) in humaner Haut

Zum Nachweis der GAMT in Humanhaut wurde eine RT-PCR (s. 3.10.2.) an humaner Gesamt-RNA aus Haut mit den Primern GAMT2-upper und GAMT2 lower (s. 2.3.8.) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde in der gleichen RT-PCR humane Gesamt-RNA aus Leber eingesetzt.

Abbildung 4.3.1.1.a zeigt die Agarosegelelektrophorese (s. 3.10.3.) der RT-PCR-Proben. Sowohl das Produkt der RT-PCR mit Leber-RNA, als auch das mit Haut-RNA, zeigt die nach der cDNA-Sequenz zu erwartende 300bp große, distinkte Bande. Die Negativkontrolle ohne RNA lieferte kein Signal.

Zur Kontrolle der in der RT-PCR amplifizierten cDNA wurde ein Restriktionsverdau (s. 3.10.5.) mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen durchgeführt und die verdaute cDNA neben der unverdauten in einem Agarosegel aufgetrennt. Neben Resten unverdauter DNA bei 300Bp lässt sich bei dem Restriktionsverdau mit BanI und BsaHI jeweils das nach der Sequenz zu erwartende 200bp Fragment deutlich erkennen (s. Abb. 4.3.1.1.b). Das bei beiden Verdauen zusätzlich anfallende 100bp Fragment kann nur schwer detektiert werden, da in diesem Bereich das Bromphenolblau des Auftragspuffers die Bande überlagert.

Neben humaner Haut-Gesamt-RNA wurde auch Gesamt-RNA aus primären, humanen Fibroblasten und Keratinozyten eingesetzt. Die Agarosegelelektrophorese dieser RT-PCR ist in Abbildung 4.3.1.2. dargestellt. Neben der Leber- und der Haut-RNA liefert auch die RNA von Fibroblasten und Keratinozyten ein Signal bei 300bp. Die Negativkontrolle zeigte auch hier keine spezifische Bande. In dieser PCR treten zudem noch größere Banden auf. Da der Hintergrund auch höher ist, im Vergleich zu 4.3.1.1.a kann hier wohl von unspezifischen Nebenprodukten ausgegangen werden.

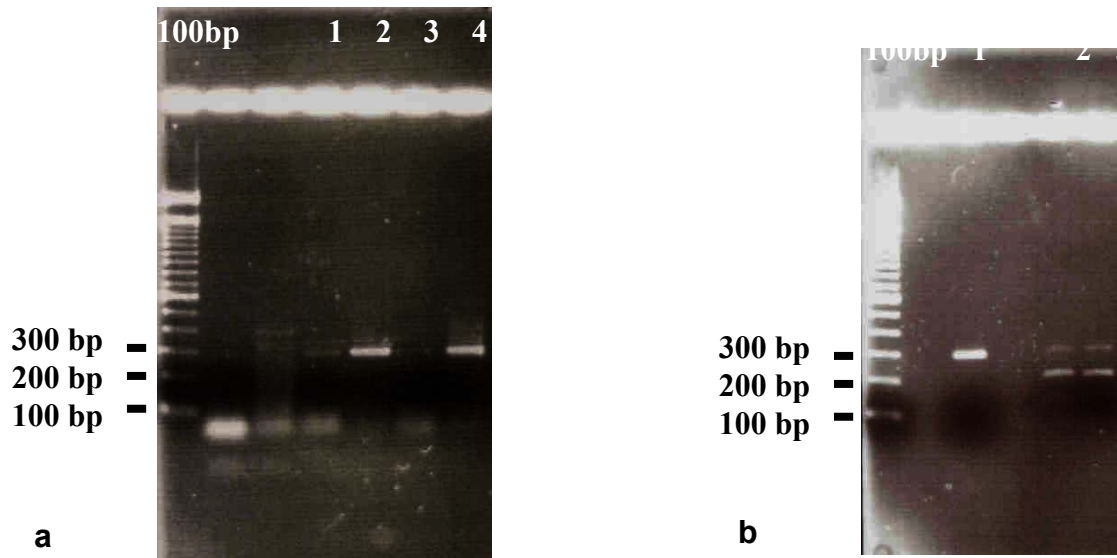


Abb. 4.3.1.1.a und b: Agarosegelelektrophorese an humaner Haut-Gesamt-RNA

Die Proben aus der RT-PCR (10 μ l) wurden in einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetrennt. In Spur 2 (a) wurde das RT-PCR Produkt von humaner Leber-RNA und in Spur 4 das RT-PCR Produkt von humaner Haut-RNA aufgetragen. Spur 1 und 3 sind dabei die jeweiligen Negativkontrollen ohne RNA. **b** zeigt den Kontrollverdau des RT-PCR Produkts aus Haut-RNA (Spur 1) mit *BanI* (Spur 2) und *BsaHI* (Spur 3). Als Marker wurde jeweils ein 100 Basenpaar Marker eingesetzt (100bp).

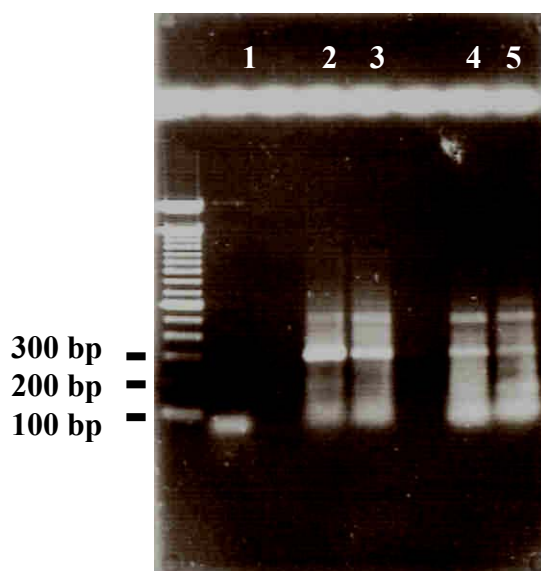


Abb. 4.3.1.2. (vorherige Seite): Agarosegelelektrophorese

Die Proben aus der RT-PCR (10 μ l) mit den Primern *GAMT2* upper und lower wurden in einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetrennt. In Spur 2 wurde das RT-PCR Produkt von humaner Leber-RNA und in Spur 3 von humaner Haut-RNA aufgetragen. Spur 4 und 5 zeigen die RT-PCR Produkte mit Fibroblasten, bzw. Keratinocyten RNA. Spur 1 ist dabei die Negativkontrolle ohne RNA. Als Marker wurde ein 100bp Marker eingesetzt.

4.3.2. Arginin-Glycin-Amidino-Transferase (AGAT) in humaner Haut

Neben der GAMT wurde auch die AGAT mittels RT-PCR (s. 3.10.2.) in Gesamt-RNA humaner Haut nachgewiesen. Abbildung 4.3.2. zeigt die Agarosegelelektrophorese der RT-PCR-Produkte mit dem Primerpaar AGAT1. Neben dem RT-PCR Produkt mit dem Primerpaar GAMT2 (s. 4.3.1.), lässt sich bei dem Produkt der AGAT RT-PCR eine deutliche Bande bei ca. 320Bp erkennen, die der nach der Sequenz zu erwartenden Größe entspricht.

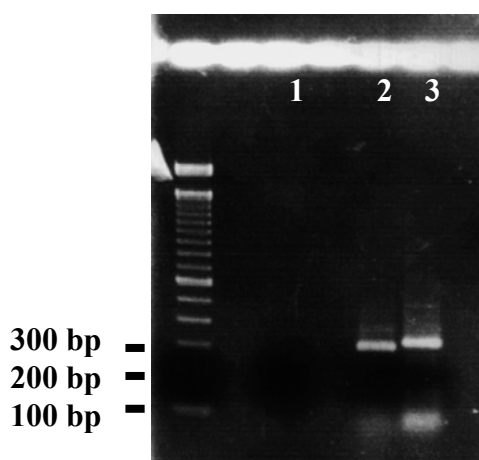


Abb. 4.3.2.: Agarosegelelektrophorese

Die Proben aus der RT-PCR (10µl) mit dem Primerpaar AGAT1 wurden in einem 1% (w/v) Agarosegel aufgetrennt. In Spur 2 wurde das RT-PCR Produkt von humaner Haut-RNA mit den GAMT-Primern und in Spur 3 das RT-PCR Produkt mit den AGAT Primern aufgetragen. Spur 1 ist dabei die Negativkontrolle ohne RNA. Als Marker wurde ein 100bp Marker eingesetzt.

4.3.3. Inkubation von Keratinozyten mit Guanidinoacetat

Nachdem die mRNA für die beiden Schlüsselenzyme der Kreatinsynthese, AGAT und GAMT, sowohl in Gesamt-Haut-RNA, als auch in RNA von Fibroblasten und Keratinozyten *in vitro* nachgewiesen werden konnte (s. 4.3.1. und 4.3.2.), wurde die Wirkung der Kreatinvorstufe Guanidinoacetat auf die Kreatinkinase-Aktivität untersucht. Hierzu wurden primäre, humane Keratinozyten mit 150µM Guanidinoacetat für 24 Stunden inkubiert und in den zytoplasmatischen Extrakten (s. 3.4.1.) die Kreatinkinase-Aktivität bestimmt (s. 3.5.). Die Abbildungen 4.3.3.1. und

4.3.3.2. zeigen diese Ergebnisse für Keratinozyten junger ($n=3$), bzw. alter ($n=3$) Spender. Die Kreatinkinase-Aktivität in zytoplasmatischen Extrakten junger Spender ist nach Guanidinoacetat-Inkubation um 22% höher und in Extrakten alter Spender um 18% erhöht.

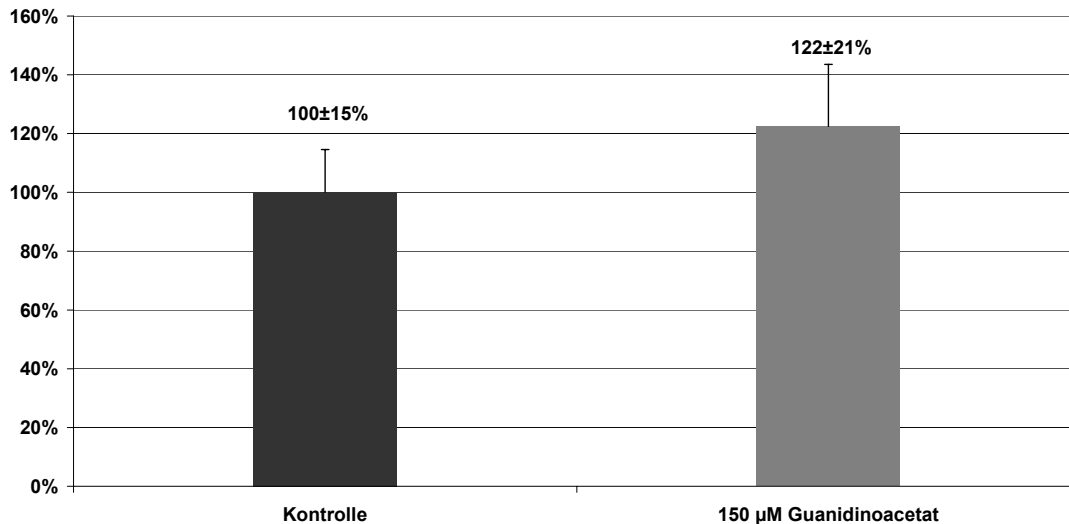


Abb. 4.3.3.a.: Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten junger Spender nach Inkubation mit 150µM Guanidinoacetat

Kreatinkinase-Aktivität primärer, humaner Keratinozyten junger, d.h. nicht älter als 35 Jahre ($n=3$) Spender mit und ohne 150µM Kreatin-Inkubation für 24 Stunden sind gegenüber gestellt. Die Daten sind auf den jeweiligen Proteingehalt und auf die Kontrolle der alten Spender (=100%) relativiert.

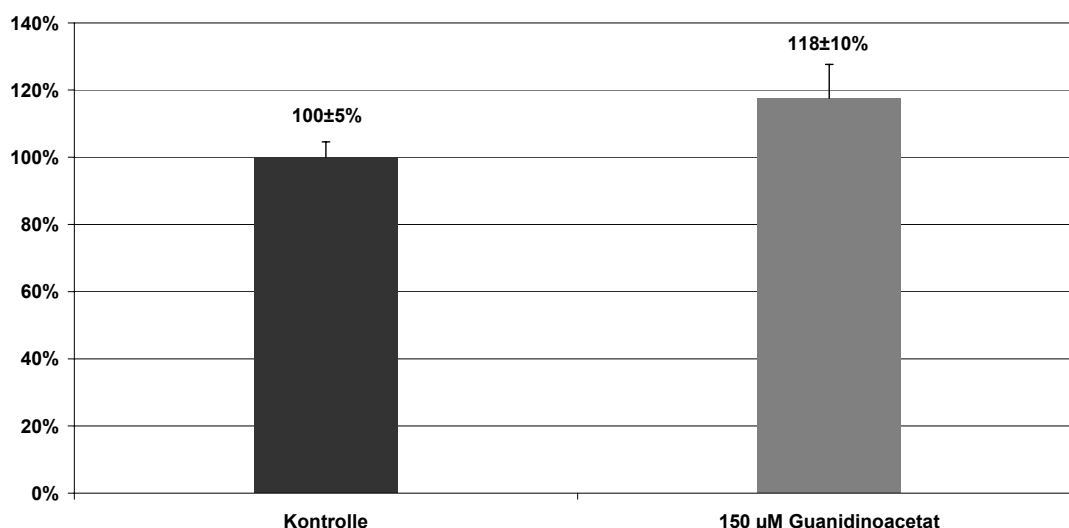


Abb. 4.3.3.b.: Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten alter Spender nach Inkubation mit 150µM Guanidinoacetat

Kreatinkinase-Aktivität primärer, humaner Keratinozyten alter, d.h. nicht jünger als 60 Jahre ($n=3$) Spender mit und ohne 150µM Kreatin-Inkubation für 24 Stunden sind gegenüber gestellt. Die Daten sind auf den jeweiligen Proteingehalt und auf die Kontrolle der alten Spender (=100%) relativiert.

4.4. RNA-Interferenz Untersuchungen

Die folgenden Abschnitte befassen sich mit der mRNA-Inhibition der zytosolischen CK-BB und der mitochondrialen CK-mt Kreatinkinase (s. 3.3.2.). Da sich primäre Zellen bisher nur sehr schwer mit siRNAs transfizieren lassen, wurden für die folgenden Experimente zum einen die humane Keratinozytenzelllinie HaCat und zum anderen die Gebärmutterhalskarzinom-Zelllinie HeLaS3 eingesetzt.

4.4.1. Kreatinkinase in HaCat und HeLaS3

Bevor HaCat- und HeLaS3-Zellen zur Inhibition der Kreatinkinase CK-BB und CK-mt eingesetzt werden konnten, wurde überprüft, ob die beiden Zelllinien die entsprechenden Kreatinkinasen exprimieren. Zudem wurde die Kreatinkinase-Aktivität bestimmt.

Für die Western-Blot-Analyse (s. 3.7.) wurden zytoplasmatische Extrakte (s. 3.4.1.) von primären Keratinozyten, HeLaS3- und HaCat-Zellen mit gleicher Proteinmenge (10µg) eingesetzt. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse sind in Abbildung 4.4.1.a dargestellt. Sowohl die zytosolische Kreatinkinase CK-BB als auch die mitochondriale CK-mt, ließen sich in allen drei Zelltypen nachweisen. Im Vergleich zu einem Protein-Größenstandard detektierte der Antikörper gegen CK-BB eine ca. 45kDa große Bande, entsprechend der mitgeführten Positivkontrolle von isolierter, humaner CK-BB. Der Antikörper gegen die mitochondriale CK-mt detektierte eine ca. 40kDa große Bande. Eine Positivkontrolle für die mitochondriale CK-mt stand leider nicht zur Verfügung. Von besonderer Bedeutung ist jedoch die unterschiedlich starke Expression der beiden Kreatinkinasen in den drei Zelltypen bei gleichem Gesamt-Protein-Gehalt. Während Keratinozyten und HaCat-Zellen eine relativ geringe Menge an zytosolischer Kreatinkinase Ck-BB und eine starke Expression der CK-mt zeigen, war das Expressionsmuster bei den HeLaS3-Zellen genau entgegengesetzt. Da HaCat-Zellen und Keratinozyten das gleiche Expressionsmuster zeigen, kann die HaCat Keratinozyten-Zelllinie als Modell für primäre Keratinozyten bei der siRNA-Transfektion eingesetzt werden. Da HeLaS3-Zellen eine starke Expression der CK-BB zeigten, sind auch mit diesen Zellen siRNA-Transfektion durchgeführt worden.

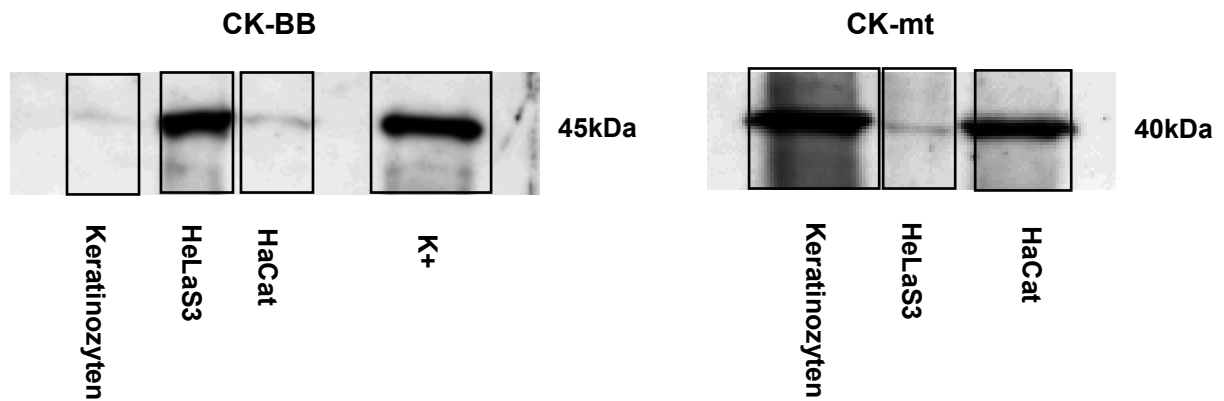


Abb. 4.4.1.a: Western-Blot-Analyse gegen CK-BB und CK-mt mit zytoplasmatischen Extrakten von Keratinozyten, HeLaS3- und HaCat-Zellen

Proteinextrakte (jeweils 10 μ g) von Keratinozyten, HeLaS3 und HaCat wurden in einem 10%igen SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Als Positivkontrolle (K+) wurde isolierte, humane CK-BB eingesetzt. Anschließend wurde die immunochemische Detektion mit Antikörpern gegen CK-BB (A) und CK-mt (B) durchgeführt.

Als weiterer Vorversuch wurde die Kreatinkinase-Aktivität in HaCat- und HeLaS3-Zellen gemessen (s. 3.5.). Abbildung 4.4.1.b. zeigt die Kreatinkinase-Aktivität in HeLaS3- und HaCat-Zellen im Vergleich zur Aktivität in Keratinozyten. Die Daten zeigen eine auf Proteinmenge bezogene vergleichbare Aktivität in allen drei Zelltypen. Als Ergebnis dieses Versuchs kann somit festgestellt werden, dass HaCat- und HeLaS3-Zellen nicht nur Kreatinkinase CK-BB und CK-mt exprimieren, sondern dieses auch in einer messbaren Kreatinkinase-Aktivität resultiert. Somit waren alle Voraussetzungen gegeben, HaCat- und HeLaS3-Zellen für die folgenden siRNA Experimente einzusetzen.

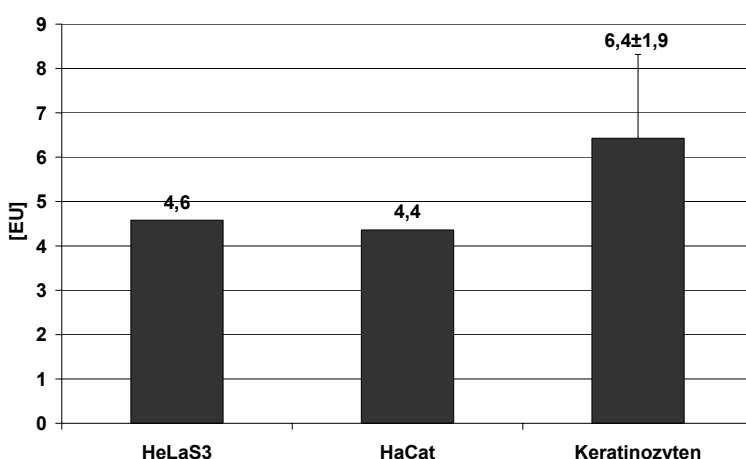


Abb. 4.4.1.b.: Kreatinkinase-Aktivität in HeLaS3-, HaCat-Zellen und Keratinozyten

Zytoplasmatische Extrakte von HeLaS3- (n=1), HaCat-Zellen (n=1) und Keratinozyten (n=17) wurden zur Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität eingesetzt. Die Daten wurden dabei auf den jeweiligen Proteingehalt relativiert. EU: μ mol PCr/sec bei 25°C

4.4.2. Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen Lamin A/C

Zur Überprüfung der Transfizierbarkeit von HaCat-Zellen wurde mit siRNA gegen Lamin A/C transfiziert (s. 3.3.2.1.). Hierzu wurden HaCat-Zellen auf Kollagen-beschichteten, runden Glasdeckgläschen in 24-Loch-Platten mit Zelldichten von 5000, 10000 und 20000 Zellen ausgesät und nach 24 Stunden mit Oligofectamine™ und Lipofectamine™ Plus transfiziert. Die Transfektion erfolgte für 4 bzw. 24 Stunden und nach insgesamt 72 Stunden wurde Lamin A/C immunhistologisch nachgewiesen. Das Ergebnis einer Transfektion mit siRNA gegen Lamin A/C für 24 Stunden bei einer Aussaatdichte von 20000 Zellen je Kavität ist in Abbildung 4.4.2. dargestellt. Im Vergleich zu den nicht mit Lamin A/C siRNA transfizierten Zellen zeigten sich bei der Transfektion mit siRNA gegen Lamin A/C eine große Anzahl von Zellkernen, welche nicht für Lamin A/C positiv sind und damit erfolgreich transfiziert wurden. Eine Auszählung der Lamin A/C negativen Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl ergab eine Transfektionseffizienz von ca. 55%. Somit kann für HaCat-Zellen von einer ausreichend guten Transfizierbarkeit ausgegangen werden und die für die in Abbildung 4.4.2. dargestellten Zellen verwendeten Transfektionsbedingungen wurden in den folgenden Experimenten angewendet.

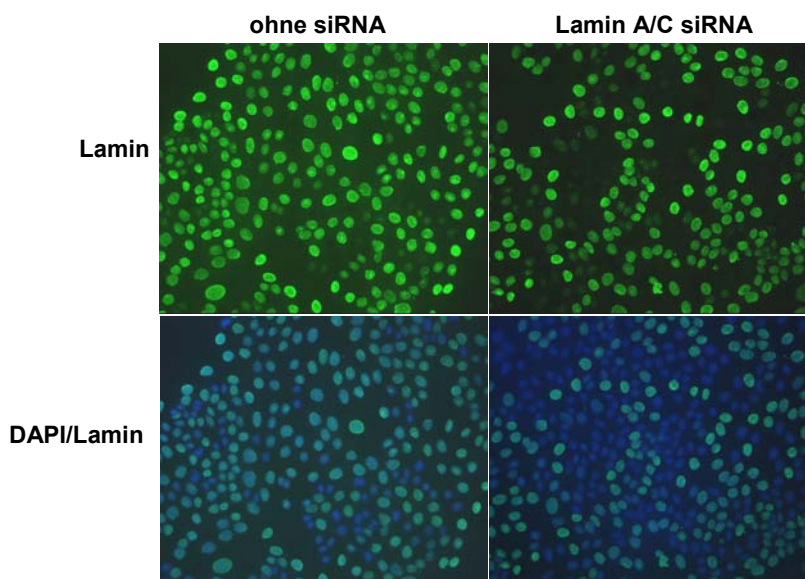


Abb. 4.4.2.: Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen Lamin A/C

HaCat-Zellen wurden auf Kollagen-beschichteten, runden Glasdeckgläschen in 24-Loch-Platten in einer Zelldichte von 20000 Zellen je Kavität ausgesät und nach 24 Stunden für 24 Stunden mit siRNA gegen Lamin A/C transfiziert. Bei der Kontrolle wurde keine siRNA eingesetzt. Insgesamt 72 Stunden nach Transfektionsbeginn wurde Lamin A/C immunhistologisch nachgewiesen. Die oberen Abbildungen zeigen die mit AlexaFluor®488 markierte Lamin A/C Färbung. In den unteren Abbildungen sind zusätzlich die Zellkerne mit DAPI gefärbt. Vergrößerung: 100fach

4.4.3. Transfektion von HaCat- und HelaS3-Zellen mit siRNA gegen CK-BB und CK-mt

Zur Transfektion wurden siRNAs gegen CK-BB und CK-mt gemäß den Vorgaben von Elbashir et al. (2002) anhand der cDNA-Sequenzen (s. Abb. 4.4.3.a und b) ausgewählt. Hierbei wurde nach Sequenzen des Musters 5'-AA(N)₁₉TT gesucht, wobei N jedes beliebige Nukleotid sein kann. Alternativ konnte dabei auch auf die beiden endständigen Thyminen verzichtet werden. Außerdem wurde darauf geachtet, dass keine Guanosin-reiche Sequenzen vorlagen und der G/C-Gehalt insgesamt bei ca. 50% lag. Abschließend wurden die ermittelten Sequenzen mit Blast-search (www.ncbi.nlm.gov/BLAST) auf ihre Spezifität auf das Ziel CK-BB bzw. CK-mt überprüft. Gegen CK-BB (s. Abb. 4.4.3.a) und CK-mt (s. Abb. 4.4.3.b) wurden jeweils 2 Sequenzen ermittelt und von der Firma Dharmacon synthetisiert.

atgcccttctccaacagccacaacgcactgaagctgcgcttcccggccgaggacgagttccccgacctgagcgccc
acaacaaccacatggccaaggtgctgacccccgagctgtacgcggagctgcgcgccaagagcacgccgagcgg
cttcacgctggacgacgtcatccagacaggcgtggacaacccgggccacccgtacatcatgacctgggctgctg
gcgggcgacgaggagtctacgaagtggtcaaggatctcttcgaccccatcatcgaggaccggcacggcgggtaca
agcccagcgtgagcacaagaccgacctcaaccccgacaacctgcagggcggcgacgacctggacccaacta
cgtgctgagctcgcgggtgcgacgggcccgcagcatccgtggcttctgcctcccccgactgcagccgcggggag
cgccgcgcatcgagaagctcgcggtggaagccctgtccagcctggacggcgacctggcgggcccgatactacg
ctcaagagcatgacggaggcggagcagcagcagctcatcgacgaccttctcttcgacaagcccgtgtcgcccc
tctgctggcctcgggcatggcccgcgactggcccgcgcccgggtatctggcacaatgacaataagaccttctg
gtgtgggtcaacgaggaggaccacctgcccgtcatctccatgcagaaggggggcaacatgaaggagggtgtcacc
cgcttctgcaccggcctcaccagattgaaactcttcaagtctaaggactatgagttcatgtggaacctcacctggg
ctacatctcacctgccatccaacctgggacccgggctgcgggcaggtgtgcatatcaagctgcccacacctgggca
agcatgagaagtctcggaggtgctaagcggctgcgactcagaagcagggcacaggcgggtgtggacacggctgc
gggtgggcccgggtcttcgacgtctccaacgctgaccgctgggcttctcagaggtggagctgggtgcagatgggtgga
cggagtgaagctgctcatcgagatggagcagcggctggagcagggccaggccatcgacgacctcatgcctgcca
gaaatga

CKb00B: 5'- GUG UUC AAG GAU CUC UUC G dTdT
(G/C Gehalt: 42,9%) dTdT CAC AAG UUC CUA GAG AAG C - 5'

CKb00A: 5'- CCU GGG CAA GCA UGA GAA G dTdT
(G/C Gehalt: 54,4%) dTdT GGA CCC GUU CGU ACU CUU C - 5'

Abb. 4.4.3.a : cDNA-Sequenz der CK-BB und ausgewählte siRNA-Sequenzen
Dargestellt sind die beiden Sequenzen, die die oben aufgeführten Auswahlkriterien erfüllten und in den folgenden Experimenten verwendet wurden.

atggctggctcccttctcccgtctgctgtccgcccggcgggactcaggctcctggcttggccggagcggggctcttagc
 cgctgggttctgctccgaccggaacctgtacgagctgccagtgaaacgacggaggctgtatccccgagcgtgagt
 acccagacctccgaaagcacaacaactgcatggccagtcacctgacccagcagctatgacggctctgcgaca
 agaccacaccactggtggacgctagatcagtgatccagactggcgtggacaaccctggccacccttcatcaag
 actgtgggcatggtggctggagatgaggagacatagaggtattgctgacctgttgaccctgtgatccaagagcgc
 acaatggatatgacccccggacaatgaagcacaccacggatctagatgccagtaaaatccgttctggctactttgatg
 agaggtatgtattgtcctctagagtcagaactggccgaagcatccgaggactcagctctgcctccagcttgactcgagc
 agagcgacgagaggtggaacgtgttggtggatgactgagtgccctgaagggtgacctggctggacgttactata
 ggctcagtgagatgacagaggctgaacagcagcagctattgatgaccacttctgttgataagcctgtgtccccgtg
 ctgactgcagcaggaatggctcgagactggccagatgctcgtggaattggcacaacaatgagaagagcttctgat
 ctgggtgatgaggaggatcatacaggggtgatctccatggagaagggtgtaacatgaagagaggtttgaaagat
 tctgccgaggcccaagagggtggagagacttatccaagaacgtggctgggagttcatgtggaatgagcgttgggat
 acatcttgacctgtccatctaacctgggcactggactcgggcaggagtgcacatcaaactgccctgctaagcaaag
 atagccgcttcccaaagatcctggagaacctaagactccaaaacgtggtactggaggagtggacactgctgctac
 aggcggtgtctttgatatttctaattggaccgactaggcaaatcagaggtggagctggtgcaactggtcatcgatggag
 taaactattgattgattgtgaacggcgtctggagagaggccaggatatccgcatccccacacctgtcatccacaccaa
 gcattaa

CKmt001: 5'- UGA GCG UUU GGG AUA CAU C dTdT
 (G/C Gehalt: 42,9%) dTdT ACU CGC AAA CCC UAU GUA G - 5'

CKmt002: 5'- UGA AGC ACA CCA CGG AUC U dTdT
 (G/C Gehalt: 47,6%) dTdT ACU UCG UGU GGU GCC UAG A - 5'

Abb. 4.4.3.b : cDNA-Sequenz der CK-mt und ausgewählte siRNA-Sequenzen

Dargestellt sind die beiden Sequenzen, die die oben aufgeführten Auswahlkriterien erfüllten und in den folgenden Experimenten verwendet wurden.

Nach der Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen CK-BB (s. 3.3.3.2.) wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. In den folgenden Abbildungen ist für jede mögliche Kombinationsmöglichkeit der Transfektion von HaCat- und HeLaS3-Zellen mit siRNAs gegen CK-BB und CK-mt (s. Tab. 4.4.3.) jeweils eine exemplarische (n=1) Übersicht der Ergebnisse aller nach der Transfektion durchgeführten Untersuchungen, dargestellt. Da die einzelnen Experimente unterschiedlich oft wiederholt wurden, werden die zusammenfassenden Ergebnisse (n=3 bis n=5) dann in den Abschnitten 4.4.3.5. bis 4.4.3.9. gezeigt.

	CK-BB	CK-mt	Tab. 4.4.3. : Transfektionskombinationen Möglichen Transfektionen von HaCat- und HeLaS3-Zellen mit siRNAs gegen CK-BB und CK-mt und das jeweilige Kapitel in dem diese exemplarisch dargestellt werden.
HaCat	4.4.3.1.	4.4.3.2.	
HeLaS3	4.4.3.3.	4.4.3.4.	

4.4.3.1. Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen CK-BB

Das lichtmikroskopische Bild der mit CKb A transfizierten Zellen zeigt keine besonderen Auffälligkeiten (s. Abb. 4.4.3.1.a). Die Western-Blot-Analyse (s. Abb. 4.4.3.1.a) zeigt aber eine deutlich geringere Expression der CK-BB nach Transfektion mit der siRNA CKb A im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle und der mit der für das humane Genom unspezifischen Scramble-siRNA transfizierten Zellen. Diese ist ein Beweis für die erfolgreiche Inhibition der CK-BB.

Bei der Bestimmung der Zytotoxizität über die Messung der Laktatdehydrogenase (s. **A** in Abb. 4.4.3.1.b) sind dagegen keine großen Veränderungen zu erkennen und der LDH bleibt nahezu unverändert. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die CK-BB erfolgreich ausgeschaltet wurde, lässt sich in diesem Beispiel in der Kreatinkinase-Aktivität (s. **B** in Abb. 4.4.3.1.b) sogar ein leichter Anstieg (123%) beobachten. Die hier gemessene Kreatinkinase-Aktivität ist daher wohl hauptsächlich auf die CK-mt zurückzuführen. Die Proliferationsrate (s. **C** in Abb. 4.4.3.1.b) sinkt dagegen auf nur noch 73%. Auch das Mitochondrienmembranpotential (s. **D** in Abb. 4.4.3.1.b) zeigt ein leichte Reduktion auf 90%. Diese Reduktion spiegelt sich dann auch in der auf 208% erhöhten Apoptoserate (s. **F** in Abb. 4.4.3.1.b) wieder.

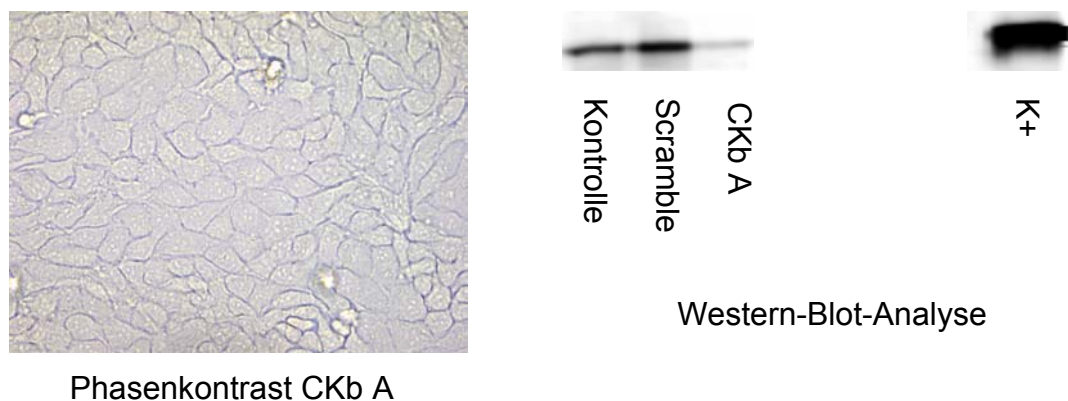


Abb. 4.4.3.1.a: Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA (CKb A) gegen CK-BB

Phasenkontrast-Aufnahme und Western-Blot-Analyse nach der Transfektion mit CKb A sind dargestellt. In der Western-Blot-Analyse wurde das Ausschalten des Zielproteins (CK-BB) überprüft. Dazu wurden zytoplasmatische Extrakte aus untransfizierten (**Kontrolle**), mit der Scramble (**Scramble**) und mit CKb A (**CKbA**) transfizierten Zellen aufgetragen. Als Positivkontrolle (**K+**) für den polyklonalen Antikörper gegen CK-BB wurde isolierte CK-BB eingesetzt.

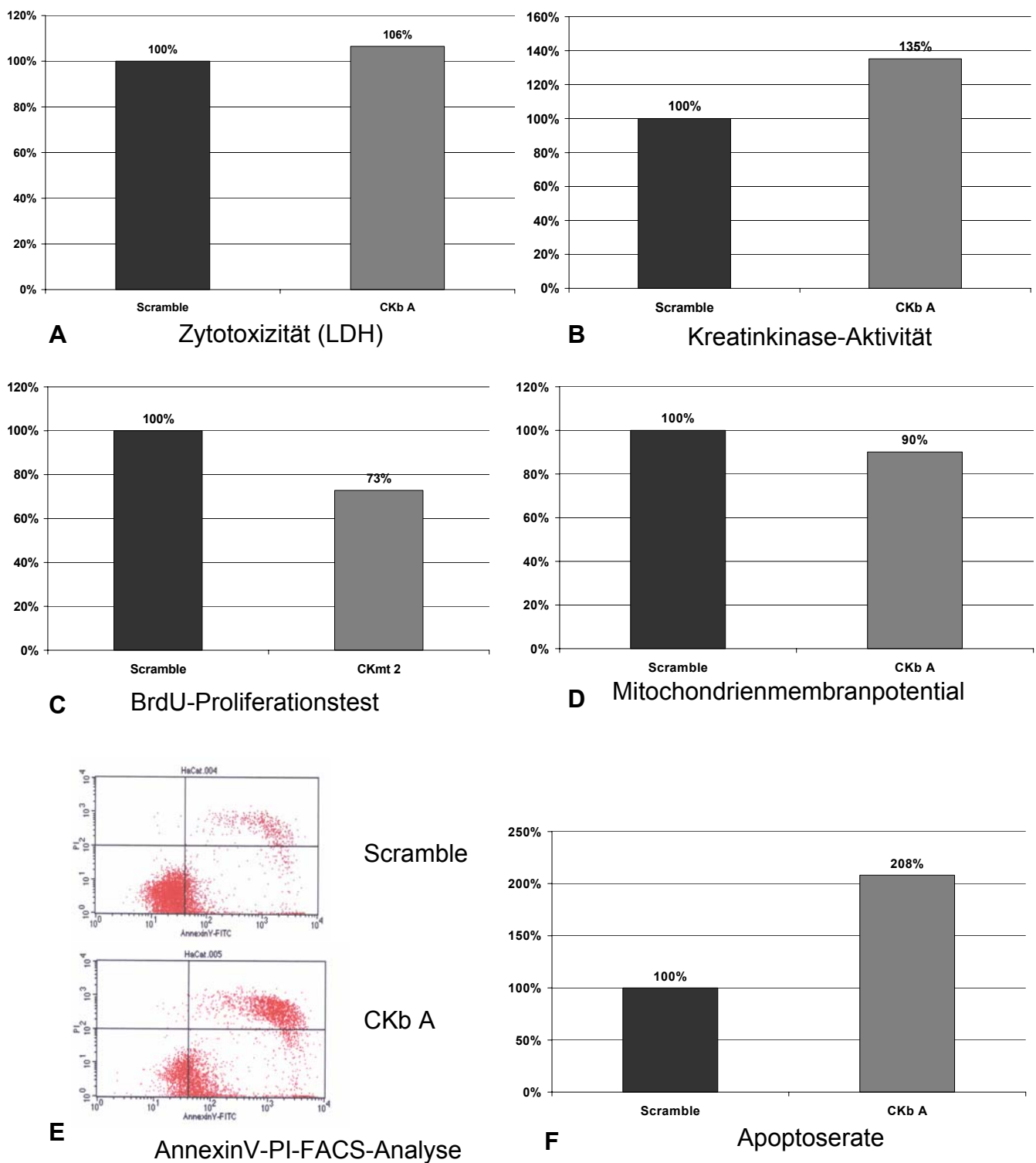


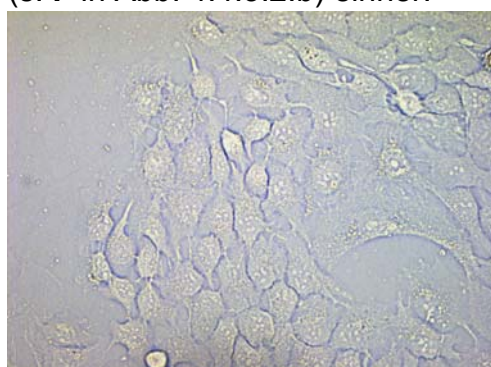
Abb. 4.4.3.1.b: Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA (CKb A) gegen CK-BB

Die Ergebnisse der an die Transfektion anschließenden verschiedenen Experimente sind im Überblick dargestellt. Zunächst wird die Zytotoxizität der Transfektion (A) durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) und die Messung der Kreatinkinase-Aktivität (B) gezeigt. In weiteren Untersuchungen wurde die Proliferation (C) über den BrdU-Einbau gemessen und das Mitochondrienmembranpotential (D) mit Hilfe des Fluorophors JC-1 bestimmt. Als letzter Test wurde die Auswirkung der Transfektion auf Apoptose (F) und Nekroseprozesse mit einer FACS-Analyse gegen Annexin V und Propidiumjodid PI (E) überprüft. Die Daten der mit CKb A transfizierten Zellen (CKb A, jeweils rechts) sind auf die als 100% gesetzten mit der Scramble-siRNA transfizierten Zellen (Scramble, jeweils links) relativiert.

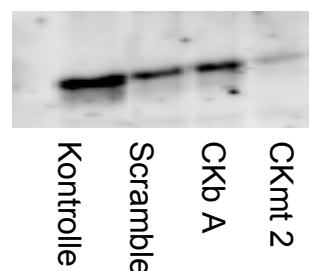
4.4.3.2. Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA gegen CKmt

Das lichtmikroskopische Bild (s. Abb. 4.4.3.2.a) der mit CKmt 2 transfizierten Zellen zeigt deutlich weniger Zellen, aber ansonsten keine besonderen Auffälligkeiten. Die Western-Blot-Analyse (s. Abb. 4.4.3.2.a) zeigt dabei eine deutlich geringere Expression der CK-mt nach Transfektion mit der siRNA CKmt 2 im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle und der mit der für das humane Genom unspezifischen Scramble-siRNA transfizierten Zellen. Die Transfektion mit siRNA gegen CKb A zeigt dagegen keine Inhibition der CK-mt. Also kann auch hier festgestellt werden, dass die CK-mt mit der verwendeten siRNA, erfolgreich ausgeschaltet werden konnte.

Bei der Bestimmung der Zytotoxizität (s. **A** in Abb. 4.4.3.2.b) zeigt sich ein Anstieg auf 123% im Vergleich zur Scramble-Kontrolle, d.h. das Ausschalten der CK-mt zeigt eine höhere Zytotoxizität als das der CK-BB (s. 4.4.3.1.). Die Kreatinkinase-Aktivität (s. **B** in Abb. 4.4.3.2.b) sinkt hier sogar auf nur noch 23%. D.h. eine Inhibition der CK-mt führt zur fast vollständigen Reduktion der Kreatinkinase-Aktivität im Gegensatz zu dem bei Inaktivierung der CK-BB beobachteten Effekten (s. 4.4.3.1.). Dieses ist wohl ein weiteres Indiz (s. auch Abb. 4.4.1.a), dass die CK-mt die in HaCat-Zellen und damit auch in Keratinozyten überwiegend vorkommende Kreatinkinase-Isoform darstellt. Ferner ist eine Verminderung der Proliferationsrate (s. **C** in Abb. 4.4.3.2.b) auf nur noch 56% zu beobachten. Das Mitochondrienmembranpotential (s. **D** in Abb. 4.4.3.2.b) wird sogar auf 78% reduziert. Mit all diesen Einschränkungen in den untersuchten Zellfunktionen geht auch eine Erhöhung in der Apoptoserate auf 139% (s. **F** in Abb. 4.4.3.2.b) einher.



Phasenkontrast CKmt 2



Western-Blot-Analyse

Abb. 4.4.3.2.a: Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA (CKmt 2) gegen CK-mt

Phasenkontrast-Aufnahme und Western-Blot-Analyse nach der Transfektion mit CKmt 2 sind dargestellt. In der Western-Blot-Analyse wurde das Ausschalten des Zielproteins (CK-mt) überprüft. Dazu wurden zytoplasmatische Extrakte aus untransfizierten (**Kontrolle**), mit der Scramble (**Scramble**), mit CKb A (**CKbA**) und mit CKmt 2 (**CKmt 2**) transfizierten Zellen aufgetragen.

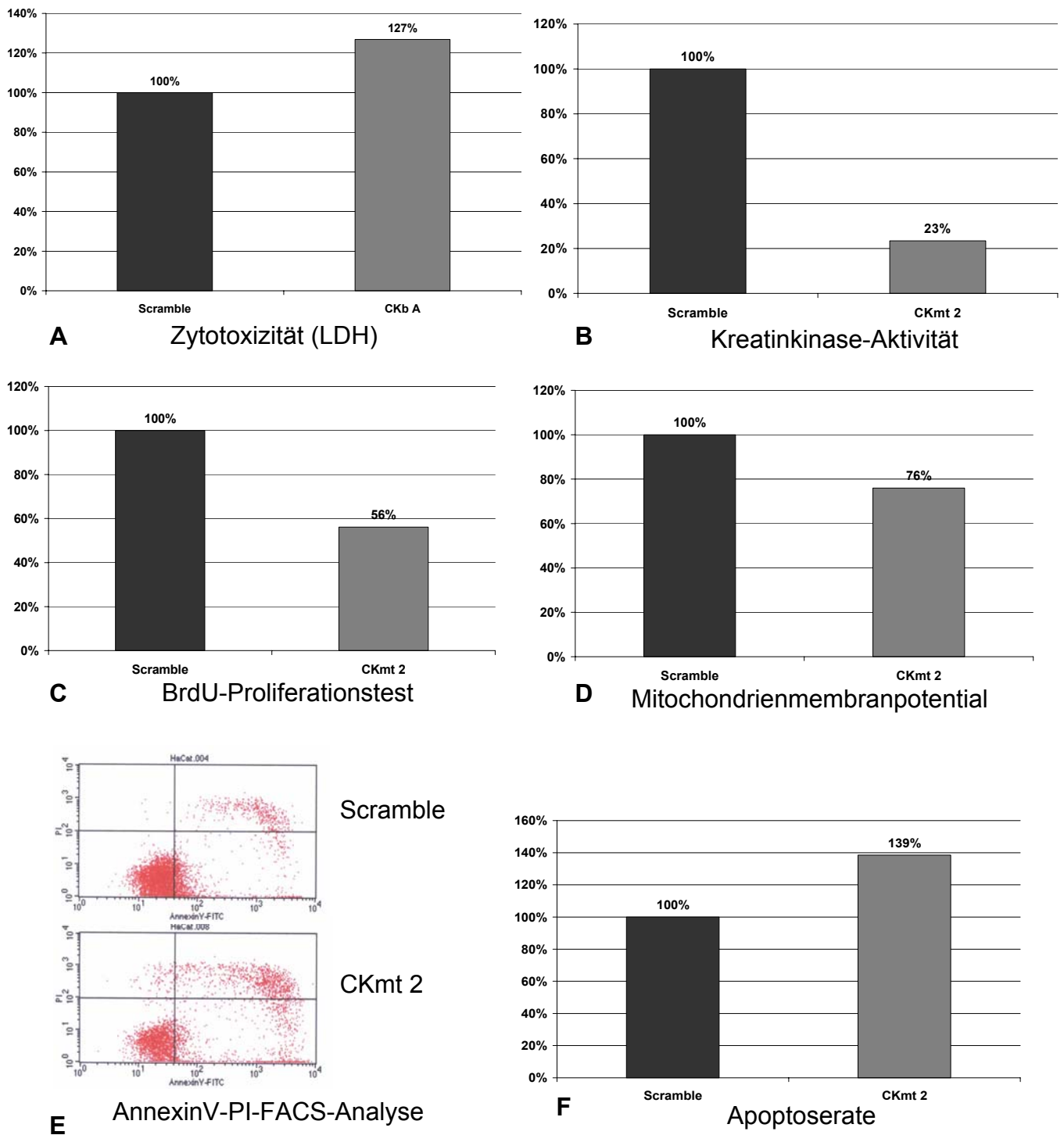


Abb. 4.4.3.2.b: Transfektion von HaCat-Zellen mit siRNA (CKmt 2) gegen CK-mt

Die Ergebnisse der an die Transfektion anschließenden verschiedenen Experimente sind im Überblick dargestellt. Zunächst wird die Zytotoxizität der Transfektion (A) durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) und die Messung der Kreatinkinase-Aktivität (B) gezeigt. In weiteren Untersuchungen wurde die Proliferation (C) über den BrdU-Einbau gemessen und das Mitochondrienmembranpotential (D) mit Hilfe des Fluorophors JC-1 bestimmt. Als letzter Test wurde die Auswirkung der Transfektion auf Apoptose (F) und Nekroseprozesse mit einer FACS-Analyse gegen Annexin V und Propidiumjodid PI (E) überprüft. Die Daten der mit CKb A transfizierten Zellen (CKmt 2, jeweils rechts) sind auf die als 100% gesetzten mit der Scramble-siRNA transfizierten Zellen (Scramble, jeweils links) relativiert.

4.4.3.3. Transfektion von HeLaS3-Zellen mit siRNA gegen CKb

Das lichtmikroskopische Bild (s. Abb. 4.4.3.3.a) der mit CKb A transfizierten Zellen zeigt nur noch vereinzelte Zellen, die zudem deutlich vesikuläre Abschnürungen vom Zellkörper erkennen lassen. Dieses kann als erster Hinweis auf vermehrte Apoptoseprozesse angesehen werden. In der Western-Blot-Analyse (s. Abb. 4.4.3.3.a) ist zudem ein vollständiger Expressionsverlust der CK-BB nach Transfektion mit der siRNA CKb A im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle und der mit der für das humane Genom unspezifischen Scramble-siRNA transfizierten Zellen zu erkennen. Auch wenn die CK-BB im Vergleich zu den HaCat-Zellen in den HeLaS3-Zellen sehr stark exprimiert wird (s. Abb. 4.4.1.a), erweist sich die siRNA-Inhibition hier als besonders effektiv.

Die Kreatinkinase-Aktivität (s. **B** in 4.4.3.3.b) sinkt demnach in diesem Beispiel auf nur noch 51%. In den HeLaS3-Zellen hat demnach die CK-BB einen wesentlich größeren Anteil an der Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität.

Die Bestimmung der Zytotoxizität (s. **A** in 4.4.3.3.b) zeigt eine Steigerung auf 193% im Vergleich zur Scramble-Kontrolle und spiegelt so die lichtmikroskopischen Beobachtungen wider. Auch die Proliferationsrate (s. **C** in 4.4.3.3.b) vermindert sich auf nur noch 69%. Das Mitochondrienmembranpotential (s. **D** in 4.4.3.3.b) wird auf lediglich 48% reduziert. All diesen Einschränkungen in den untersuchten Zellfunktionen haben auch eine Erhöhung in der Apoptoserate auf 55% (s. **F** in 4.4.3.3.b) zur Folge.

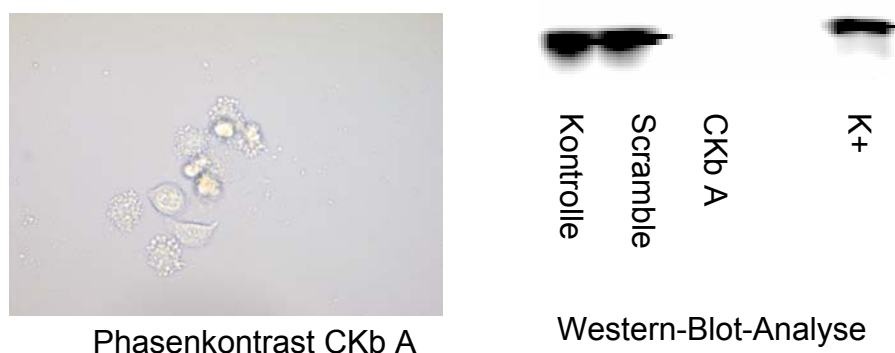


Abb. 4.4.3.3.a: Transfektion von HeLaS3-Zellen mit siRNA (CKb A) gegen CK-BB

Phasenkontrast-Aufnahme und Western-Blot-Analyse nach der Transfektion mit CKb A sind dargestellt. In der Western-Blot-Analyse wurde das Ausschalten des Zielproteins (CK-BB) überprüft. Dazu wurden zytoplasmatische Extrakte aus untransfizierten (**Kontrolle**), mit der Scramble (**Scramble**) und mit CKb A (**CKbA**) transfizierten Zellen aufgetragen. Als Positivkontrolle (**K+**) für den polyklonalen Antikörper gegen CK-BB wurde isolierte CK-BB eingesetzt.

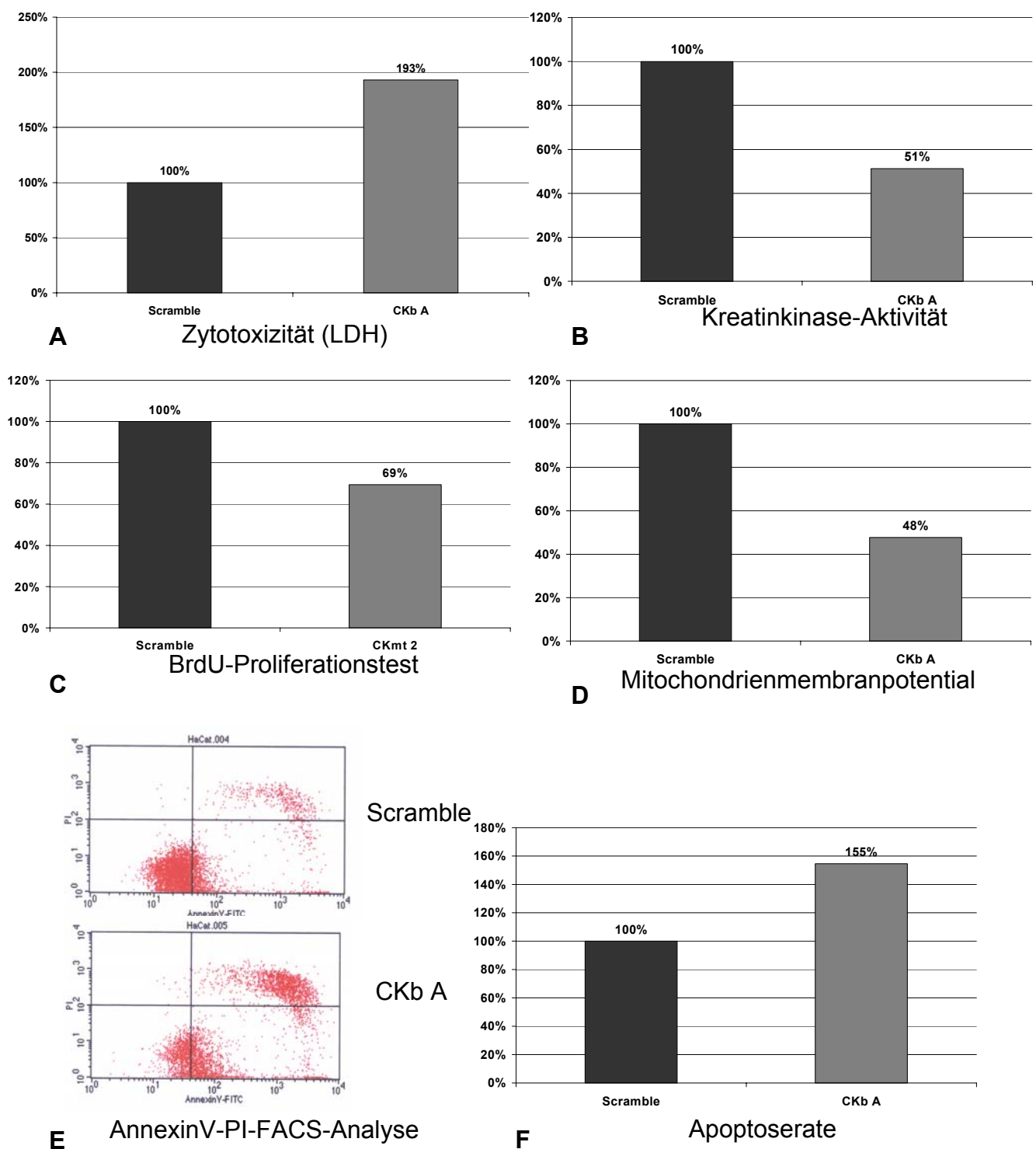


Abb. 4.4.3.3.b: Transfektion von HaeLaS3-Zellen mit siRNA (CKb A) gegen CK-BB

Die Ergebnisse der an die Transfektion anschließenden verschiedenen Experimente sind im Überblick dargestellt. Zunächst wird die Zytotoxizität der Transfektion (A) durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) und die Messung der Kreatinkinase-Aktivität (B) gezeigt. In weiteren Untersuchungen wurde die Proliferation (C) über den BrdU-Einbau gemessen und das Mitochondrienmembranpotential (D) mit Hilfe des Fluorophors JC-1 bestimmt. Als letzter Test wurde die Auswirkung der Transfektion auf Apoptose (F) und Nekroseprozesse mit einer FACS-Analyse gegen Annexin V und Propidiumjodid PI (E) überprüft. Die Daten der mit CKb A transfizierten Zellen (CKb A, jeweils rechts) sind auf die als 100% gesetzten mit der Scramble-siRNA transfizierten Zellen (Scramble, jeweils links) relativiert.

4.4.3.4. Transfektion von HeLaS3-Zellen mit siRNA gegen CKmt

Das lichtmikroskopische Bild (s. Abb. 4.4.3.4.a) der mit CKmt 2 transfizierten Zellen zeigt nicht nur deutlich weniger Zellen, sondern diese sind zum Teil auch abgerundet und erscheinen nur noch wenig vital. Bei der Bestimmung Zytotoxizität (s. **A** in Abb. 4.4.3.4.b) zeigt sich demnach ein Anstieg auf 230% im Vergleich zur Scramble-Kontrolle. Die Western-Blot-Analyse (s. Abb. 4.4.3.4.a) zeigt auch hier eine deutlich geringere Expression der CK-mt nach Transfektion mit der siRNA CKmt 2 im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle und der mit der für das humane Genom unspezifischen Scramble-siRNA transfizierten Zellen. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass in den Voruntersuchungen (s. 4.4.1.) festgestellt werden konnte, dass HeLaS3-Zellen überhaupt nur sehr geringe Mengen an CK-mt exprimieren. Demnach lässt sich auch in den Kontrollen (untransfiziert und Scramble) bereits nur sehr wenig CK-mt detektieren.

Die Kreatinkinase-Aktivität (s. **B** in Abb. 4.4.3.4.b) wird in diesem Beispiel auf 73% reduziert. Dieses weist darauf hin, dass auch wenn die CK-mt in HeLaS3-Zellen nur schwach exprimiert wird, sie dennoch einen Beitrag zur Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität leisten kann. Ferner vermindert sich die Proliferationsrate (s. **C** in Abb. 4.4.3.4.b) auf nur noch 32%. Das Mitochondrienmembranpotential (s. **D** in Abb. 4.4.3.4.b) wird sogar auf 41% reduziert. Mit all diesen Einschränkungen in den untersuchten Zellfunktionen geht auch eine Erhöhung in der Apoptoserate auf 262% (s. **F** in Abb. 4.4.3.4.b) einher.

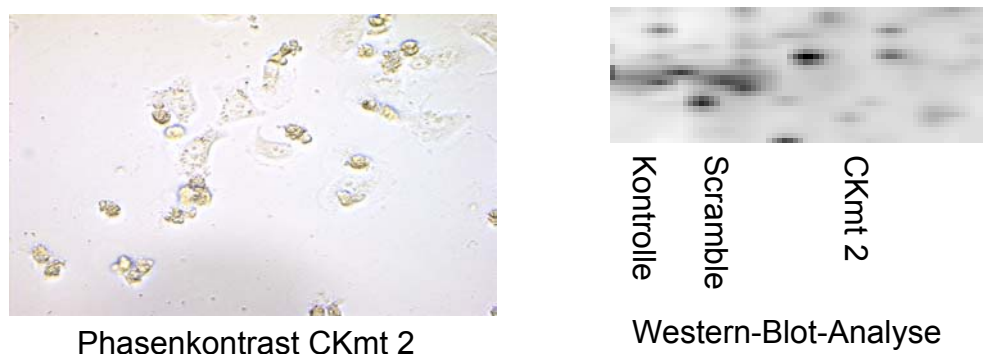


Abb. 4.4.3.4.a: Transfektion von HeLaS3-Zellen mit siRNA (CKmt 2) gegen CK-mt

Phasenkontrast-Aufnahme und Western-Blot-Analyse nach der Transfektion mit CKmt 2 sind dargestellt. In der Western-Blot-Analyse wurde das Ausschalten des Zielproteins (CK-mt) überprüft. Dazu wurden zytoplasmatische Extrakte aus untransfizierten (**Kontrolle**), mit der Scramble (**Scramble**) und mit CKmt 2 (**CKmt 2**) transfizierten Zellen aufgetragen.

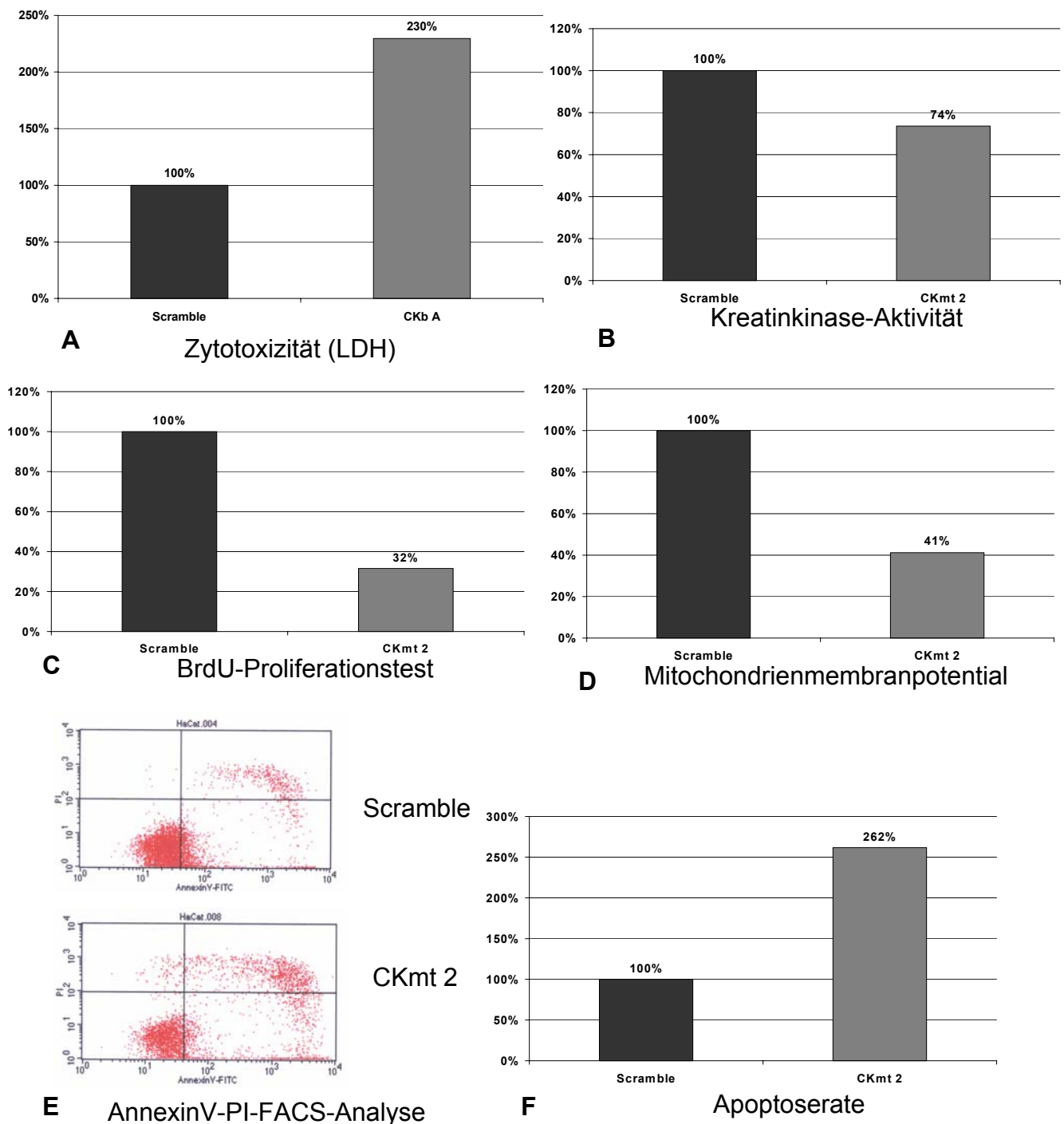


Abb. 4.4.3.4.b: Transfektion von HeLaS3-Zellen mit siRNA (CKmt 2) gegen CK-mt

Die Ergebnisse der an die Transfektion anschließenden verschiedenen Experimente sind im Überblick dargestellt. Zunächst wird die Zytotoxizität der Transfektion (A) durch Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) und die Messung der Kreatinkinase-Aktivität (B) gezeigt. In weiteren Untersuchungen wurde die Proliferation (C) über den BrdU-Einbau gemessen und das Mitochondrienmembranpotential (D) mit Hilfe des Fluorophors JC-1 bestimmt. Als letzter Test wurde die Auswirkung der Transfektion auf Apoptose (F) und Nekroseprozesse mit einer FACS-Analyse gegen Annexin V und Propidiumjodid PI (E) überprüft. Die Daten der mit CKb A transfizierten Zellen (CKmt 2, jeweils rechts) sind auf die als 100% gesetzten mit der Scramble-siRNA transfizierten Zellen (Scramble, jeweils links) relativiert.

Im Folgenden sollen nun die zuvor an exemplarischen Beispielen gezeigten Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen zusammenfassend dargestellt werden. Hierbei werden die Ergebnisse der mehrmals (je nach zellphysiologischem Parameter n=3 bis n=5) durchgeführten Experimente unter den verschiedenen Transfektionsbedingungen (s. Tab. 4.4.3.4.) miteinander verglichen.

			Kapitel
Zytotoxizität (LDH)	HaCat,HeLaS3 siRNA gegen CK-BB und CK- mt	n=5	4.4.3.5.
Proliferation (BrdU)	HaCat,HeLaS3 siRNA gegen CK-BB und CK- mt	n=3	4.4.3.6.
Kreatinkinase-Aktivität	HaCat,HeLaS3 siRNA gegen CK-BB und CK- mt	n=3	4.4.3.7.
Mitochondrienmembranpotential	HaCat,HeLaS3 siRNA gegen CK-BB und CK- mt	n=3	4.4.3.8.
Apoptose/Nekrose	HaCat,HeLaS3 siRNA gegen CK-BB und CK- mt	n=3	4.4.3.9.

Tab. 4.4.3.4 : Zusammenfassung der Ergebnisse

Die entsprechenden zellphysiologischen Parameter wurden jeweils für HaCat- und HeLaS3-Zellen, sowie für die Transfektion mit den siRNAs CKb A und CKmt 2 in dem genannten Kapitel in einer Darstellung zusammengefasst und diskutiert. N gibt die Fallzahl für den jeweiligen Parameter an.

4.4.3.5. Zytotoxizität (LDH) nach siRNA Transfektion

Die Zytotoxizität nach Transfektion mit Inaktivierung der CK-BB bzw. CK-mt wurde über die Messung der Laktatdehydrogenase (LDH) bestimmt (s. 3.6.1.). Abbildung 4.5.3.5. zeigt die Ergebnisse für die Untersuchungen (n=5) an HaCat- und HeLaS3-Zellen. Die HaCat-Zellen zeigen bei der Transfektion mit siRNA gegen CK-BB nur einen leichten Anstieg der Zytotoxizität auf 108%. Bei Transfektion mit siRNA gegen CK-mt fällt die zytotoxische Wirkung mit 129% deutlicher aus. HeLaS3-Zellen zeigen

dagegen in beiden Fällen eine viel höhere Zytotoxizität, d.h. nach Ausschalten der CK-BB auf 165% und bei Inaktivierung der CK-mt auf 217%.

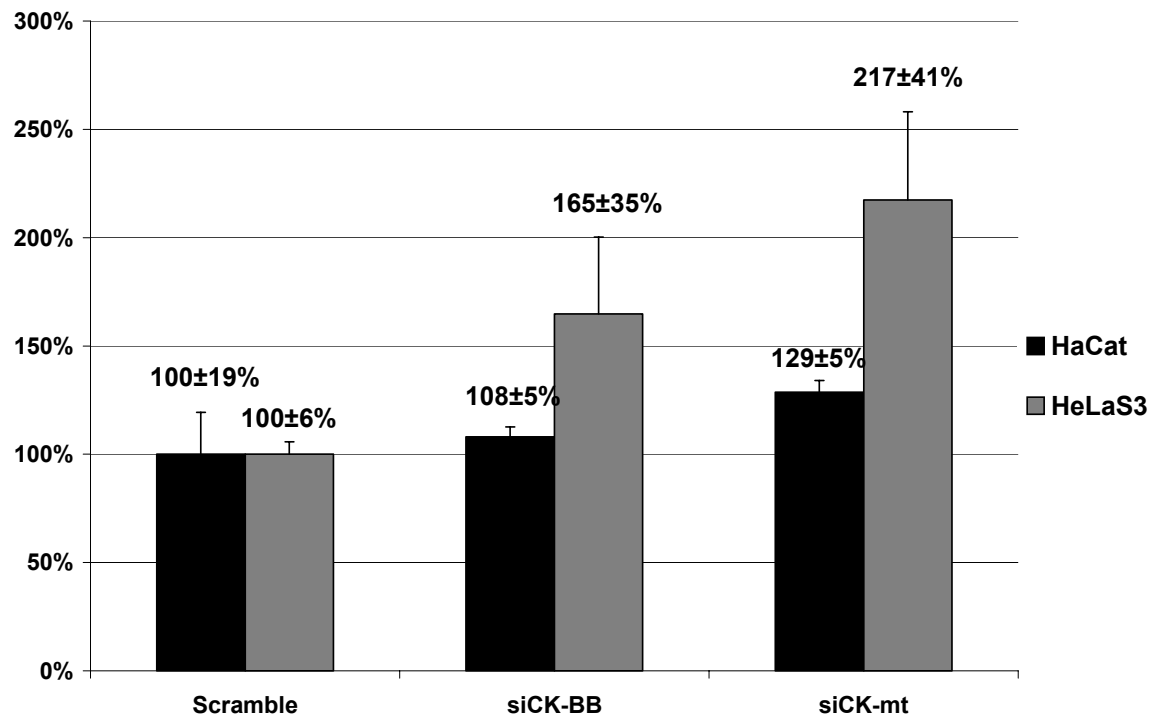


Abb. 4.4.3.5.: Zytotoxizität der siRNA transfizierten HaCat- und HeLaS3-Zellen (n=5)
Die Zytotoxizität nach Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB (*siCK-BB*) und CK-mt (*siCK-mt*) wurde über die Laktatdehydrogenase bestimmt. Dargestellt ist der Quotient aus der LDH im Überstand und der Gesamt-LDH (LDH im Überstand und LDH in den Zellen). Die Werte für HaCat und HeLaS3 sind auf die jeweilige Scramble-Kontrolle (=100%) relativiert.

4.4.3.6. Proliferation (BrdU) nach siRNA Transfektion

Die Bestimmung der Zellproliferation erfolgte über die Bestimmung des BrdU-Einbaus (s. 3.6.2.). In Abbildung 4.5.3.6 sind die Ergebnisse für die Experimente (n=3) an HaCat- und HeLaS3-Zellen dargestellt. Bei den HaCat-Zellen geht die Proliferationsrate nach Transfektion mit siRNA gegen CK-BB bzw. CK-mt auf 81% bzw. 56% zurück. Die HeLaS3-Zellen zeigen auch in der Proliferationsrate eine deutlichere Reduktion im Vergleich zu HaCat-Zellen auf 83% bzw. nur noch 43%.

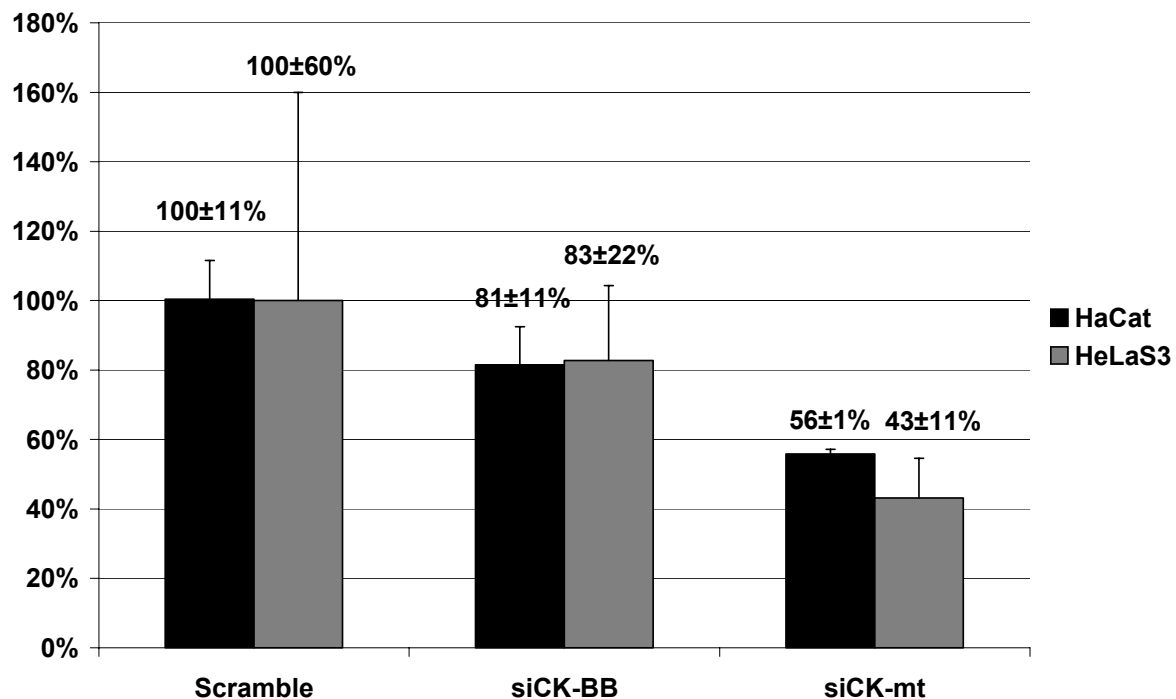


Abb. 4.4.3.6.: Proliferation der siRNA transfizierten HaCat- und HeLaS3-Zellen (n=3)
 Die Proliferation nach Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB (**siCK-BB**) und CK-mt (**siCK-mt**) wurde über den Einbau von BrdU bestimmt. Die Zellen wurden hierbei 48 Stunden nach Transfektion für 24 Stunden inkubiert und der BrdU-Einbau im Photometer gemessen. Die Werte für HaCat- und HeLaS3-Zellen sind auf die jeweilige Scramble-Kontrolle (=100%) relativiert.

4.4.3.7. Kreatinkinase-Aktivität nach siRNA Transfektion

Auch die Kreatinkinase-Aktivität (s. 3.5.) wurde nach der Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB und CK-mt bestimmt. In Abbildung 4.5.3.7. ist die Kreatinkinase-Aktivität nach den beiden Transfektionsbedingungen (n=3) an HaCat- und HeLaS3-Zellen dargestellt. Die HaCat-Zellen zeigen in der Kreatinkinase-Aktivität nach Transfektion mit siRNA gegen CK-BB, die hier auch nur sehr schwach exprimiert wird (s. 4.1.1.), keine Reduktion und die Aktivität bleibt mit 117%, unter Berücksichtigung der relativ hohen Standardabweichung, fast unverändert. Das Ausschalten der CK-mt mit entsprechenden siRNAs zeigt dagegen ein Absinken der Kreatinkinase-Aktivität auf nur noch 38%. Bei den HeLaS3-Zellen zeigt sich ein etwas anderes Bild. Hier lässt sich durch Transfektion mit siRNA gegen CK-BB, der in diesem Zelltyp stärker exprimierten Isoform (s. 4.1.1.), das deutlichere Absinken der Kreatinkinase-Aktivität auf 21% erreichen. Im Vergleich dazu sinkt die Aktivität

nach Transfektion mit siRNA gegen CK-mt nur auf 51%. Die Tatsache, dass sich auch bei der Inaktivierung der nur sehr schwach in HeLaS3-Zellen exprimierten CK-mt (s. 4.1.1.) eine Reduktion in der Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität beobachten lässt, kann ein Hinweis auf die wichtige Rolle auch kleiner Mengen CK-mt sein.

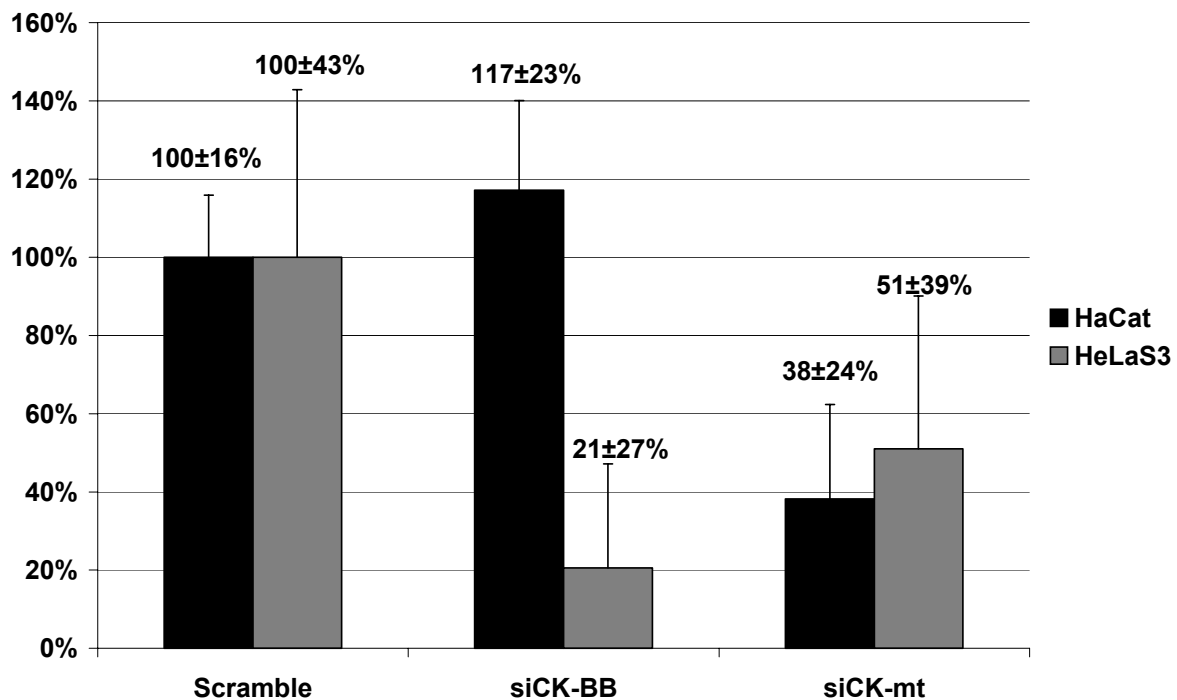


Abb. 4.4.3.7.: Kreatinkinase-Aktivität der siRNA transfizierten HaCat- und HeLaS3-Zellen (n=3)

Die Kreatinkinase-Aktivität wurde 72 Stunden nach Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB (*siCK-BB*) und CK-mt (*siCK-mt*) in zytoplasmatischen Extrakten gemessen. Die Werte für HaCat- und HeLaS3-Zellen sind auf die jeweilige Scramble-Kontrolle (=100%) relativiert.

4.4.3.8. . Messung der JC-1 Fluoreszenz zur Bestimmung des Mitochondrien-Membran-Potentials nach siRNA Transfektion

Als weiterer Parameter wurde das Mitochondrienmembranpotential (s. 3.6.3.) nach der Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB und CK-mt bestimmt. In Abbildung 4.5.3.8. ist das $\Delta\Psi$ nach den beiden Transfektionsbedingungen (n=3) an HaCat- und HeLaS3-Zellen dargestellt. Die HaCat-Zellen zeigen wie auch bei der Bestimmung der Kreatinkinase-Aktivität nach Transfektion mit siRNA gegen CK-BB keinen Effekt und das $\Delta\Psi$ bleibt mit 103% fast unverändert. Das Ausschalten der CK-mt mit entsprechenden siRNAs zeigt dagegen ein leichtes Absinken des $\Delta\Psi$ auf 91%. Die

HeLaS3-Zellen zeigen deutlichere Effekte. Hier lässt sich sowohl durch Transfektion mit siRNA gegen CK-BB als auch mit der gegen CK-mt ein Absinken im $\Delta\Psi$ auf 70% erreichen.

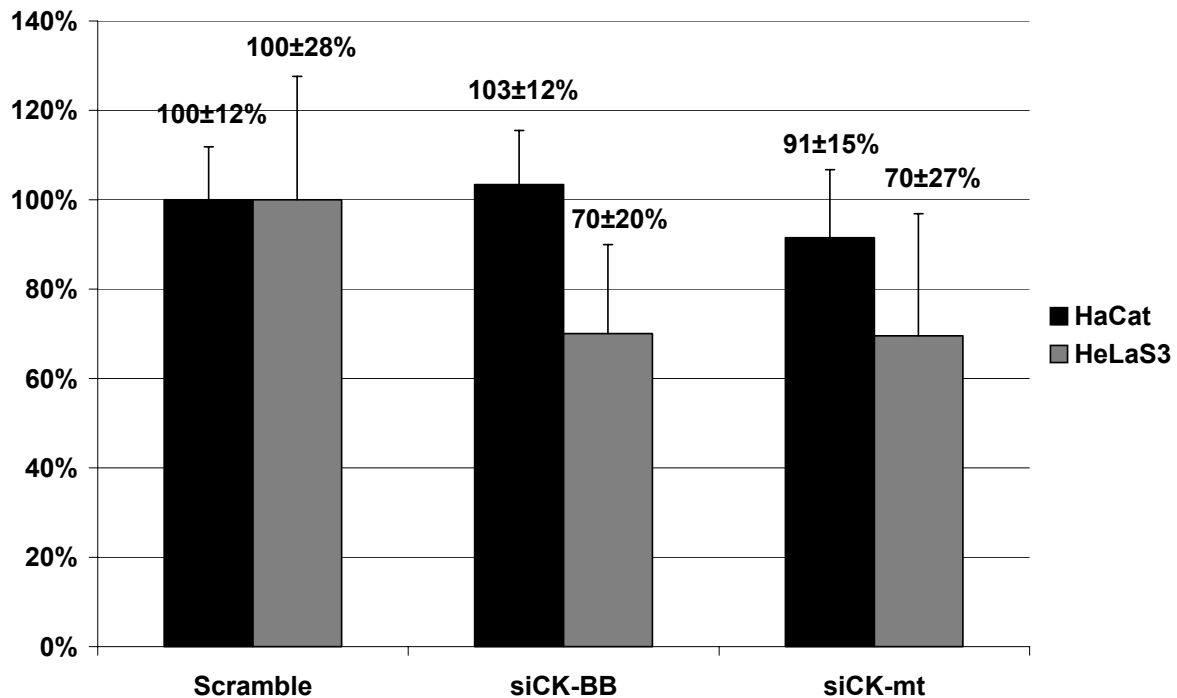
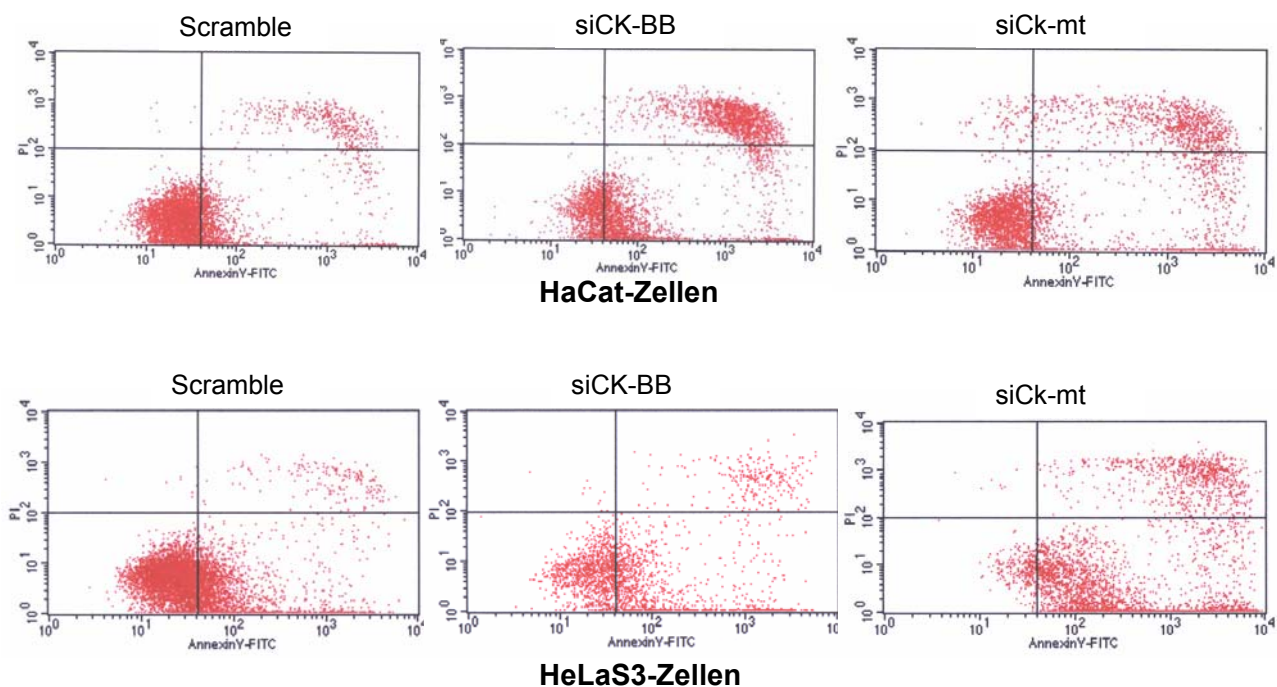


Abb. 4.4.3.8.: Mitochondrienmembranpotential ($\Delta\Psi$) der siRNA transfizierten HaCat- und HeLaS3-Zellen (n=3)

Das Mitochondrienmembranpotential wurde nach Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB (**siCK-BB**) und CK-mt (**siCK-mt**) über die Fluoreszenz des Fluorophors JC-1 bestimmt. Die Bestimmung des oben dargestellten JC-1 Quotienten (EX 485nm/EM 590, EX 485nm/EM 530nm) wurde am Floreszenzphotometer vorgenommen. Die Werte für HaCat- und HeLaS3-Zellen sind auf die jeweilige Scramble-Kontrolle (=100%) relativiert.

4.4.3.9. Annexin V-FACS-Analyse nach siRNA Transfektion

Durch eine FACS-Analyse mit Annexin V und Propidiumjodid markierten Zellen (s. 3.6.4.) wurde sowohl die Apoptose- als auch die Nekroserate bestimmt. Apoptotische Zellen sind hierbei die Annexin V-positiven (früher apoptotischer Marker) und gleichzeitig Propidiumjodid-negativen (Marker für die Integrität der Zellmembran) Zellen. Nekrotische Zellen sind dagegen Annexin V und gleichzeitig Propidiumjodid positiv. In Abbildung 4.4.3.9.a ist für jede Transfektionsbedingung eine exemplarische FACS-Analyse dargestellt.



4.4.3.9.a: FACS-Analyse der siRNA transfizierten HaCat- und HeLaS3-Zellen

Bilder der FACS-Analyse nach Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB (**siCK-BB**) und CK-mt (**siCK-mt**) sind dargestellt. Annexin V-Fluoreszenz ist auf der x-Achse und Propidiumjodid-Fluoreszenz auf der y-Achse aufgetragen. Als apoptotisch werden die Zellen im rechten, unteren Fenster (Annexin V positiv/ Propidiumjodid negativ) und als nekrotisch die Zellen im rechten, oberen (Annexin V positiv/ Propidiumjodid positiv) Fenster angesehen.

Abbildung 4.4.3.9.b zeigt den prozentualen Anteil an apoptotischen Zellen nach Transfektion mit siRNAs (n=3). In HaCat-Zellen bewirkt das Ausschalten der CK-BB einen Anstieg auf 208% und das Ausschalten der CK-mt eine Erhöhung auf 139%. Bei den HeLaS3-Zellen zeigt sich bei der Inaktivierung der CK-mt der deutlichere Anstieg in der Apoptoserate auf 262% im Vergleich zur Transfektion mit siRNA gegen CK-BB, bei der die Apoptoserate auf nur 155% ansteigt.

In Abbildung 4.4.3.9.c ist dann der prozentuale Anteil an nekrotischen Zellen dargestellt. Die Nekroserate steigt bei HaCat- und HeLaS3-Zellen nach Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB auf Werte von 388% bzw. 381%. Bei Inaktivierung der CK-mt zeigt sich dagegen ein deutlicher Unterschied von 295% bei HaCat-Zellen und 704% bei HeLaS3-Zellen.

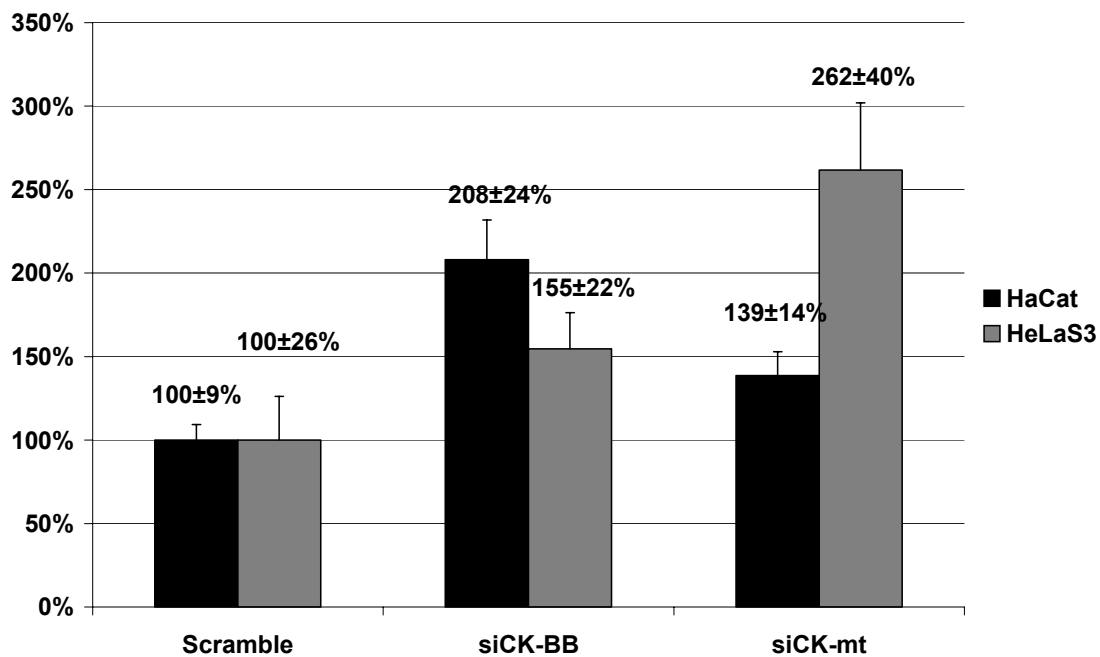


Abb.

4.4.3.9.b: Apoptoserate der siRNA transfizierten HaCat- und HeLaS3-Zellen (n=3)

Die Apoptoserate wurde nach Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB (*siCK-BB*) und CK-mt (*siCK-mt*) über eine FACS-Analyse gegen Annexin V und Propidiumjodid bestimmt. Es sind die prozentualen Anteile der Propidiumjodid-negativen und gleichzeitig Annexin V-positiven Zellen dargestellt. Die Werte für HaCat- und HeLaS3-Zellen sind auf die jeweilige Scramble-Kontrolle (=100%) relativiert.

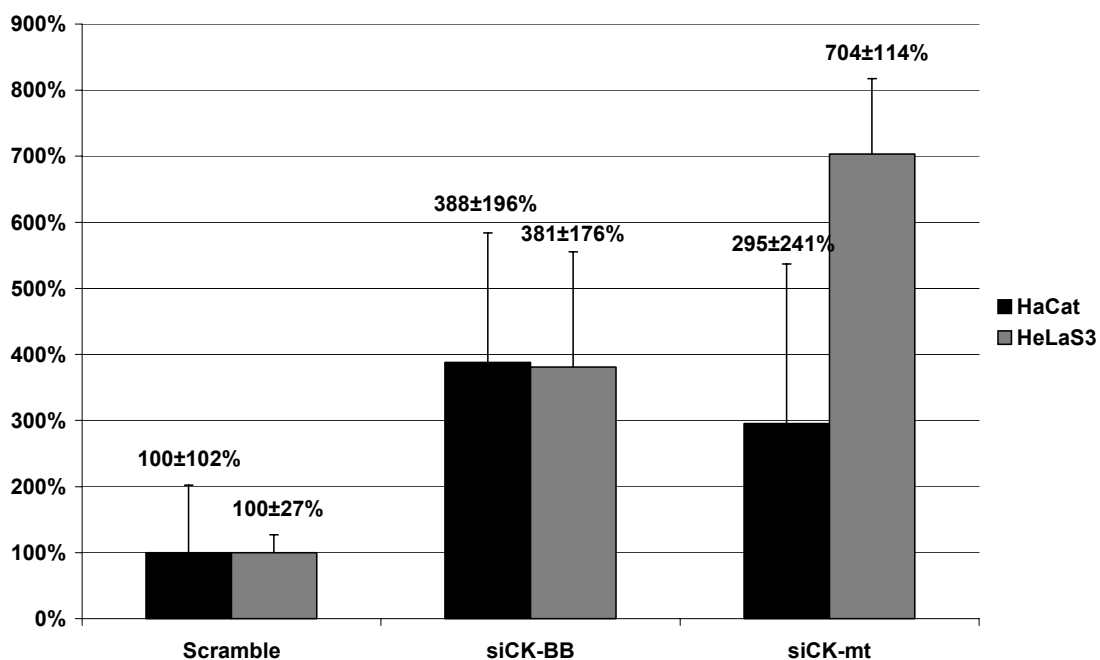


Abb. 4.4.3.9.c: Nekroserate der siRNA transfizierten HaCat- und HeLaS3-Zellen (n=3)

Die Nekroserate wurde nach Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB (*siCK-BB*) und CK-mt (*siCK-mt*) über eine FACS-Analyse gegen Annexin V und Propidiumjodid bestimmt. Es sind die prozentualen Anteile der Propidiumjodid-positiven und gleichzeitig Annexin V-positiven Zellen dargestellt. Die Werte für HaCat- und HeLaS3-Zellen sind auf die jeweilige Scramble-Kontrolle (=100%) relativiert.

4.4.3.10. Elektronenmikroskopie nach siRNA Transfektion

Im Anschluss an die siRNA Transfektion wurden ebenfalls Zellen für die Elektronenmikroskopie aufbereitet (s. 3.9.). Da für die Transfektion mit siRNAs gegen die CK-BB keine Unterschiede festgestellt werden konnten, sind hier nur die Ergebnisse für die Inaktivierung der CK-mt mit entsprechenden siRNAs gezeigt (Abb. 4.4.3.10.). Als besonders auffällig zeigen sich hierbei die Mitochondrien. Während die untransfizierten Zellen, sowohl bei HaCats (**A**) als auch bei HeLaS3 (**D**), keinen Unterschied zu den mit der unspezifischen Scramble siRNA transfizierten Zellen (**B** und **E**) erkennen lassen, zeigen sich nach Inaktivierung der CK-mt (**C** und **F**) deutliche Effekte. Bei beiden Zelltypen lässt sich hier eine Auflösung der Cristae-Struktur (Pfeil) in den Mitochondrien (**Mi**) erkennen. Bei den HeLaS3-Zellen ist zudem eine deutliche Abnahme in der Menge des intrazellulären Glykogens (**Gly**) zu beobachten.

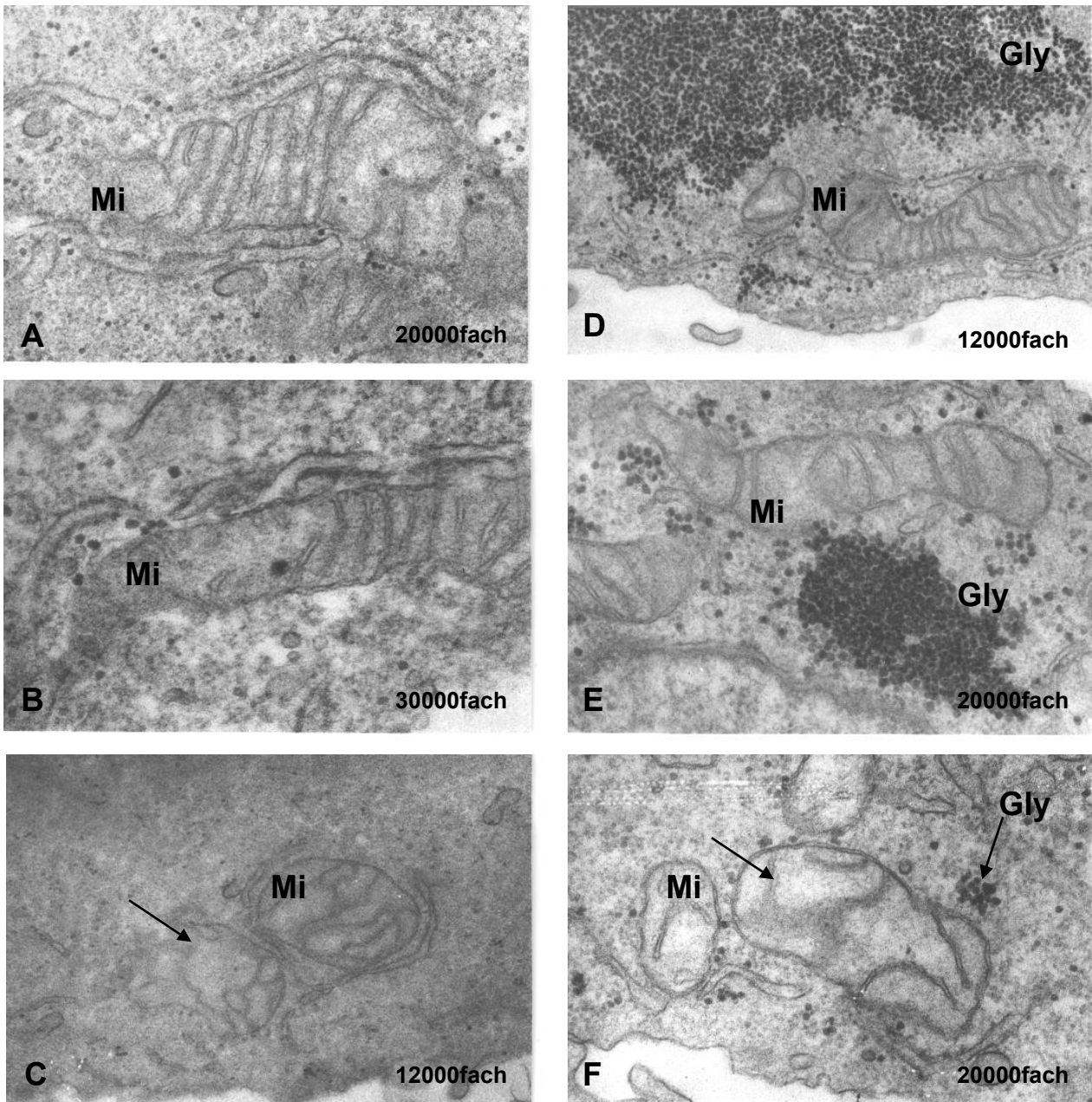


Abb. 4.4.3.10.: Elektronenmikroskopie nach siRNA Transfektion von HaCat- und HeLaS3-Zellen

Die elektronenmikroskopischen Bilder nach Transfektion von HaCat- (A, B und C) und HeLaS3-Zellen (D, E und F) nach Transfektion mit siRNA CK-mt ist dargestellt. A und D zeigen die untransfizierte Kontrolle, B und E die Scramble-Kontrolle und C und F die mit siRNA gegen CK-mt transfizierten Zellen. **Mi**: Mitochondrien; **Gly**: Glykogen; **Pfeil**: Christae

5. Diskussion

5.1. Das Vorkommen des Kreatinkinase-Systems in humaner Haut

5.1.1. Immunhistologische Nachweise der Kreatinkinasen und des Kreatintransporters

Das Kreatinkinase-System besteht aus dem Kreatintransporter CT, den verschiedenen Isoenzymen der Kreatinkinase (CK-BB, CK-MM, CK-MB im Zytosol und der mitochondrialen CK-mt) und dem Substrat dieser Kinasen, dem Kreatin bzw. Phosphokreatin. Im weiteren können noch die Enzyme der Kreatinsynthese (GAMT und AGAT) dazugezählt werden. Das Kreatinkinase-System gewährleistet über die Bereitstellung von ATP aus Phosphokreatin die Aufrechterhaltung der Energie-Homeoöstase vor allem in Zellen mit hohem energetischem Bedarf (Wallimann et al., 1992), wie z.B. Skelett- und Herzmuskelzellen, Neuronen und Spermatozoen. Während zur Bedeutung von Kreatin und dessen Metabolismus im Muskel eine Vielzahl von Untersuchungen existieren (s. 1.4. und 1.5.), ist über die Rolle von Kreatin, der verschiedenen Kreatinkinasen und des Kreatintransporters in der humanen Haut nur wenig bekannt.

Zwar konnte das Vorkommen der CK-BB in Saugblasenflüssigkeit humaner Haut (Paavonen *et al.*, 1988) gezeigt werden, aber dem widersprechend wiesen Zemtsov und Kollegen 1994 die CK-MM in muriner und humaner Haut nach. Vor kurzem erst wurde jedoch das Vorkommen der CK-BB und CK-mt sowie des CT in muriner und humaner Haut beschrieben (Schlattner *et al.*, 2002). Damit wurden die Ergebnisse von Paavonen bestätigt und die Beobachtungen von Zemtsov gleichzeitig widerlegt. In den Untersuchungen von Schlattner und Kollegen zeigen murine und humane Haut ein ähnliches Expressionsmuster für CK-BB, CK-mt und CT. Näher wurde die Bedeutung der Kreatinkinasen in Bezug auf die Wundheilung untersucht. Hier lässt sich bei der Maus eine Hochregulierung der CK-BB und der CK-mt auf Proteinebene im Verlauf des Wundheilungsprozesses beobachten. Dieses spricht für die wichtige Rolle des Kreatinkinase-Systems in Zellen mit hohem energetischem Bedarf. Wobei dieser durch erhöhten Energieverbrauch durch z.B. Muskelkontraktion oder auch

durch hohe biosynthetische Aktivität, wie hier z.B. durch den Prozess der Wundheilung, hervorgerufen werden kann.

In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte die Lokalisation der CK-BB, CK-mt und des CT in humaner Haut bestätigt werden. Die CK-MM, wie von Zemtsov und Kollegen beschrieben, konnte weder mit immunhistologischen, noch mit Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Sowohl für die CK-BB und die CK-mt zeigt sich eine deutliche Lokalisation in der Epidermis (s. A und B in Abb. 4.1.1.a). Bei beiden Isoenzymen zeigt sich zudem eine etwas stärkere Expression im Stratum basale und suprabasale. Dies könnte als ein Hinweis für die besondere Bedeutung des Kreatinkinase-Systems im mitotisch aktiven Teil der Epidermis angesehen werden. Für diese Möglichkeit spricht auch die verminderte Proliferation nach Inaktivierung der Kreatinkinase-Expression (CK-BB und CK-mt) durch siRNA Transfektion (s. 4.4.3.6.). Während sich in den Zellkernen offensichtlich keine Kreatinkinase erkennen lässt, ist anhand der Gefriermikrotomschnitte nur wenig über die intrazelluläre Verteilung der CK-BB und CK-mt zu erkennen. Aus diesem Grund wurden Experimente zur Kolo-kalisation der CK-BB und CK-mt mit einem mitochondrialen Marker an Keratinozyten durchgeführt (s. Abb. 4.1.1.b). Hier zeigt sich dann für die CK-BB eine mehr zytosolische Lokalisation, während die CK-mt vor allem in Kolo-kalisation mit den Mitochondrien auftritt. Die Tatsache, dass sich auch bei der zytosolischen CK-BB eine gewisse Kompartimentierung erkennen lässt, ist wohl auf das Vorkommen so genannter assoziierter CK (Wallimann *et al.*, 1998) zurückzuführen, die bei dem Prozess der Fixierung weniger stark ausgewaschen werden. So kann die zytosolische Kreatinkinase funktionell und strukturell sowohl an Stellen der Energieproduktion (z.B. Glykolyse, Mitochondrien), als auch des Energieverbrauchs (ATPasen, wie z.B. Myosin ATPase) gekoppelt sein (Wallimann *et al.*, 1992).

Auch der CT konnte in Gefriermikrotomschnitten humaner Haut nachgewiesen werden (s. C in Abb. 4.1.1.a). Der CT ist dabei deutlich in den Plasmamembranen der epidermalen Keratinozyten lokalisiert. Besonders gut lässt sich dieses an dem Abflachen der Keratinozyten im Verlauf der terminalen Differenzierung erkennen. Während die Expression über alle Schichten der Epidermis hinweg einheitlich zu sein scheint, zeigt sich im Stratum basale in den direkt an die Basalmembran angrenzenden Bereichen der Keratinozyten so gut wie keine Expression. Ob dieses

auf Artefakte bei der Immunhistologie zurückzuführen ist oder aber eine funktionelle Bedeutung hat, konnte in der vorliegenden Untersuchung leider nicht geklärt werden.

5.1.2. Western-Blot-Analyse der Kreatinkinasen und des Kreatintransporters

Die CK-BB, CK-mt und der CT konnten auch mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden (s. 4.1.2.). Der CT wurde hierbei an Proteinextrakten aus Saugblasen nachgewiesen. Hierbei zeigen sich keine Expressionsunterschiede zwischen einer topischen Vorbehandlung der humanen Haut mit einer 0,1% Kreatin enthaltenden Formulierung und Behandlung mit einem Placebo bzw. unbehandelter Haut (s. Abb. 4.1.2.a). Zumindest für die eingesetzte Konzentration von 0,1% Kreatin und dem Behandlungszeitraum von 2 Wochen kann also eine Herunterregulierung des CT, wie von Harris und Kollegen 1992 für längere Zeit erhöhten, extrazellulären Kreatinspiegel beschrieben, ausgeschlossen werden.

Die CK-BB und CK-mt wurden zudem nicht nur in Saugblasenepidermis humaner Haut, sondern auch an zytoplasmatischen Extrakten primärer, humaner Keratinozyten nachgewiesen (s. Abb. 4.1.2.b und c).

Die zusammengefassten Ergebnisse der immunhistologischen Untersuchungen und der Western-Blot-Analysen widerlegen die von Zemtsov und Kollegen 1994 publizierten Daten, in denen die CK-MM in der humanen Haut beschrieben wird und bestätigen bzw. ergänzen zudem die von Schlattner und Kollegen 2002 getroffenen Beobachtungen. Auch der Nachweis der CK-BB in Saugblasenflüssigkeit (Paavonen *et al.*, 1988) passt in dieses Bild. Somit kann festgestellt werden, dass in der humanen Haut das Kreatinkinase-System, bestehend aus CK-BB, CK-mt und dem CT, vorhanden ist.

5.1.3. Funktionelle Nachweise des Kreatinkinase-Systems in vitro

Nachdem die verschiedenen Bestandteile des Kreatinkinase-Systems in humaner Haut nachgewiesen werden konnten, wurde auch die Funktionalität der einzelnen Komponenten untersucht.

Zur Beurteilung der Funktion des CT wurden Experimente zur Aufnahme von radioaktiv markiertem (^{14}C) Kreatin durchgeführt. Die Untersuchungen fanden an primären, humanen Keratinozyten und primären, humanen, dermalen Fibroblasten statt. Vergleichbare Aufnahmestudien an humanen IMR-90 Fibroblasten, humanen glatten Uterus-Muskelzellen (Daly und Seifter, 1980) und an Dünndarmepithelzellen (Peral *et al.*, 2002) sind dabei schon aus der Literatur bekannt. In diesen Studien wurde jeweils Guanidinopropionsäure (GPA) als kompetitiver Inhibitor des CT zur Kontrolle eingesetzt. Die Verwendung von weniger ähnlichen Strukturhomologen, wie z.B. Choline und Taurin zeigte dagegen keine kompetitive Wirkung. Dieses spricht für hohe Substratspezifität des CT (Peral *et al.*, 2002). So zeigt sich in den eigenen Aufnahmeuntersuchungen sowohl für primäre, humane Keratinozyten (s. Abb. 4.1.3.a) als auch für primäre, humane, dermale Fibroblasten (s. Abb. 4.1.3.b) eine deutliche Aufnahme von ^{14}C -markiertem Kreatin. In beiden Fällen lässt sich zudem durch Zugabe von GPA im Überschuss die Aufnahme deutlich (s. 4.1.3.a) bzw. fast vollständig (s. 4.1.3.b) inhibieren. Die Aufnahme des radioaktiv markierten Kreatins unterscheidet sich nicht nur in der unterschiedlich starken Reaktion auf den Inhibitor GPA, sondern auch in der Menge an aufgenommenem ^{14}C -markiertem Kreatin bzw. in der Kinetik der Aufnahme. Die Fibroblasten zeigen (relativiert auf Proteingehalt) eine um das 10fache verringerte Aktivität des aufgenommenen radioaktiv markierten Kreatins nach 60 Minuten im Vergleich zu den bei Keratinozyten beobachteten Werten. Ferner lässt sich bei den Fibroblasten nach 60 Minuten bereits eine Sättigung der Aufnahme erkennen, während diese bei den Keratinozyten sich noch nicht beobachten lässt. Ähnliche Unterschiede in der Kinetik können auch zwischen anderen Zelltypen (z.B. Enterozyten aus dem Huhn und Dünndarmzellen der Ratte; Peral *et al.*, 2002) beobachtet werden. Insgesamt beweisen diese Untersuchungen nicht nur die Funktionalität des Kreatintransporters in Keratinozyten und Fibroblasten *in vitro*, sondern spiegeln auch die immunhistologischen Befunde an Hautbiopsien (s. Abb. 4.1.1.a) wider, bei denen der CT in der Epidermis lokalisiert werden konnte. D.h. auch wenn Fibroblasten den CT exprimieren, scheint dieses aufgrund der Aufnahmestudien in deutlich geringerem Ausmaß der Fall zu sein als bei Keratinozyten. Dieses und die Tatsache, dass Fibroblasten in der Dermis nur spärlich verteilt vorkommen, kann als Grund für eine nicht zu erkennbare immunhistologische Lokalisation des CT in der Dermis von humanem Biopsiematerial angesehen werden.

Untersuchungen der mRNA von Fibroblasten könnten dieses klären und die Expression des CT nachweisen.

Weiterhin wurde auch die Funktionalität der CK in Keratinozyten und Fibroblasten humaner Spender untersucht (s. 4.2.1.). In beiden Zelltypen ließ sich eine deutliche Kreatinkinase-Aktivität bestimmen, wobei bei diesem Kreatinkinase-Test zunächst nicht zwischen der Aktivität der CK-BB und CK-mt unterschieden wurde und somit jeweils die Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität (CK-BB und CK-mt) ermittelt wurde. Auch hier zeigt sich eine niedrigere Aktivität bei Fibroblasten, was wiederum die vor allem in der Epidermis anzutreffende immunhistologische Lokalisation (s. Abb. 4.1.1.a) erklärt.

Neben dem Nachweis des Vorkommens eines Kreatinkinase-Systems in humaner Haut konnte somit auch die Funktionalität der nachgewiesenen Proteine CK-BB bzw. CK-mt und CT gezeigt werden.

5.2. Modell des Kreatinkinase-Systems

Im Folgenden soll ein Modell des Kreatinkinase-Systems (s. Abb. 5.2.) dargestellt werden, welches als Grundlage für die Diskussion der Zusammenhänge zwischen CT, CK-BB, CK-mt, der Generierung freier Radikale (extrinsisch und intrinsisch), der Kreatinsynthese und der Supplementation mit Kreatin dienen soll. Zudem soll anhand dieses Modells die zentrale Rolle des Kreatinkinase-Systems für die Zelle erörtert werden. Hierzu werden vor allem auch die in den siRNA-Experimenten gewonnenen Erkenntnisse (s. 4.4.) herangezogen.

In dem Modell sind die zytosolische CK-BB, die in den Mitochondrien lokalisierte CK-mt und der CT in der Plasmamembran (Schlattner *et al.*, 2002 und 4.1.1.) dargestellt. Auch in der Mitochondrienmembran konnte ein CT nachgewiesen werden (Walzel *et al.*, 2002). Die dort beschriebene Lokalisation ist allerdings aufgrund inzwischen nachgewiesener Kreuzreaktivität des verwendeten Anti-CT-Antikörpers fraglich (Speer *et al.*, 2004). Trotzdem kann auch weiterhin von dem Vorhandensein eines mitochondrialen CT ausgegangen werden, da neben der Lokalisation des CT auch

Experimente zur Aufnahme von radioaktiv markiertem Kreatin durchgeführt wurden (Walzel et al., 2002).

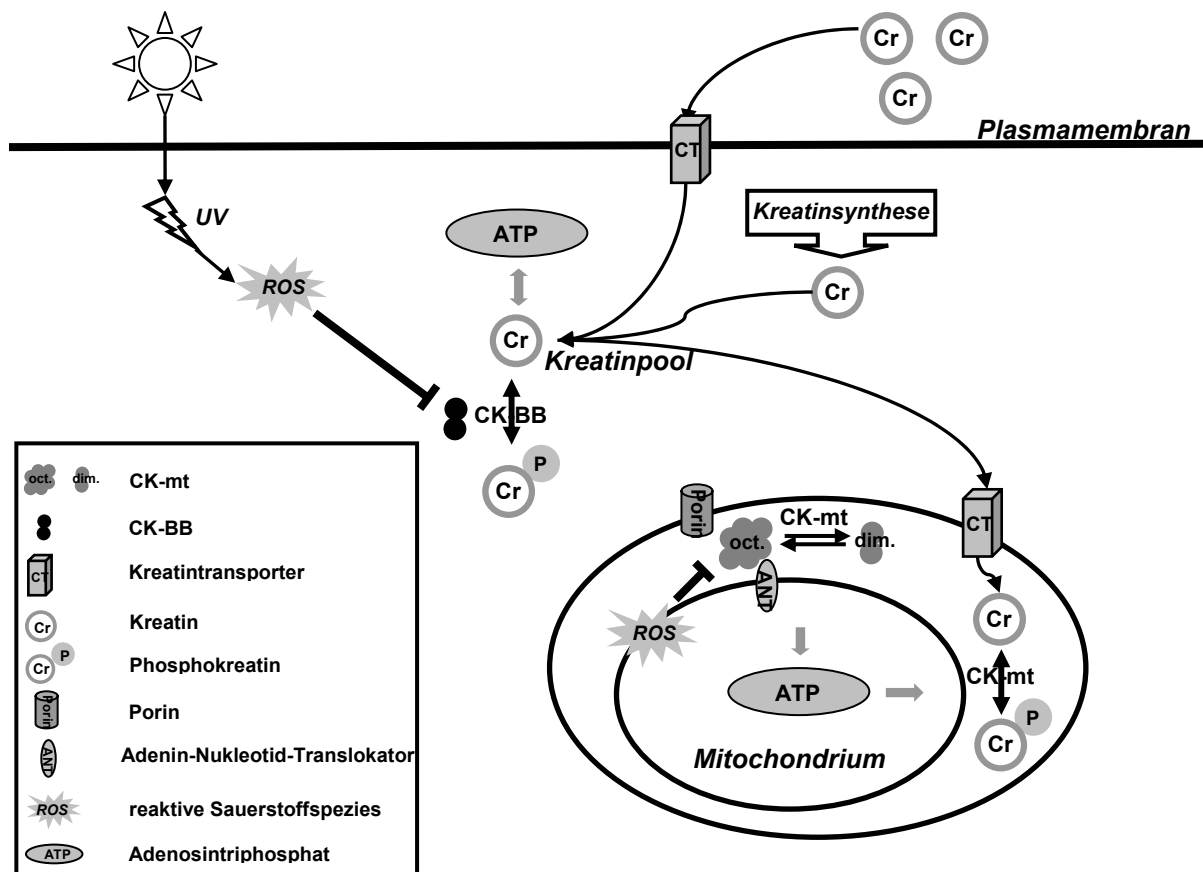


Abb. 5.2: Modell des Kreatinkinase-Systems

Es ist ein schematisches Modell des Kreatinkinase-Systems dargestellt. Neben der dimeren **CK-BB** im Zytosol wird die in einem Dimer-Oktamer-Gleichgewicht vorliegende **CK-mt** in den Mitochondrien gezeigt. Beide Enzyme können hierbei zur Energiespeicherung Kreatin (**Cr**) in Phosphokreatin bzw. zur Energiegewinnung in Form von **ATP** Phosphokreatin in Kreatin umsetzen. Der Kreatinpool der Zelle kann sowohl durch extrazelluläre Aufnahme über den **CT**, als auch über die intrazelluläre Kreatinsynthese gespeist werden. Der Kreatinpool ist nicht nur auf das Zytosol beschränkt, sondern erstreckt sich über einen Kreatintransporter auch in die Mitochondrien. Das dort vorliegende Kreatin ist in der Lage das Dimer-Oktamer-Gleichgewicht der **CK-mt** in Richtung Oktamer zu verschieben. Die oktamer Form der **CK-mt** stabilisiert wiederum durch Interaktion mit **Porin** und **ANT** die Verbindung zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. **ROS**, sowohl durch äußere Faktoren wie **UV-Licht**, als auch intrinsisch, z.B. in der Atmungskette der Mitochondrien, generiert, können die Kreatinkinase-Isoenzyme inhibieren (⊣).

Das von extrazellulär aufgenommene und das möglicherweise aus der Kreatinsynthese (Nachweis der Syntheseenzyme GAMT und AGAT in Humanhaut s. 4.3.) stammende Kreatin liegt also nicht nur zytosolisch, sondern auch in den Mitochondrien vor. Im Zytosol kann Kreatin durch CK-BB und vor allem auch in den Mitochondrien durch CK-mt unter Verbrauch von ATP (z.B. aus der Atmungskette) zu Phosphokreatin als Energiespeicher umgesetzt werden. Das in den Mitochondrien gebildete Phosphokreatin kann hierbei die Mitochondrien auch wieder über das Porin verlassen (Wyss *et al.*, 1992; Kay *et al.*, 2000, Dolder *et al.*, 2001) und an Stellen mit besonders hohem Energiebedarf von CK-BB unter Bildung von ATP wieder zu Kreatin umgesetzt werden. Diese Kombination von Energieproduzierenden und Energieverbrauchenden Prozessen (z.B. Na,K-ATPase; Guerrero *et al.*, 1997) wird auch als Phosphokreatin- oder Energie-„Shuttle“ bezeichnet (Wallimann *et al.*, 1992). Kreatin hat aber in den Mitochondrien noch eine weitere Funktion. So gibt es Hinweise, dass Kreatin als Substrat das Gleichgewicht von Dimer und Oktamer der CK-mt in Richtung Oktamer verschiebt (O’Gorman *et al.*, 1997). Diese oktamere Form wiederum bildet mit Porin in der äußeren und dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) in der inneren Mitochondrienmembran einen Komplex und stabilisiert so die Verbindung der beiden Membranen (Brdiczka *et al.*, 1994, Wallimann *et al.*, 1998, Dolder *et al.*, 2001). Für die CK-mt und Kreatin konnte so in verschiedenen Organen ein Einfluss auf die Öffnung der mitochondrialen Permeabilität-Transitions-Pore nachgewiesen werden (Wallimann *et al.*, 1998; Dolder *et al.*, 2002). Zudem führt die Fütterung von GPA, einem Fehlsubstrat der Kreatinkinase, an Ratten zu einem Verlust der Cristae-Struktur in Mitochondrien der Muskelzellen (O’Gorman *et al.*, 1997). Dies stellt ein weiteres Indiz für die wichtige Funktion der CK-mt in den Mitochondrien dar. In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchungen bestätigen diesen Befund. So zeigen Mitochondrien von HaCat- und HeLaS3-Zellen nach Ausschalten der CK-mt-Expression mittels siRNA-Technik ebenfalls elektronenmikroskopische Veränderungen der Cristae (s. Abb. 4.4.3.10.). Zudem lässt sich ein Abfallen des Mitochondrienmembranpotentials (s. Abb. 4.4.3.8.) und vermehrt auftretende Apoptoseprozesse (a. Abb. 4.4.3.9.b) beobachten.

Daneben gibt es auch Hinweise, dass die CK-mt von ROS inaktiviert werden kann (Stachowiak *et al.*, 1998). Dieses passt auch zu eigenen Befunden, bei denen der

Einsatz von Wasserstoffperoxid eine deutliche Reduktion der Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität zeigte (s. 4.2.2.4). Die auf die Kreatinkinase inhibitorisch wirkenden ROS können hierbei sowohl aus extrinsischen, wie z.B. UV-Licht (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997) oder aus intrinsischen, wie den Mitochondrien (Boveris und Chance, 1973), Quellen stammen. Weitere Auswirkungen einer Inhibition bzw. Inaktivierung der CK-BB und CK-mt auf die Zellphysiologie wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von siRNA-Experimenten untersucht und sollen im folgenden (s. 5.3.) noch ausführlicher diskutiert werden.

5.2.1. Kreatinkinase-Aktivität und Einfluss freier Sauerstoffspezies (ROS)

Zunächst sollen allerdings der Einfluss von ROS auf die Kreatinkinase in primären, humanen Keratinozyten und der Zusammenhang zum Alterungsprozess näher erörtert werden.

Für zahlreiche Zellen und Organe, insbesondere in Muskelgewebe (Carmeli *et al.*, 2002), konnten altersabhängige Veränderungen im zellulären Energiestoffwechsel nachgewiesen werden. So ist bekannt, dass z.B. die Menge der Enzyme des Zitratzyklus in der Skelettmuskulatur gealterter Ratten (Ermini, 1976) ebenso deutlich weniger werden, wie andere wichtige Bestandteile des Energiestoffwechsels. Hierzu gehören unter anderem Ziträt, Phosphokreatin und ATP in der Skelettmuskulatur älterer Menschen (Pastoris *et al.*, 2000). Ferner gibt es verschiedene Untersuchungen an Skelett- und Herzmuskulatur, die im Verlauf des Alterungsprozesses ein deutliches Absinken der Menge an Phosphokreatin (Verzar *et al.*, 1970; McCully *et al.*, 1991) und der Kreatinkinase-Aktivität (Steinhagen-Thiessen *et al.*, 1976; Bogatskavia *et al.*, 1981) zeigen.

Aufgrund dieser Befunde wurde auch die Kreatinkinase-Aktivität in primären, humanen Keratinozyten alter und junger Spender genauer untersucht. Hierbei zeigte sich dann ebenfalls ein leichtes Absinken der Kreatinkinase-Aktivität bei Keratinozyten alter Spender (s. Abb. 4.2.2.1.). Die Tatsache, dass dieser Unterschied nur sehr schwach ausfällt kann dabei mehrere Gründe haben.

Zum einen zeigt sich in den eigenen siRNA-Experimenten (s. 4.4.), wie wichtig die Kreatinkinasen für die Zelle sind, was eine gewisse Hochregulierung der Kreatinkinase-Expression zum Ausgleich der Defizienz bedeuten könnte. So ist

bekannt, dass die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) unter anderem vom Kreatin/Phosphokreatinverhältnis reguliert wird (Kemp *et al.*, 1999) und die AMPK wiederum möglicherweise die Expression bestimmter Energiestoffwechselrelevanter Gene beeinflusst (Leclerc *et al.*, 1998; Foretz *et al.*, 1998). Außerdem muss beachtet werden, dass die Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten wohl hauptsächlich auf die CK-mt-Aktivität zurückzuführen ist (s. 4.2.2.3) und somit selbst eine massive Inhibierung der CK-BB nur einen kleinen oder gar keinen Effekt auf die Gesamt-Aktivität zeigen würde. Diese Annahme bestätigt sich durch die Inaktivierung der CK-BB mit siRNAs in HaCat-Zellen (s. Abb. 4.4.3.7.). Hier hat das Ausschalten der CK-BB bei HaCat-Zellen unter Berücksichtigung der Standardabweichung kaum eine Auswirkung, während die Inaktivierung der CK-mt einen deutlichen Effekt zeigt.

Ein weiterer Grund für die nur geringe Steigerung könnte die bei den gemessenen Werten der Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität relativ hohe Spendervarianz sein (s. Anhang II.5.). Eine Ursache für diese schwankenden Messwerte, kann im Unterschied zwischen „chronologischen“ und „biologischen Alter“ liegen. Der Alterungsprozess kann nicht rein chronologisch erfasst werden, sondern ist von einer Vielzahl verschiedener Faktoren abhängig. Dazu gehören z.B. genetisch bedingte Einflüsse ebenso wie Ernährungsbedingungen und UV-Exposition (Oswald, 2000). Aus diesem Grund müssten sicher noch weitere Untersuchungen zur Erhöhung der Fallzahl folgen, um valide Aussagen über ein altersabhängiges Absinken der Kreatinkinase-Aktivität treffen zu können.

Eine Erklärung für das beobachtete, wenn auch nur schwach ausgeprägte Absinken der Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität könnte jedoch in der vermehrten Bildung von ROS während des Hautalterungsprozesses (Harman, 1956; Dolder, 2001) liegen. Die Haut ist während des menschlichen Lebens in besonderer Weise verschiedenen Umweltstressoren ausgesetzt. So kommt es durch die UV-Strahlung des Sonnenlichtes zur vermehrten Bildung von ROS (Scharffetter-Kochanek *et al.*, 1997). Ferner tritt oxidativer Stress in Hautzellen auch während Entzündungsprozessen oder als Nebenwirkung der mitochondrialen Energiegewinnung, insbesondere während des Alterungsprozesses, auf (Sohal, 1991; Lee und Wei, 1997). Erhöhte Stressbedingungen können dann wiederum die Mitochondrien schädigen und dadurch deren Fähigkeit zur Energiebereitstellung in Form von ATP vermindern. Dieses kann z.B. an einem Absinken des Mitochondrienmembranpotentials gezeigt

werden (Blatt, 1999). Eine Untersuchung der Kreatinkinase-Aktivität unter leichtem H_2O_2 -Stress zeigte eine sehr deutlich Verminderung (s. Abb. 4.2.2.4.). Ähnliche Untersuchungen ergeben ebenfalls eine Reduktion der Kreatinkinase-Aktivität im Herzmuskel, Skelettmuskel und Gehirngewebe der Ratte nach Behandlung mit H_2O_2 bzw. Superoxidanionen (Genet *et al.*, 2000). Diese Sensitivität der Kreatinkinase, insbesondere der CK-mt, welche eine wichtige Rolle bezüglich oxidativen Stresses in Keratinozyten spielt (s. Abb. 4.2.3.3.c), könnte Ursache für eine Störung des Porin/CK-mt/ANT-Komplexes (s. Abb. 5.2.) in Keratinozyten alter Spender sein. Dies würde zu einer Reduktion des Mitochondrienmembranpotentials führen, wie es nach Ausschalten der CK-mt beobachtet werden kann (s. Abb. 4.4.3.8.). Dadurch kann es zu einer verringerten ATP-Bereitstellung und verbunden mit der inhibierten Aktivität der CK-mt auch zu einer deutlich verminderten Bildung von Phosphokreatin kommen. Hiermit würde wiederum die Energie-„Shuttle“-Funktion des Phosphokreatins und die Bereitstellung von Energie in Form von ATP an Stellen besonders hohen Energiebedarfs (s. 5.2.) stark eingeschränkt. Der Verlust einer einwandfreien Energieversorgung zahlreicher wichtiger Enzymsysteme, wie Na,K-ATPase, könnte somit zum Alterungsprozess der Haut beitragen.

5.2.2. Protektive Effekte des Kreatins

Für Kreatin sind zahlreiche positive Wirkungen beim Einsatz als Nahrungsergänzungsmittel im Sport, aber auch beim Einsatz gegen neurodegenerative Erkrankungen bekannt (s. 1.5.1. und 1.5.2.). Daneben gibt es auch Hinweise auf direkte antioxidative Eigenschaften von Kreatin (Lawler *et al.*, 2002) und für eine Schutzfunktion gegen UV-induzierte „common deletion“ (eine der häufigsten Mutationen der mitochondrialen DNA) der Mitochondrien-DNA. So zeigten *in vitro*-Untersuchungen geringere common-deletion Bildung nach UV-Bestrahlung, wenn die Zellen zuvor mit Kreatin behandelt wurden (Krutmann, 2001). Nukleäre DNA wurde in diesem Zusammenhang nicht näher untersucht.

Nachdem sichergestellt war, dass Keratinozyten *in vitro* Kreatin aufnehmen können (s. Abb. 4.1.3.1.), wurde aus diesem Grund die Kreatinkinase-Aktivität mit und ohne Kreatin-Supplementation in primären, humanen Keratinozyten gemessen (s. Abb.

4.2.2.2.). Dabei lässt sich bei Zellen alter Spender ein Anstieg der Kreatinkinase-Aktivität bestimmen. Auch wenn dieser Anstieg für $n=13$ statistisch signifikant ist, fällt er mit 23% recht niedrig aus und liegt innerhalb der Spenderabhängigen, natürlichen Schwankungsbreite der unbehandelten Zellen. Mögliche Gründe für diese Spender-varianz wurden weiter oben schon erörtert. Auch hier wäre eine Absicherung der beobachteten Aktivitätssteigerung nach Kreatin-Supplementation durch eine Erhöhung der Fallzahl sicher sinnvoll. Bei Zellen junger Spender, die von Anfang an bereits eine höhere Enzymaktivität aufweisen, kann dahingegen kein solcher Anstieg festgestellt werden. Die Enzymaktivitätssteigernde Wirkung von Kreatin zeigt sich allerdings auch im Trend in der CK-mt enthaltenden Organellen-Fraktion (s. Abb. 4.2.2.4.c) und auch unter Bedingungen direkten oxidativen Stresses (s. Abb. 4.2.2.4.) lässt sich ein protektiver Effekt beobachten. Für die CK-mt ist zudem auch die Inhibition durch ROS, insbesondere Peroxynitrit, und der Schutz durch Kreatin bzw. Phosphokreatin vor dieser Inaktivierung bekannt (Stachowiak *et al.*, 1998). Deshalb kann die beobachtete Reduktion der Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten alter Spender auch in Zusammenhang mit oxidativen Stress-Bedingungen, wie sie während des Alterungsprozesses auftreten, gesehen werden.

Ferner besteht die Möglichkeit, dass die Abnahme des intrinsischen Gehaltes von Kreatin hauptsächlich auf eine geringere Vaskularisierung der Haut im Alter (Chung *et al.*, 2002) zurückzuführen ist. Diese Schlussfolgerung scheint berechtigt, da die erhöhte zelluläre Aufnahme von Kreatin möglicherweise in der Lage ist, die altersbedingte Reduktion der Kreatinkinase-Aktivität rückgängig zu machen. Ein Grund hierfür könnte der Schutz des Enzyms, sowohl CK-BB als auch CK-mt, gegen ROS verursachte Schäden sein (Lawler *et al.*, 2002).

Die in der vorliegenden Arbeit getroffenen Beobachtungen zur Kreatinkinase-Aktivität zusammen mit den beschriebenen positiven Effekten von Kreatin auf die Stabilisierung der Mitochondrienmembran (s. 5.2.) und auf den Schutz vor ROS (s. oben) sprechen alles in allem für eine schützende und stimulierende Wirkung von Kreatin auf das Kreatinkinase-System. Ein besonderes Ziel für den Schutz durch Kreatin scheint dabei die CK-mt zu sein, welche in der Lage ist, die Mitochondrienmembran zu stabilisieren und somit die Energieversorgung der Zelle aufrechtzuerhalten.

5.2.3. Kreatinsynthese in humaner Haut

Nachdem sich für die Supplementation mit Kreatin positive Effekte zeigen ließen, sollte untersucht werden, ob Kreatin möglicherweise auch in Hautzellen synthetisiert werden kann. Die Kreatinsynthese findet vor allem in der Leber und im Pankreas statt (Walker, 1979). Daneben gibt es aber auch Untersuchungen, die Hinweise für Kreatinsynthese in anderen Organen, wie z.B. dem Gehirn zeigen (Braissant *et al.*, 2001). Auch konnte die Synthese von Kreatin in verschiedenen Zelltypen, inklusive IMR-90 Fibroblasten, *in vitro* dargestellt werden (Daly, 1985).

In der vorliegenden Arbeit konnten die für die Kreatinsynthese verantwortlichen Enzyme GAMT und AGAT auf mRNA Ebene in Biopsiematerial humaner Haut nachgewiesen werden (s. 4.3.1. und 4.3.2.). Es zeigten sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten eine Expression der GAMT. Somit sind Hautzellen aufgrund ihrer Enzymausstattung prinzipiell in der Lage Kreatin selbst zu synthetisieren. Entscheidend für die Bildung von Kreatin ist hierbei der letzte Syntheseschritt, bei dem das Enzym GAMT eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Guanidinoacetat überträgt (s. Abb. 1.5.). Das Guanidinoacetat muss hierbei nicht notwendigerweise in der gleichen Zelle synthetisiert werden, sondern kann auch aus anderen Organen stammen (Walker, 1979). Ob Kreatin in der Haut aber wirklich synthetisiert wird, ist noch nicht geklärt. Im Gegensatz zum Gehirn, welches aufgrund der nur schlechten Diffusion von Kreatin über die Blut-Hirn-Schranke auf die Synthese von Kreatin zur Deckung des Eigenbedarfes angewiesen ist (Braissant *et al.*, 2001), zeigt die Haut eine starke Expression des Kreatintransporters (s. Abb. 4.1.1.). Jedoch besteht auch hier die Möglichkeit, dass die durch die Abnahme der Vaskularisierung der Haut im Alter (Chung *et al.*, 2002) mit Kreatin schlechter versorgte Haut, dieses über die Synthese von Kreatin ausgleichen kann.

Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden primäre, humane Keratinozyten junger und alter Spender mit Guanidinoacetat inkubiert und der Einfluß auf die Kreatinkinase-Aktivität beobachtet (s. Abb. 4.3.3.1. und 4.3.3.2.). Ähnlich wie bei der Inkubation mit Kreatin (s. Abb. 4.2.2.2.) zeigt sich auch hier ein stimulierender Effekt auf die Kreatinkinase-Aktivität. Allerdings lässt sich bei der Inkubation mit Guanidinoacetat im Gegensatz zur Inkubation mit Kreatin auch die Aktivität in jungen Keratinozyten steigern.

Um die Frage der Kreatinsynthese in humaner Haut allerdings abschließend klären zu können, wären sicher noch weitere Experimente, z.B. mit radioaktiv markiertem Guanidinoacetat, S-Adenosylmethionin oder Arginin, notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit war dies allerdings nicht möglich. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt lässt sich zusammenfassend nur feststellen, dass Zellen der Humanhaut, sowohl Fibroblasten als auch Keratinozyten, nicht nur über Kreatinkinasen und Kreatinkinasetransporter verfügen, sondern sich dort auch die Schlüsselenzyme der Kreatinsynthese nachweisen lassen.

5.3. Inaktivierung der Kreatinkinase-Expression

5.3.1. HaCat- und HeLaS3- Zellen als Modell für das Kreatinkinase-System in primären, humanen Keratinozyten

Um die Bedeutung des Kreatinkinase-Systems für die Zelle näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit siRNA-Experimente zur Inhibition der Expression von CK-BB und CK-mt durchgeführt (s. 4.4). Da sich die Transfektion von primären Zellen im allgemeinen als recht schwer darstellt und hierbei sich nur geringe Transfektionseffizienzen erzielen lassen, wurden für die Untersuchungen zum einen die humane Keratinozyten-Zelllinie HaCat und zum anderen die humane Gebärmutterhalskarzinoma-Zelllinie HeLaS3 eingesetzt. An letzteren wurden bereits erfolgreich siRNA-Experimente durchgeführt (Elbashir *et al.*, 2002). Somit dienten die HeLaS3-Zellen in gewisser Weise als Positivkontrolle. Bei der Auswahl der verwendeten siRNAs (s. Abb. 4.4.3.a und b) wurde sich demnach an der Publikation von Elbashir und Kollegen orientiert. Um sicher zu stellen, zumindest eine funktionsfähige siRNA zur Verfügung zu haben, wurden dazu jeweils zwei verschiedene siRNAs eingesetzt.

Vor der Transfektion mit den entsprechenden siRNAs musste allerdings noch die Frage geklärt werden, in wieweit sich die ausgewählten Zelllinien zur Beurteilung der Rolle des Kreatinkinase-Systems für die gesamte Zelle eignen. Hierzu wurde zum

einen die Expression der CK-BB und CK-mt in HaCat, HeLaS3 und primären, humanen Keratinozyten in einer Western-Blot-Analyse (s. Abb. 4.4.1.a) miteinander verglichen. Zum anderen wurde die Kreatinkinase-Aktivität in allen drei Zelltypen untersucht (s. Abb. 4.4.1.b). Bei der Kreatinkinase-Aktivität zeigte sich hierbei eine untereinander vergleichbare Aktivität. Das Expressionsmuster von primären Keratinozyten und der Keratinozyten-Zelllinie HaCat bezüglich CK-BB und CK-mt stimmt zudem soweit überein, dass in den beiden Zelltypen CK-mt stärker vertreten ist, wohingegen CK-BB scheinbar eine untergeordnetere Rolle spielt. Im Vergleich zu den primären Keratinozyten ist dagegen das Expressionsmuster für die HeLaS3 Zellen genau umgekehrt. D.h. hier scheint die CK-BB eindeutig mehr vertreten zu sein, als die CK-mt. Insgesamt lässt sich also sagen, dass sich die Keratinozyten-Zelllinie HaCat recht gut als Modell für das Kreatinkinase-System in primären, humanen Keratinozyten eignet und dass die HeLaS3-Zellen aufgrund ihrer starken CK-BB-Expression dagegen ein sehr gutes Modell für die Inhibition der CK-BB darstellen.

Da die Transfizierbarkeit von HeLaS3 bereits bekannt war (Elbashir *et al.*, 2002 und Experimente von Frau Oelschläger im Labor Molekularbiologie der Forschung Haut, Beiersdorf AG, Hamburg), blieb nur noch die Frage der Transfizierbarkeit und Transfektionseffizienz von HaCat-Zellen zu klären (s. Abb. 4.4.2.). Nach Optimierung der Transfektionsbedingungen zeigte sich auch für HaCat-Zellen eine relativ gute Transfizierbarkeit mit siRNA gegen Lamin A/C (Transfektionseffizienz von ca. 55%). Die siRNA gegen Lamin A/C wurde verwendet, da Lamin A/C leicht immunhistologisch nachgewiesen und somit die Transfektionseffizienz schnell überprüft werden kann (Elbashir *et al.*, 2002). Nach Abschluss dieser Voruntersuchungen konnten dann sowohl HaCat- als auch HeLaS3-Zellen für die siRNA-Experimente eingesetzt werden.

Da es Hinweise gibt, dass siRNAs sowohl unspezifische Ziele beeinflussen (Scacheri *et al.*, 2004), als auch das Interferon-System stimulieren (Sledz *et al.*, 2003) können, wurde bei allen Experimenten eine so genannte „Scramble“ siRNA eingesetzt und die gewonnenen Daten hierauf relativiert. Bei der Scramble-siRNA handelt es sich um eine siRNA, deren Sequenz keine Übereinstimmung mit dem humanen Genom aufweist und demnach auch keine spezifischen Effekte zeigen sollte.

5.3.2. Kreatinkinase-System – überlebenswichtig für die Zelle ?

Nach den siRNA Transfektionen wurde jeweils mittels Western-Blot-Analyse überprüft, ob das entsprechende Zielprotein (CK-BB bzw. CK-mt) auch ausgeschaltet wurde (s. 4.4.3.1. bis 4.4.3.4.). Die Ergebnisse sind jeweils nur für die am besten funktionierende siRNA gegen CK-BB und CK-mt dargestellt. Auch die Messung der Gesamt-Kreatinkinase-Aktivität (s. Abb. 4.4.3.7.) zeigte mit Ausnahme der Inaktivierung der CK-BB in HaCat-Zellen die erwartete Reduktion.

In Tabelle 5.3.2. sind zusammenfassend die Ergebnisse der Veränderung verschiedener zellphysiologischen Parameter nach siRNA Transfektion dargestellt. Im Überblick lässt sich erkennen, dass die Inaktivierung der CK-mt sowohl bei HaCat- als auch bei HeLaS3-Zellen die deutlicheren Effekte in Bezug auf Zytotoxizität, Proliferation und Mitochondrienmembranpotential hat. Bei der Kreatinkinase-Aktivität zeigt das Ausschalten der jeweils stärker exprimierten Isoform, CK-mt bei HaCat-Zellen und CK-BB bei HeLaS3-Zellen, die ausgeprägtere Reduktion. Bei Apoptose und Nekrose ist das Bild dann genau umgekehrt. Hier ist die Inhibition der weniger vertretenen Kreatinkinase, CK-BB bei HaCat-Zellen und CK-mt bei HeLaS3-Zellen für den stärkeren Anstieg verantwortlich.

	HaCat-Zellen		HeLaS3 Zellen	
	CK-BB	CK-mt	CK-BB	CK-mt
Zytotoxizität	o	+	+	++
Proliferation	-	--	-	--
Kreatinkinase-Aktivität	o	--	--	-
Mitochondrienmembranpotential	o	-	--	--
Apoptose	++	+	+	++
Nekrose	++	+	+	++

Tabelle 5.4.6.: Zusammenfassung der Veränderung der zellphysiologischen Parameter nach siRNA Transfektion

+ Anstieg, ++ starker Anstieg, o keine Veränderung, - Abnahme, -- starke Abnahme

Die beobachteten Effekte bei Inhibition der CK-mt lassen sich hierbei weitestgehend von der Mitochondrienmembran stabilisierenden Funktion der CK-mt und der damit verbundenen verbesserten Energiebereitstellung erklären (s. 5.2.). Die Hauptfunktion der CK-BB ist sicher ebenso in der Energiebereitstellung zu sehen, die besonders bei der Versorgung von für die Zellhomeoöstase lebensnotwendigen Systemen, wie z.B. Na,K-ATPase, von entscheidender Bedeutung zu sein scheint.

5.3.3. Zytotoxizität und Proliferation nach Transfektion mit siRNAs

Eine Reihe von literaturbekannten Untersuchungen beschäftigt sich mit den Auswirkungen verschiedener Knockouts (CK-BB, CK-MM, CK-MB und CK-mt) in Mäusen. Hierbei steht vor allem die Aufrechterhaltung der zellulären Energieversorgung durch ATP im Mittelpunkt. So konnte in Muskeln von CK-MM Knockout-Mäusen z.B. gezeigt werden, dass kein messbarer Austausch an Phosphat zwischen ATP und Phosphokreatin mehr stattfindet und damit verbunden auch die Muskelkraft abnimmt (van Deursen *et al.*, 1994). Auch die Rolle der CK-mt zur Aufrechterhaltung und Regulation des ATP-Spiegels im Gehirn (Kekelidze *et al.*, 2001) und Herz (Spindler *et al.*, 2002) entsprechender Knockout-Mäuse wurde näher untersucht. Zytotoxische Effekte konnten dabei bisher nicht beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit zeigen sich bei der Beurteilung der Zytotoxizität *in vitro* (s. Abb. 4.4.3.5.) mittels LDH-Messung vor allem bei der Inhibition der CK-mt deutliche Effekte, sowohl bei HaCat- als auch bei HeLaS3-Zellen. Zytotoxische Einflüsse durch das Ausschalten der CK-BB Expression sind dagegen in beiden Zelltypen nicht so stark ausgeprägt bzw. bei den HaCat-Zellen so gut wie überhaupt nicht zu beobachten. Vor allem der Verlust der CK-mt scheint also, entweder über Destabilisierung der Mitochondrienmembran oder auch über den Verlust der Energie-„Shuttle“-Funktion (s. 5.2.), einen negativen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen zu haben.

Zur Bestimmung der Proliferation wurde ein BrdU-ELISA eingesetzt. Hierbei kann lediglich eine Aussage über die Gesamtmenge an eingebautem BrdU, welche der neusynthetisierter DNA entspricht, getroffen werden und erlaubt so keine Aussage über den Prozentsatz an proliferierenden Zellen. Jedenfalls stellt sich in Bezug auf

die Zellproliferation (s. Abb. 4.4.3.6.) ein ähnliches Bild dar wie bei der Zytotoxizität. Auch hier zeigen sich die deutlichsten Effekte bei der Transfektion mit siRNA gegen CK-mt. Diese Ergebnisse legen also eine besondere Bedeutung der Kreatinkinase bei der Proliferation nahe, was auch zu der leicht verstärkt erscheinenden Expression, sowohl von CK-BB und CK-mt, in der Basalzellschicht der Epidermis (s. A und B in Abb. 4.1.1.a) passt. Zudem ist z.B. für die Regeneration von Skelettmuskulatur der Zusammenhang zwischen Proliferation und erhöhter Kreatinkinase-Expression bekannt (Duguez *et al.*, 2002).

Die deutlicheren Effekte, sowohl für die Zytotoxizität, als auch für die Proliferation, bei den HeLaS3-Zellen sind sicherlich zum Teil auf die bessere Transfektionseffizienz in diesen Zellen zurückzuführen. Dennoch bleibt bemerkenswert, dass die Inaktivierung der CK-mt, welche in HeLaS3 nur relativ schwach exprimiert wird (s. Abb. 4.4.1.a) die mit Abstand deutlichsten Effekte zeigt.

5.3.4. Apoptotische bzw. nekrotische Prozesse nach Transfektion mit siRNAs

Neben der Beurteilung der Apoptose- und Nekroserate mittels FACS-Analyse wurde auch der Einfluß der siRNA Transfektionen auf das Mitochondrienmembranpotential ($\Delta\Psi$) untersucht. Ein Absinken des Potentials durch Öffnung der Permeabilitäts-Transitions-Pore gilt als ein möglicher Auslöser der Apoptose und wird demnach als früher apoptotischer Marker angesehen (Crompton, 1999). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass die Apoptose ohne Einfluss des Membranpotential eingeleitet werden kann (Mayer und Oberbauer, 2003) bzw. das Absinken des Potentials eine Folge und nicht Auslöser der Apoptose ist (Ly *et al.*, 2003).

Das Membranpotential (s. Abb. 4.4.3.8.) zeigt bei den HaCat-Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen CK-mt ein leichtes Absinken und nach Transfektion mit siRNA gegen CK-BB keine Effekte. Dies entspricht insoweit den Erwartungen, da die CK-mt als stabilisierender Faktor der Mitochondrienmembran gilt (Wallimann *et al.*, 1998; Dolder *et al.*, 2002) und die Öffnung der Permeabilitäts-Transitions-Pore möglicherweise über CK-mt reguliert wird (O’Gorman *et al.*, 1997). Dagegen ist für die CK-BB kein direkter Bezug zur Mitochondrienmembran bekannt. Bei den HeLaS3-Zellen fällt das Absinken des Membranpotentials nach Transfektion mit

siRNA gegen CK-mt noch stärker aus. Zum einen mag wiederum die bessere Transfektionseffizienz ein Grund dafür sein. Zum anderen spielt es aber sicher auch eine Rolle, dass die CK-mt in diesen Zellen bereits nur schwach exprimiert wird. Überraschenderweise zeigt sich auch nach Transfektion mit siRNA gegen CK-BB ein starkes Abfallen des Potentials. Ein möglicher Erklärungsversuch könnte die besondere Rolle der CK-BB bei der örtlichen Energiebereitstellung für Ionenpumpen, wie die Na,K-ATPase (Guerrero *et al.*, 1997) sein. Da die HeLaS3-Zellen besonders stark die CK-BB exprimieren, kann man vermuten, dass diese Kreatinkinase besondere Funktionen zur Erhaltung der Zellphysiologie wahrnimmt. Ein drastischer Energiemangel und Verlust der Energie-„Shuttle“-Funktion (s. 5.2.) von Phosphokreatin durch das Wegfallen der CK-BB könnte unter anderem zu einem massiven Ungleichgewicht im Ionenhaushalt führen. Dieses hätte dann sicher auch Auswirkungen auf das Membranpotential. So gibt es Hinweise, dass die Bindung von CK-mt an Porin, welche zur Stabilisierung der Mitochondrienmembran beiträgt, von Ca^{2+} reguliert wird (Schlattner *et al.*, 2001). Um diese spekulativen Erklärungen allerdings erhärten zu können, müssten noch weitere Experimente folgen, welche insbesondere die genaue Rolle der CK-BB in HeLaS3-Zellen näher untersuchen.

Die Ergebnisse der FACS-Untersuchungen nach Transfektion mit den siRNAs zeigen wiederum ein klareres Bild (s. Abb. 4.4.3.9.b). In HaCat-Zellen zeigt das Ausschalten der CK-BB den stärkeren Anstieg der Apoptoserate im Vergleich zur Transfektion mit siRNA gegen CK-mt. Bei Transfektion der HeLaS3-Zellen zeigt sich die umgekehrte Verteilung. Bei Transfektion mit siRNA gegen CK-BB ist diese deutlich geringer als bei Inaktivierung von CK-mt. Bemerkenswerterweise zeigt sich hier jeweils bei der Kreatinkinase der stärkere Anstieg in der Apoptoserate, welche die im jeweiligen Zelltyp weniger exprimierte darstellt. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass unabhängig von der Bedeutung und dem nach Zelltyp unterschiedlichen Expressionsmuster der beiden Kreatinkinase wenigstens eine Mindestmenge der CK-BB und CK-mt für das Überleben der Zelle unabdingbar notwendig zu sein scheint.

Dieser Eindruck wird zudem von den ermittelten Nekroseraten (s. Abb. 4.4.3.9.c) unterstützt. Auch hier zeigt bei den HaCat-Zellen die Transfektion mit CK-BB den deutlicheren Effekt. Wohingegen bei HeLaS3-Zellen die CK-mt den essentiell wichtigeren Bestandteil darstellt.

Zusammenfassend zeigt sich gerade bei der Untersuchung des Mitochondrienmembranpotentials und der Apoptose- und Nekroserate die enorme Bedeutung der Kreatinkinase, sowohl CK-BB als auch CK-mt, für die Überlebensfähigkeit der Zelle.

5.3.5. Morphologische Beobachtungen nach Transfektion mit siRNAs

Die Auswirkungen der siRNA Transfektionen lassen sich zum Teil auch morphologisch erkennen.

Während sich im lichtmikroskopischen Bild bei der Transfektion von HaCat-Zellen, sowohl mit CKb a (s. Abb. 4.4.3.1.a) als auch CKmt 2 (s. Abb. 4.4.3.2.a) abgesehen von einer reduzierten Zellzahl keine besonderen Auffälligkeiten beobachten lassen, zeigen sich bei den Transfektionen an HeLaS3-Zellen deutliche Veränderungen. Bei der Transfektion mit siRNAs gegen CK-BB (s. Abb. 4.4.3.3.a) lassen sich vesikuläre Abschnürungen erkennen, welche ein deutliches Zeichen für apoptotische Prozesse darstellen und auch in den Untersuchungen zur Apoptose bestätigt werden konnten (s. 5.3.4.). Dagegen lassen sich nach Ausschalten der CK-mt nur noch wenige, kaum noch vital aussehende Zellen finden (s. Abb. 4.4.3.4.a).

Zumindest für die Transfektionen mit der siRNA gegen CK-mt lassen sich auch elektronenmikroskopisch Veränderungen erkennen, welche die bisher beschriebenen Ergebnisse bestätigen. Bei der Transfektion von HaCat- und HeLaS3-Zellen zeigen die mit siRNA gegen CK-mt transfizierten Zellen im Vergleich zu Scramble- und untransfizierten Zellen deutliche Veränderungen in der Cristae-Struktur der Mitochondrien (s. Abb. 4.4.3.10.). Ähnliche Effekte lassen sich an Mitochondrien aus der Muskulatur von Ratten beobachten, die über mehrere Wochen mit Guanidinopropionsäure, einem Fehlsubstrat der Kreatinkinase, gefüttert wurden (O’Gorman *et al.*, 1997). Auch CK-mt-Knockout-Mäuse zeigen Veränderungen in den Mitochondrien der Muskelzellen (Steeghs *et al.*, 1997). Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen nun auch für humane Keratinozyten die beschriebene Mitochondrienmembran stabilisierende Funktion der CK-mt (Brdiczka *et al.*, 1994, Wallimann *et al.*, 1998, Dolder *et al.*, 2001).

Bei HeLaS3-Zellen zeigt sich zudem nach Transfektion mit siRNA gegen CK-mt eine fast vollständige Abnahme der in untransfizierten und Scramble-transfizierten in großen Mengen vorkommenden Glykogenreserven. Dieses spricht wieder für die zentrale Rolle der Kreatinkinase für die Energiebereitstellung, da die Zellen nach Ausschalten der CK-mt offensichtlich alle Reserven mobilisieren müssen, um ein Überleben sicherstellen zu können.

Insgesamt zeigen die siRNA Untersuchungen die enorme Bedeutung der Kreatinkinase-Isoformen für die Zelle. Die drastischen Effekte nach Ausschalten der CK-BB bzw. CK-mt können somit auch als Modell für die im Verlauf des Alterungsprozess durch vermehrt gebildete ROS auftretende Inhibierung dieser Enzyme (s. 5.2.1.) angesehen werden. In diesem Zusammenhang erscheint die beschriebene protektive Wirkung von Kreatin auf das Kreatinkinase-System von besonderer Bedeutung für den Erhalt der Zellfunktionen im Alterungsprozess der humanen Haut (s. 5.2.2.).

6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte des Kreatinmetabolismus in humaner Haut untersucht. Diese Aspekte waren im Einzelnen:

1. Die zytosolische Kreatinkinase (CK-BB), die mitochondriale Kreatinkinase (CK-mt) sowie der Kreatintransporter (CT) konnten in humaner Haut immunhistologisch und mit Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Ferner konnten die Lokalisation der CK-BB und CK-mt und die Funktionalität dieser Enzyme auch *in vitro* in primären, humanen Keratinozyten gezeigt werden. Zudem wurde die aktive Aufnahme von Kreatin in primären, humanen Keratinozyten und primären, humanen, dermalen Fibroblasten über den CT untersucht.
2. Die Kreatinkinase-Aktivität wurde in primären, humanen Keratinozyten junger und alter Spender gemessen, wobei sich eine Reduktion der Aktivität im Verlauf des Alterungsprozesses zeigte. Dieser Reduktion konnte durch die Supplementation mit Kreatin ebenso entgegen gewirkt werden, wie der durch Wasserstoffperoxid verursachten Inhibition der Kreatinkinase-Aktivität. Somit konnte für Kreatin eine protektive Wirkung gegen oxidativen Stress, verursacht von vermehrt z.B. während des Alterungsprozesses auftretenden Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), gezeigt werden. Dieser Schutzeffekt kann durch die stabilisierende Wirkung von Kreatin auf CK-mt und damit auf die Mitochondrienmembran erklärt werden, da CK-mt die vorherrschende Isoform in Keratinozyten zu sein scheint.
3. Die Schlüsselenzyme der Kreatinsynthese, Guanidinoacetat-Methyl-Transferase (GAMT) und Arginin-Glycin-Amidino-Transferase (AGAT), konnten sowohl in humaner Haut als auch in primären, humanen Keratinozyten und primären, humanen, dermalen Fibroblasten auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich bei Keratinozyten *in vitro* eine Stimulierbarkeit

der Kreatinkinase-Aktivität nach Inkubation mit der Kreatinsynthesevorstufe Guanidinoacetat.

4. Die Inhibition der CK-BB und CK-mt in Zellen der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCat und der humanen Gebärmutterhalskarzinom-Zelllinie HeLaS3 zeigt zum Teil drastische Auswirkungen auf die Zelle. Besonders die Inaktivierung der CK-mt führt zu deutlich zytotoxischen Effekten, verminderter Proliferation und einem Absinken des Mitochondrienmembranpotentials. Die Auswirkungen des Verlustes der CK-mt sind dabei auch elektronenmikroskopisch anhand von Veränderungen der Mitochondrienmembranen zu sehen. In Bezug auf apoptotische und nekrotische Prozesse lässt sich jeweils bei Ausschalten der in dem Zelltyp geringer exprimierten Kreatinkinase der stärkere Anstieg beobachten.

Die gewonnenen Daten zeigen nicht nur die Bedeutung der Kreatinkinasen für die Zelle auf, sondern unterstützen auch die Befunde zur besonderen Rolle der CK-mt bei der Stabilisierung der Mitochondrienmembran.

7. Literatur

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York & London, 1994

Balsom PD, Soderlund K and Ekholm B: Creatine in humans with special reference to creatine supplementation. Sports Med:268-280,1994

Barrandon Y: The epidermal stem cell: an overview. Dev. Biol. 4:209-215,1993

Beal MF: Bioenergetic approaches for neuroprotection in Parkinson's disease. Ann Neurol 53:S39-47; discussion S47-8.,2003

Berger R, Middelanis J, Vaihinger HM, Mies G, Wilken B and Jensen A: Creatine protects the immature brain from hypoxic-ischemic injury. J Soc Gynecol Investig 11:9-15.,2004

Blatt T, Mundt C, Mummert C, Maksiuk T, Wolber R, Keyhani R, Hoppe U, Schachtschabel DO and Stäb F: Modulation of oxidative stresses in human skin ageing. Z Gerontol Geriatr 32:83-8,1999

Bogatskaia LN and Shegera VA: Creatine kinase activity and isoenzymic spectrum of myocardium creatine kinase in rats of different age. Ukr Biokhim 53:71-4,1981

Boveris A and Chance B: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem J 134:707-16.,1973

Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B and Bachmann C: Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study. Brain Res Mol Brain Res 86:193-201.,2001

Brdiczka D, Kaldis P and Wallimann T: In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin. J Biol Chem 269:27640-4.,1994

Briganti S and Picardo M: Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. J Eur Acad Dermatol Venereol 17:663-9.,2003

Carmeli E, Coleman R and Reznick AZ: The biochemistry of aging muscle. Exp Gerontol:477-489,2002

Chung JH, Yano K, Lee MK, Youn CS, Seo JY, Kim KH, Cho KH, Eun HC and Detmar M: Differential effects of photoaging vs intrinsic aging on the vascularization of human skin. Arch Dermatol 138:1437-42.,2002

Crompton M: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J 341:233-49.,1999

Daly MM and Seifter S: Uptake of creatine by cultured cells. Arch Biochem Biophys 203:317-24.,1980

Dolder M, Wendt S and Wallimann T: Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. Biol Signals Recept 10:93-111.,2001

Duguez S, Feasson L, Denis C and Freyssenet D: Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. Am J Physiol Endocrinol Metab 282:E802-9.,2002

Elbashir SM, Harborth J, Weber K and Tuschl T: Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. Methods 26:199-213.,2002

Eppenberger HM, Dawson DM and Kaplan NO: The comparative enzymology of creatine kinases. I. Isolation and characterization from chicken and rabbit tissues. J Biol Chem 242:204-9.,1967

Ermini M: Ageing changes in mammalian skeletal muscle: biochemical studies. Gerontology:301-316,1976

Finkel T: Redox-dependent signal transduction. FEBS Lett 476:52-4.,2000
Kamata H and Hirata H: Redox regulation of cellular signalling. Cell Signal 11:1-14.,1999

Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, Varani J, Kang S and Voorhees JJ: Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. N Engl J Med 337:1419-28.,1997

Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P and Foufelle F: AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. J Biol Chem 273:14767-71.,1998

Fuchs E and Segre JA: Stem cells: a new lease on life. Cell 100:143-55.,2000

Genet S, Kale RK and Baquer NZ: Effects of free radicals on cytosolic creatine kinase activities and protection by antioxidant enzymes and sulfhydryl compounds. Mol Cell Biochem 210:23-8.,2000

Gilchrest BA: A review of skin ageing and its medical therapy. Br J Dermatol 135:867-75.,1996

Greenhaff PL: Creatine and its application as an ergogenic aid. Int J Sport Nutr 5:S100-10.,1995

Guerrero ML, Beron J, Spindler B, Groscurth P, Wallimann T and Verrey F: Metabolic support of Na⁺ pump in apically permeabilized A6 kidney cell epithelia: role of creatine kinase. Am J Physiol 272:C697-706.,1997

Guerrero-Ontiveros ML and Wallimann T: Creatine supplementation in health and disease. Effects of chronic creatine ingestion in vivo: down-regulation of the expression of creatine transporter isoforms in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 184:427-37.,1998

Guimbal C and Kilimann MW: A Na(+)-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart, and kidney. cDNA cloning and functional expression. *J Biol Chem* 268:8418-21.,1993

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

Harris RC, Soderlund K and Hultman E: Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond)* 83:367-74.,1992

Ilas J, Muhl A and Stockler-Ipsiroglu S: Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency: non-invasive enzymatic diagnosis of a newly recognized inborn error of metabolism. *Clin Chim Acta* 290:179-88.,2000

Jacobson EL, Giacomoni PU, Roberts MJ, Wondrak GT and Jacobson MK: Optimizing the energy status of skin cells during solar radiation. *J Photochem Photobiol B* 63:141-7.,2001

Kaldis P, Hemmer W, Zanolla E, Holtzman D and Wallimann T: 'Hot spots' of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus. *Dev Neurosci* 18:542-54.,1996

Kaldis P, Stolz M, Wyss M, Zanolla E, Rothen-Rutishauser B, Vorherr T and Wallimann T: Identification of two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa. *J Cell Sci* 109:2079-88.,1996

Kamata H and Hirata H: Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11:1-14.,1999

Kay L, Nicolay K, Wieringa B, Saks V and Wallimann T: Direct evidence for the control of mitochondrial respiration by mitochondrial creatine kinase in oxidative muscle cells in situ. *J Biol Chem* 275:6937-44.,2000

Kekelidze T, Khait I, Togliatti A, Benzecry JM, Wieringa B and Holtzman D: Altered brain phosphocreatine and ATP regulation when mitochondrial creatine kinase is absent. *J Neurosci Res* 66:866-72.,2001

Kemp BE, Mitchelhill KI, Stapleton D, Michell BJ, Chen ZP and Witters LA: Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase. *Trends Biochem Sci* 24:22-5.,1999

Kim BY, Han MJ and Chung AS: Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Radic Biol Med* 30:686-98.,2001

Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R and Beal MF: Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Med* 5:347-50.,1999

Koolman J and Röhm KH: Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 1994

Krutmann J: New developments in photoprotection of human skin. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 14:401-7.,2001

Kühnel W: Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Thieme Verlag, Stuttgart, New York,1995

Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.,1970

Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W and Demaree S: Direct antioxidant properties of creatine. *Biochem Biophys Res Commun* 290:47-52.,2002

Leclerc I, Kahn A and Doiron B: The 5'-AMP-activated protein kinase inhibits the transcriptional stimulation by glucose in liver cells, acting through the glucose response complex. *FEBS Lett* 431:180-4.,1998

Lee HC: Role of Mitochondria in Human Aging. *J Biomed Sci* 4:319-326,1997

Loike JD, Somes M and Silverstein SC: Creatine uptake, metabolism, and efflux in human monocytes and macrophages. *Am J Physiol* 251:C128-35.,1986

Ly JD, Grubb DR and Lawen A: The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 8:115-28.,2003

Mayer B and Oberbauer R: Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci* 18:89-94.,2003

McCully KK, Forcica MA, Hack LM, Donlon E, Wheatley RW, Oatis CA, Goldberg T and Chance B: Muscle metabolism in older subjects using ^{32}P magnetic resonance spectroscopy. *Can J Physiol Pharmacol* 69:576-80,1991

Murphy R, McConell G, Cameron-Smith D, Watt K, Ackland L, Walzel B, Wallimann T and Snow R: Creatine transporter protein content, localization, and gene expression in rat skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C415-22.,2001

Nash SR, Giros B, Kingsmore SF, Kim KM, el-Mestikawy S, Dong Q, Fumagalli F, Seldin MF and Caron MG: Cloning, gene structure and genomic localization of an orphan transporter from mouse kidney with six alternatively-spliced isoforms. *Receptors Channels* 6:113-28.,1998

O'Gorman E, Piendl T, Muller M, Brdiczka D and Wallimann T: Mitochondrial intermembrane inclusion bodies: the common denominator between human

mitochondrial myopathies and creatine depletion, due to impairment of cellular energetics. *Mol Cell Biochem* 174:283-9.,1997

Oswald WD: Can age and aging be measured?. *Z Gerontol Geriatr* 33:8-14.,2000

Paavonen T, Aronen H, Saarelainen I, Neittaanmaki H, Hjelm I and Kiistala U: The BB-isoenzyme is a major component of creatine kinase in skin blister fluid. *Br J Dermatol* 118:753-7.,1988

Pastoris O, Boschi F, Verri M, Baiardi P, Felzani G, Vecchiet J, Dossena M and Catapano M: The effects of aging on enzyme activities and metabolite concentrations in skeletal muscle from sedentary male and female subjects. *Exp Gerontol* 35:95-104.,2000

Peral MJ, Garcia-Delgado M, Calonge ML, Duran JM, De La Horra MC, Wallimann T, Speer O and Ilundain A: Human, rat and chicken small intestinal Na⁺ - Cl⁻ -creatine transporter: functional, molecular characterization and localization. *J Physiol* 545:133-44.,2002

Pugliese PT: The skin's antioxidant systems. *Dermatol Nurs* 10:401-16; quiz 417-8.,1998

Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, Hughes CM, Shanmugam KS, Bhattacharjee A, Meyerson M and Collins FS: Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1892-7. Epub 2004 Feb 9.,2004

Scharffetter-Kochanek K, Wlaschek M, Brenneisen P, Schauen M, Blaudschun R and Wenk J: UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.:*1247-1257,1997

Schlattner U, Dolder M, Wallimann T and Tokarska-Schlattner M: Mitochondrial creatine kinase and mitochondrial outer membrane porin show a direct interaction that is modulated by calcium. *J Biol Chem* 276:48027-30. Epub 2001 Oct 15.,2001

Schlattner U, Mockli N, Speer O, Werner S and Wallimann T: Creatine kinase and creatine transporter in normal, wounded, and diseased skin. *J Invest Dermatol* 118:416-23.,2002

Schlegel J, Zurbriggen B, Wegmann G, Wyss M, Eppenberger HM and Wallimann T: Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships. *J Biol Chem* 263:16942-53.,1988

Schlegel J, Wyss M, Eppenberger HM and Wallimann T: Functional studies with the octameric and dimeric form of mitochondrial creatine kinase. Differential pH-dependent association of the two oligomeric forms with the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 265:9221-7.,1990

- Schulze A:** Creatine deficiency syndromes. *Mol Cell Biochem* 244:143-50.,2003
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH and Williams BR:** Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 5:834-9. Epub 2003 Aug 24.,2003
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ and Klenk DC:** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150:76-85.,1985
- Sohal RS:** Hydrogen peroxide production by mitochondria may be a biomarker of aging. *Mech Ageing Dev* 60:189-198,1991
- Speer O, Neukomm LJ, Murphy RM, Zanolla E, Schlattner U, Henry H, Snow RJ and Wallimann T:** Creatine transporters: a reappraisal. *Mol Cell Biochem* 256-257:407-24.,2004
- Spindler M, Niebler R, Remkes H, Horn M, Lanz T and Neubauer S:** Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H680-7.,2002
- Stachowiak O, Dolder M, Wallimann T and Richter C:** Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation. *J Biol Chem* 273:16694-9.,1998
- Steeghs K, Benders A, Oerlemans F, de Haan A, Heerschap A, Ruitenbeek W, Jost C, van Deursen J, Perryman B, Pette D, Bruckwilder M, Koudijs J, Jap P, Veerkamp J and Wieringa B:** Altered Ca²⁺ responses in muscles with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies. *Cell* 89:93-103.,1997
- Steinhagen-Thiessen E and Hilz H:** The age-dependent decrease in creatine kinase and aldolase activities in human striated muscle is not caused by an accumulation of faulty proteins. *Mech Ageing Dev* 5:447-57,1976
- Stenn KS, Link R, Moellmann G, Madri J and Kuklinska E:** Dispase, a neutral protease from *Bacillus polymyxa*, is a powerful fibronectinase and type IV collagenase. *J Invest Dermatol* 93:287-90.,1989
- Sullivan PG, Geiger JD, Mattson MP and Scheff SW:** Dietary supplement creatine protects against traumatic brain injury. *Ann Neurol* 48:723-9.,2000
- Thiele JJ, Podda M and Packer L:** Tropospheric ozone: an emerging environmental stress to skin. *Biol Chem* 378:1299-305.,1997
- van Deursen J, Ruitenbeek W, Heerschap A, Jap P, ter Laak H and Wieringa B:** Creatine kinase (CK) in skeletal muscle energy metabolism: a study of mouse mutants with graded reduction in muscle CK expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9091-5.,1994

Vandenbergh K, Goris M, Van Hecke P, Van Leemputte M, Vangerven L and Hespel P: Long-term creatine intake is beneficial to muscle performance during resistance training. *J Appl Physiol* 83:2055-63.,1997

Verzar F and Ermini M: Decrease of creatine-phosphate restitution of muscle in old age and the influence of glucose. *Gerontologia* 16:223-30,1970

Vessey DA, Lee KH and Blacker KL: Characterization of the oxidative stress initiated in cultured human keratinocytes by treatment with peroxides. *J Invest Dermatol* 99:859-63.,1992

Walker JB: Creatine: Biosynthesis, regulation, and function. *Adv Enzymol*:177-252,1979

Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K and Eppenberger HM: Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281:21-40.,1992

Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, Eder M, Hornemann T, O'Gorman E, Rück A and Brdiczka D: Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *BioFactors*:229-234,1998

Walzel B, Speer O, Zanolla E, Eriksson O, Bernardi P and Wallimann T: Novel mitochondrial creatine transport activity. Implications for intracellular creatine compartments and bioenergetics. *J Biol Chem* 277:37503-11. Epub 2002 Jul 26.,2002

Wyss M, Smeitink J, Wevers RA and Wallimann T: Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1102:119-66.,1992

Zemtsov A, Cameron GS, Bradley CA, Montalvo-Lugo V and Mattioli F: Identification and activity of cytosol creatine phosphokinase enzymes in normal and diseased skin. *Am J Med Sci* 308:365-9.,1994

Anhang:

- I. Abkürzungsverzeichnis**
- II. Messdaten**
- III. Publikationen**
- IV. Curriculum vitae**
- V. Akademische Lehrer**
- VI. Danksagung**

I. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
AGAT	Arginin-Glycin-Amidiono-Transferase
AMP	Adenosinmonophosphat
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5'-Bromo-2'-desoxy-Uridin
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CK	creatine kinase (Kreatinkinase)
CK_a	assoziierte CK
CK_c	cytosolic CK (zytosolische CK)
CK-BB	CK brain type (dimer)
CK-MM	CK muscle type (dimer)
CK-mt	mitochondriale CK
cm	Zentimeter
cm²	Quadratcentimeter
CO₂	Kohlendioxid
CT	creatine transporter (Kreatintransporter)
ΔΨ	Mitochondrienmembranpotential
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoximid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
Em	Emmission
et al.	et altera (und andere)
EU	Enzymunit (1EU CK setzt ein Nanomol Kreatin pro Minute bei 25°C um)
Ex	Extinktion
FACS	fluorescence activated cell sorting (fluoreszenzaktivierte Zellsortierung)
FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid-Dihydrogen

GAMT	Guanidinoacetat-Methyl-Transferase
GPA	guanidine propionic acid (Guanidinopropionsäure)
°C	Grad Celsius
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
g	Gramm
JC-1	5,5',6,6'- tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HaCat	humane Keratinozyten-Zelllinie
HeLaS3	humane Gebärmutterhalskarzinoma-Zelllinie
<i>in vitro</i>	in Zellkultur (Reagenzglas)
<i>in vivo</i>	am lebenden
kDa	kiloDalton
KBM	Keratinozytenbasismedium
KGM	keratinocyte growth medium (Keratinozytenwachstumsmedium)
m²	Quadratmeter
mA	Milliampere
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
mM	millimolar
n	Experiment bzw. Spenderzahl (Stichprobenumfang)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrogen
nm	Nanometer
p.A.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat buffert saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration (pro Hydrogeni)
PI	propidium iodide (Propidiumjodid)
POD	Peroxidase
%	Prozent

PVDF	P oly v inyl d ifluorid
p-Wert	Wahrscheinlichkeitswert
RNA	ribonucleic a cid (Ribonukleinsäure)
dsRNA	d ouble s tranded RNA (doppelstängige RNA)
mRNA	m essenger RNA (Boten-RNA)
siRNA	s ilencing RNA (inaktivierende RNA)
ROS	r eactive o xxygen s pecies (reaktive Sauerstoffspezies)
RT-PCR	r everse transcriptase- p olymerase c hain r eaction (Reverse Transkriptase-Polymerasenkettenreaktion)
s.	siehe
SDS	s odium d odecylsulfate (Natriumdedecylsulfat)
Std.-Abw.	S tandard- A bweichung
Tris/HCl	T rihydroxyaminomethane, pH-Wert mit Salzsäure eingestellt
u.a,	unter anderem
UpM	U mdrehungen p ro M inute
UV	U ltraviolette s Licht
vgl.	v ergleiche
v/v	V olumen p ro V olumen
w/o	ohne (w ithout) bivalente Kationen
w/v	w eight per v olume (Gewicht pro Volumen)
z.B.	zum B eispiel

II. Messdaten

1. Kreatinaufnahme in Keratinozyten (Abb. 4.1.3.1.)

a) ohne GPA

Zeit [min]	Counts A	Protein [μ g]	Counts A/ μ g Protein	Counts B	Protein [μ g]	Counts A/ μ g Protein	Mittelwert
0	0	2,40	0,00	17,1	2,638	6,48	3,24
20	13795,5	2,85	4845,63	20132,2	2,963	6794,53	5820,08
30	30004,6	2,85	10524,24	27599	2,315	11921,81	11223,03
60	48343	2,07	23376,69	54481,9	2,109	25833,05	24604,87

b) mit GPA

Zeit [min]	Counts A	Protein [μ g]	Counts A/ μ g Protein	Counts B	Protein [μ g]	Counts A/ μ g Protein	Mittelwert
0	0	2,40	0,00	17,1	2,638	6,48	3,24
20	13795,5	2,85	4845,63	20132,2	2,963	6794,53	5820,08
30	17157,2	2,26	7584,97	17559,5	2,801	6269,01	6926,99
60	20508,2	1,96	10458,03	21736,3	2,818	7713,38	9085,70

2. Kreatinaufnahme in Fibroblasten (Abb. 4.1.3.2.)

a) ohne GPA

Zeit [min]	Counts A	Protein [μ g]	Counts A/ μ g Protein	Counts B	Protein [μ g]	Counts A/ μ g Protein	Mittelwert
0	11,5	0,90	12,74	11,7	1,01	11,56	12,15
20	861,3	0,82	1054,22	1438,6	1,11	1298,38	1176,30
60	1822,3	0,91	2013,59	1808	0,88	2049,89	2031,74

b) mit GPA

Zeit [min]	Counts A	Protein [μ g]	Counts A/ μ g Protein	Counts B	Protein [μ g]	Counts A/ μ g Protein	Mittelwert
0	11,5	0,90	12,74	11,7	1,01	11,56	12,15
20	861,3	0,82	1054,22	1438,6	1,11	1298,38	1176,30
30	570,4	1,00	568,13	720,9	1,06	683,32	625,72
60	621,9	0,91	686,42	899	0,86	1041,71	864,07

3. Eichkurve Kreatinkinase-Test (Abb. 4.2.)

Anorgan. Phosphor / g	Abs. 700 nm
0	0
5	0,109
10	0,214
15	0,318
20	0,416
25	0,52

4. Kreatinkinase-Aktivität in Fibroblasten und Keratinozyten (Abb. 4.2.1.)

	Keratinozyten / EU	Fibroblasten / EU
	10,50	3,50
	5,74	5,75
	7,93	4,00
	10,29	5,00
	9,94	2,50
	10,00	
	6,04	
	7,70	
	10,70	
	13,00	
	12,00	
	1,25	
	7,64	
	2,76	
	15,50	
	11,38	
	4,05	
	2,89	
	3,59	
	7,70	
Mittelwert	8,03	4,15
Std.-Abw.	3,83	1,27

5. Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten alter und junger Spender (Abb. 4.2.2.1.) relativiert auf Proteingehalt

											Mittelwert	Std.-Abw.
jung / EU	10,11	8,69	5,62	7,27	5,79	8,83	8,10	9,46	4,72	6,68	7,53	
alt / EU	6,51	9,79	4,80	4,44	8,03	5,31	8,25	7,96	3,45	3,71	6,22	
%	134%	115%	75%	97%	77%	117%	108%	126%	63%	89%	100%	23%
%	64%	113%	85%	61%	139%	60%	102%	84%	73%	55%	84%	26%

6. Kreatinkinase-Aktivität in Keratinozyten alter und junger Spender nach Kreatininkubation (Abb. 4.2.2.2.) relativiert auf Proteingehalt

a) alte Spender

														Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle / EU	6,51	9,79	4,80	6,64	4,44	8,03	5,31	5,70	8,25	7,96	9,01	7,72	6,18	6,95	1,89
150 µm Kreatin / EU	7,71	11,79	6,55	7,19	4,88	8,60	8,03	6,46	11,00	11,51	10,43	8,37	8,28	7,60	2,29
%	94%	141%	69%	96%	64%	116%	76%	82%	119%	115%	130%	111%	89%	100%	23%
%	118%	120%	137%	108%	110%	107%	151%	113%	133%	145%	116%	108%	134%	123%	14%

b) junge Spender

									Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle / EU	10,11	8,69	5,62	7,27	5,79	8,83	8,10	9,46	7,99	1,53
150 µm Kreatin / EU	9,68	5,87	5,27	7,83	6,54	8,53	9,06	11,43	8,03	1,94
%	127%	109%	70%	91%	73%	111%	101%	119%	100%	15%
%	96%	68%	94%	108%	113%	97%	112%	121%	98%	15%

7. Kreatinkinase-Aktivität in subzellulären Fraktionen (Abb. 4.2.2.3.2.) relativiert auf Proteingehalt

					Mittelwert	Std.-Abw.
unbehandelt F1	3,23	0,00	1,04	0,20	1,12	1,48
unbehandelt F2	7,21	4,94	6,69	3,94	5,70	1,52
150 µm Kreatin F1	3,73	0,23	0,69	0,00	1,16	1,74
150 µm Kreatin F2	5,26	4,88	10,32	7,55	7,00	2,51

8. Kreatinkinase-Aktivität unter Wasserstoffperoxid-Stress (Abb. 4.2.2.4.) relativiert auf Proteingehalt

a) unbehandelt

				Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	9,79	8,69	7,04	8,51	1,38
1µM Peroxid	6,40	4,07	4,77	5,08	1,19
55µM Peroxid	3,77	5,25	3,90	4,31	0,82
%	115%	102%	83%	100%	16%
%	65%	47%	68%	60%	11%
%	38%	60%	55%	51%	12%

b) 150µM Kreatin

				Mittelwert	Std.-Abw.
Kontrolle	11,79	5,87	7,10	8,25	3,12
1µM Peroxid	6,96	4,84	4,84	5,55	1,22
55µM Peroxid	6,18	4,70	5,60	5,50	0,75
%	143%	71%	86%	100%	38%
%	59%	83%	68%	70%	12%
%	52%	80%	79%	70%	16%

9. Kreatinkinase-Aktivität nach Guanidinoacetatinkubation (Abb. 4.3.3.1. und 4.3.3.2.) relativiert auf Proteingehalt

a) alte Spender

				Mittelwert	Std-Abw.
Kontrolle	5,89	4,72	4,45	5,02	
150 µM Guanidinoacetat	5,64	7,30	5,21	6,05	
%	117%	94%	89%	100%	15%
%	96%	155%	117%	122%	21%

b) junge Spender

				Mittelwert	Std-Abw.
unbehandelt	8,66	3,45	9,02	7,04	
150 µM Guanidinoacetat	8,84	4,49	10,87	8,07	
%	123%		128%	100%	5%
%	102%	130%	121%	118%	10%

10. Kreatinkinase-Aktivität in HaCat- und HeLaS3-Zellen (Abb. 4.4.1.2.)

HaCat / EU	4,58
HeLaS3 / EU	4,36

11. Zytotoxizität (LDH) nach siRNA Transfektion (Abb. 4.4.3.5.)

a) HaCat-Zellen

						Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	0,38	0,60	0,65	0,57	0,63	0,57	0,11
CKb A	0,40	0,62	0,69	0,62	0,73	0,61	0,13
CKmt 2	0,52	0,74	0,83	0,72	0,81	0,72	0,12
%	67%	106%	115%	100%	112%	100%	19%
%	105%	104%	106%	109%	115%	108%	5%
%	138%	124%	127%	127%	128%	129%	5%

b) HeLaS3-Zellen

						Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	0,34	0,35	0,33	0,35	0,38	0,35	0,02
CKb A	0,43	0,67	0,62	0,43	0,74	0,58	0,14
CKmt 2	0,55	0,86	0,87	0,65	0,88	0,76	0,15
%	96%	99%	95%	100%	109%	100%	6%
%	129%	192%	187%	123%	193%	165%	35%
%	165%	247%	260%	186%	230%	217%	41%

12. Proliferation (BrdU) nach siRNA Transfektion (Abb. 4.4.3.6.)

a) HaCat-Zellen

				Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	0,920	1,141	0,977	1,013	0,114
CKb A	0,856	0,916	1,611	1,127	0,420
CKmt 2	0,516	0,650	1,155	0,774	0,337
%	91%	113%	98%	100%	11%
%	93%	80%	71%	81%	11%
%	56%	57%	54%	56%	1%

b) HeLaS3-Zellen

				Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	0,220	0,794	0,992	0,668	0,401
CKb A	0,237	0,551	0,322	0,370	0,163
CKmt 2	0,096	0,251	0,133	0,160	0,081
%	33%	119%	148%	100%	60%
%	108%	69%	71%	83%	22%
%	44%	32%	54%	43%	11%

13. Kreatinkinase-Aktivität nach siRNA Transfektion (Abb. 4.4.3.7.) relativiert auf Proteingehalt

a) HaCat-Zellen

					Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	2,21	2,88	2,99	2,56	2,66	0,42
CKb A	2,01	3,86	3,77		3,21	1,04
CKmt 2	0,63		1,87	0,60	1,03	0,88
%	83%	108%	112%	96%	100%	16%
%	91%	134%	126%		117%	23%
%	28%		63%	23%	38%	24%

b) HeLaS3-Zellen

					Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	2,79	5,54	2,79		3,71	1,59
CKb A	0,14	2,85	0,14		1,04	1,56
CKmt 2	2,05	0,32	2,05		1,48	1,00
%	75%	150%	75%		100%	43%
%	5%	51%	5%		21%	27%
%	74%	6%	74%		51%	39%

14. Mitochondrienmembranpotential nach siRNA Transfektion (Abb. 4.4.3.8.)

a) HaCat-Zellen

				Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	2,173	1,083	1,481	1,579	0,552
CKb A	2,311	1,232	1,334	1,626	0,595
CKmt 2	2,383	0,822	1,317	1,507	0,797
%	138%	69%	94%	100%	12%
%	106%	114%	90%	103%	12%
%	110%	76%	89%	91%	15%

b) HeLaS3-Zellen

				Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	3,695	1,265	1,331	2,097	1,385
CKb A	1,763	1,083	1,024	1,290	0,411
CKmt 2	1,522	1,077	1,096	1,232	0,252
%	176%	60%	63%	100%	28%
%	48%	86%	77%	70%	20%
%	41%	85%	82%	70%	27%

15. Apoptoseratenach siRNA Transfektion (Abb. 4.4.3.8.)

a) HaCat-Zellen

			Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	107%	93%	100%	9%
CKb A	174%	208%	208%	24%
CKmt 2	118%	139%	139%	14%

b) HeLaS3-Zellen

			Mittelwert	Std.-Abw.	
Scramble	130%	88%	82%	100%	26%
CKb A	184%	155%	197%	155%	22%
CKmt 2	118%	199%	262%	186%	40%

16. Apoptoseratenach siRNA Transfektion (Abb. 4.4.3.8.)

a) HaCat-Zellen

				Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	217%	53%	30%	100%	102%
CKb A	483%	109%	191%	388%	196%
CKmt 2	299%	113%	592%	295%	241%

b) HeLaS3-Zellen

				Mittelwert	Std.-Abw.
Scramble	99%	138%	63%	100%	27%
CKb A	435%	245%	593%	381%	174%
CKmt 2	779%	600%	811%	704%	114%

III. Publikationen

Cosmetic or dermatological preparations containing a combination of Creatinine and/or Creatinine derivatives and Creatine and/or the derivatives thereof; Biergiesser H., Blatt, T., Kruse I., Lenz H., Mundt C., Schmidt M., Schoenrock U., Schreiner V., Staeb F.; Patent veröffentlicht am 13.02.2003

Kosmetische und/oder dermatologische Zubereitungen mit einem Gehalt an Aryl-Ureido-Verbindungen; Schönrock U., Schreiner V., Wolber R., Blatt T., Mummert C., Mundt C., Lenz H., Schaumann E.; Patent veröffentlicht 12.06.2003

The Creatine Kinase System in Human Skin: Protective Effects of Creatine against Oxidative and UV Damage *in vitro* and *in vivo*; Lenz H., Schmidt M., Welge V., Schlattner U., Wallimann T, Elsässer H.-P., Wittern K.-P., Wenck H., Stäb F. and Blatt T.; zur Veröffentlichung im *Journal of Investigative Dermatology* akzeptiert am 29.7.2004

IV. Curriculum vitae

Name: Holger Janus Lenz

Geburtstag und –ort: 9.5.1973 in Wasserlos i.UFr.

Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang:

09/1979 – 07/1983 Dalberg-Volksschule Aschaffenburg

09/1983 – 07/1992 Friedrich-Dessauer-Gymnasium
Aschaffenburg, Abschluss Abitur

Studium:

10/1992 – 03/1995 Studium der Chemie an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

09/1995 – 08/2000 Studium der Humanbiologie an der
Philipps-Universität Marburg

09/1999 – 08/2000 Diplomarbeit am Institut für Klinische Zytobiologie und
Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg,
Arbeitsgruppe Prof. Elsässer:
„Isolierung und Charakterisierung des menschlichen
Homologs der murinen Immediate-early response
Ier5 cDNA“

01/2001 – 04/2004 Promotion am Institut für Klinische Zytobiologie und
Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg,
(Arbeitsgruppe Prof. Elsässer) in Kooperation mit der
Beiersdorf AG, Hamburg, Abteilung Forschung Haut
(Labor Altershaut, Dr. Blatt):
„Kreatinstoffwechsel in humaner Haut“

V. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer des Fachbereichs Medizin im Studiengang Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren Professoren:

Aumüller, Beato, Daut, Dressler, Eilers, Elsässer, Frenking, Fuhs, Garten, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Kern, Kirchner, Koolman, Kunz, Lill, Löffler, Meinhard, Müller, Röhm, Schachtschabel, Schäfer, Seifart, Seitz, Seitz

und im Studiengang Chemie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg die Damen und Herren Professoren:

Christl, Grotemeyer, Haase, Häfele, Herre, Kiefer, Kühnen, Münster, Schneider, Sietmann, Werner, Wieber, Wringmann

VI. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich alle denjenigen Danke sagen, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben. Außerdem heiße alle die willkommen, die sich die letzten 150 Seiten gespart und gleich hier - beim *wichtigsten* Teil - mit der Lektüre angefangen haben.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. H.-P. Elsässer nicht nur für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und die anregenden Diskussionen danken, sondern auch für die langjährige Begleitung meiner wissenschaftlichen „Laufbahn“ während Studium, Praktika und Diplomarbeit und ganz besonders auch für die „aussercurricularen“ Aktivitäten und Diskussionen. Vielen Dank für alles, Pi !

Dank gilt auch den Herren Prof. Dr. K.-P. Wittern, Dr. H. Wenck und Dr. F. Stäb der Beiersdorf AG für die Unterstützung und die Möglichkeit, diese Dissertation in Kooperation mit dem Institut für Klinische Zytobiologie und Zytopathologie der Philipps-Universität Marburg, Arbeitsgruppe Elsässer, anzufertigen.

Ganz besonders möchte mich bei Herrn Dr. Thomas Blatt bedanken. Er war - auch im größten Stress - immer ansprechbar und diskussionsbereit und hat es zudem immer wieder geschafft meine Motivation aufrecht zu erhalten. Danke, Chef !

Ein herzliches Dankeschön allen Beiersdorfern, von der Abteilung Forschung Haut über die Analytik, bis hin zum Werkschutz, für die Hilfsbereitschaft, gute Arbeitsatmosphäre, gemeinsame Mittagessen, Gespräche (fachlich oder nicht) bei Kaffee und Tee (oder auch ohne). Besonders danken möchte ich hier (in alphabetischer Reihenfolge):

- Angela, Conny, Dunja, Heiko, Hiltrud, Jan, Kirsten, Peter, Reza, Tobias stellvertretend für alle ungenannten und „vergessenen“
- Gesa, Kyra und Ute insbesondere für die Unterstützung bei allem Rund ums Thema „siRNA“

- Dem „Labortrio“ Karen, Melli, Steffi (auch wenn letztere mittlerweile in die Entwicklung ausgewandert ist). Dank Euch werde ich die Zeit bei Beiersdorf immer in guter Erinnerung behalten !
- Vivienne danke ich neben der Unterstützung im Labor auch für zahlreiche Kinobesuche, gemeinsames Lauftraining und für die Tatsache, dass sie mich nach dem Triathlon, zu dem ich sie überredet hatte, am Leben gelassen hat (by the way: nächstes Jahr gibt es keine Ausreden).
- Nils danke ich außer für die eine oder andere anregende Diskussion für zahllose Schachpartien. Auch wenn wir nun auf E-Mail-Schach ausweichen müssen, hoffe ich dass wir noch viele interessante Spiele erleben (es wird sicher schwer meinem Vorsprung von 37 zu 28 zu halten, aber ich werde es auf alle Fälle versuchen).

Für kulturelle Highlights bedanke ich mich bei BLJ-Entertainmet, auch wenn es nach und nach seine Hamburger Aktivitäten einstellte (Hello Werner in Washington D.C. und Grüetzi Guido in Basel).

Dank sagen möchte ich auch Anneli, Jenny, Nadime und Uschi aus der Arbeitsgruppe Elsässer in Marburg. Außerdem Waltraud für rasche Lösungen von histologischen Problemen und der gesamten Elektronenmikroskopie für ihre Unterstützung.

Vielen Dank auch Prof. Dr. T. Wallimann und Dr. U. Schlattner von der ETH Zürich für konstruktive Kritik und Diskussion meiner Arbeit.

Last but not least möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir dieses alles erst ermöglicht haben.