

Aus der Klinik  
für Strahlentherapie und Radioonkologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes,  
Homburg/Saar

# **Alterungsabhängige Akkumulation von DNA-Schäden in Haarfollikel Stammzellen**

**DISSERTATION**

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
**DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

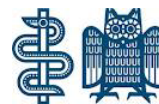
**2013**

vorgelegt von

**Dipl. Biol. Nadine Schuler**

geboren am 08. Oktober 1983 in Merzig/Saar

---



Berichterstatter:

**Prof. Dr. rer. nat. Mathias Montenarh**  
**Prof. Dr. med. Claudia E. Rube**

Vorsitzender:

Tag der mündlichen Prüfung:

---



## INHALT

Abkürzungsverzeichnis .....	
Zusammenfassungen .....	A
I.1    Zusammenfassung .....	A
I.2    Summary .....	B
1    Einleitung.....	1
1.1    Stammzellen.....	1
1.2    Das Aufrechterhalten der genetischen Integrität .....	2
1.3    Der Alterungsprozess .....	11
1.4    Die Haut .....	14
2    Ziele der Arbeit .....	17
3    Material und Methodik.....	18
3.1    Material.....	18
3.1.1    Mäuse .....	25
3.2    Methodik.....	25
3.2.1    Bestrahlung.....	25
3.2.2    Gewebeentnahme.....	26
3.2.3    Seneszenz-assoziierte- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung .....	27
3.2.4    Einbettverfahren für Seneszenz-assoziierte- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung, Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	28
3.2.5    Immunfluoreszenz.....	29
3.2.6    Immunhistochemie .....	30
3.2.7 <i>In vivo</i> Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung Immunfluoreszenz Doppelfärbung ....	31
3.2.8    Auswertung am Hellfeld- bzw. Fluoreszenzmikroskop.....	32
3.2.9    Transmissions-Elektronen-Mikroskopie .....	33
3.2.10    Durchflusszytometrische Untersuchung .....	36
3.2.11    Expressionsanalyse .....	40
3.2.12    Statistische Auswertung .....	43
4    Ergebnisse.....	44

---



4.1	Nachweis von DNA-Schäden in epidermalen Stammzellen .....	44
4.2	Altersabhängige Akkumulation von 53BP1-Foci in epidermalen Stammzellen .....	47
4.2.1	Abnahme der Reparaturkapazität mit dem Alter .....	49
4.2.2	Akkumulation von 53BP1-Foci nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung .....	52
4.3	Charakterisierung der 53BP1-Foci .....	55
4.3.1	Altersabhängige 53BP1-Foci sind nicht dem Telomer zuzuordnen .....	55
4.3.2	Heterochromatische 53BP1-Ansammlungen weisen keine Kollokalisierung mit pKu70 auf .....	57
4.4	Folgen der Stammzellalterung .....	63
4.4.1	Keine Induktion von Apoptose in alternden Stammzellen .....	63
4.4.2	Alterung erzeugt Öffnung des Chromatins .....	69
4.4.3	Alterung erzeugt keine verstärkte Transkription von Genen der DNA-Reparatur .....	70
4.4.4	Nf- $\kappa$ B Expression mit zunehmenden DNA-Schäden .....	76
4.4.5	Alterung erzeugt keine Veränderung in der Zahl der Stammzellen .....	78
5	Diskussion .....	81
5.1	53BP1-Zunahme in alternden und bestrahlten Stammzellen .....	82
5.2	53BP1-Ansammlungen sind Chromatinveränderungen .....	85
5.3	Exogene und endogene Reize erzeugen unterschiedliche biologische Folgen für die Stammzellen .....	89
6	Ausblick .....	95
7	Literaturverzeichnis .....	i
8	Abbildungsverzeichnis .....	x
9	Tabellenverzeichnis .....	xi
10	Danksagung .....	xii

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Erläuterung	explanation
<b>[<sup>3</sup>H]-Thymidin</b>	Tritium-Thymidin	
<b>53BP1</b>	p53 Bindeprotein 1	p53 binding protein 1
<b>ac</b>	Acetylierung	
<b>ATM</b>		ataxia-telangiectasia mutated
<b>Bcl-2</b>		B-cell lymphoma 2
<b>BER</b>	Basen-Exzisionsreparatur	
<b>bp</b>	Basenpaare	
<b>BrdU</b>	Bromdesoxyuridin	
<b>ca.</b>	circa	
<b>cDNA</b>	kodierende DNA	coding DNA
<b>CHCD3</b>	Chromodomäne-Helikase-DNA- bindendes Protein 3	
<b>ChIP</b>	Chromatin-Immunopräzipitation	
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin	
<b>DAPI</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole	
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	deionisiertes Wasser	
<b>DMF</b>	N,N-Dimethylformamid	
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	deoxyribonucleic acid
<b>DNA-PKcs</b>		DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
<b>DSB</b>	Doppelstrangbruch	
<b>FISH</b>	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	
<b>FSC</b>	Vorwärts Streulicht	forward scatter
<b>g</b>	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung	
<b>g</b>	Gramm	
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid	
<b>H3K27me3</b>	dreifach methyliertes Lysin 27 am Histon H3	
<b>H3K79me</b>	methyliertes Lysin 79 am Histon H3	
<b>H3K9ac</b>	acetyliertes Lysin 9 am Histon H3	
<b>H3K9me2/3</b>	Zwei oder dreifach methyliertes Lysin 9 am Histon H3	
<b>H4K16ac</b>	acetyliertes Lysin 16 am Histon H4	
<b>H4K20me3</b>	dreifach methyliertes Lysin 20 am Histon H4	
<b>HCl</b>	Salzsäure	

<b>HFSCs</b>	Stammzellen des Haarfollikels	hair follicle stem cells
<b>HG</b>	Keimregion	hair germ
<b>HP</b>	Hybridisierungspuffer	
<b>HR</b>	Homologe Rekombination	
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase	horseradish peroxidase
<b>IHC</b>	Immunhistochemie	
<b>IRS</b>	innere Wurzelscheide	inner root sheet
<b>Kap1</b>	Krüppel-assoziiertes Protein	
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Kaliumhydrogenphosphat	
<b>LRCs</b>		lable-retaining-cells
<b>Mb</b>	Megabasen	
<b>MDC1</b>		mediator of DNA damage checkpoint 1
<b>µm</b>	Mikrometer	
<b>me</b>	Methylierung	
<b>mGy</b>	Milligray	
<b>min</b>	Minuten	
<b>ml</b>	Milliliter	
<b>mM</b>	Millimolar	
<b>MMR</b>	Basenfehlpaarungsreparatur	mismatch repair
<b>mRNA</b>	kodierende RNA	messenger RNA
<b>MRN-Komplex</b>	Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex	
<b>mSv</b>	Millisievert	
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Di-Natriumhydrogenphosphat	
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid	
<b>NaN<sub>3</sub></b>	Natriumnitrit	
<b>NaPO<sub>4</sub></b>	Natriumphosphat	
<b>NER</b>	Nukleotid-Exzisionsreparatur	
<b>NF-κB</b>		nuclear factor 'kappa-light- chain-enhancer' of activated B-cells
<b>NHEJ</b>	Nicht-homologe End-zu-End- Verknüpfung	non-homologous end joining
<b>nm</b>	Nanometer	
<b>NS</b>	Normalserum	
<b>ORS</b>	äußere Wurzelscheide	outer root sheet
<b>p16<sup>ink4a</sup></b>	Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase 2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung	phosphate buffert saline
<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion	polymerase chain reaction

<b>pH</b>	negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität	
<b>pKu70</b>	phosphoryliertes Ku70	
<b>PNA</b>		peptide nucleic acid
<b>PRM1</b>		PR domain zinc finger protein 1
<b>RNF</b>		ring finger protein
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies	reactive oxygen species
<b>RT</b>	Raumtemperatur	
<b>qPCR</b>	Echtzeit PCR	real time PCR
<b>SA-β-Gal</b>	Seneszenz-assoziierte-β-Galaktosidase	
<b>sec</b>	Sekunden	seconds
<b>SCID</b>	Schwerer kombinierter Immundefekt	severe combined immune deficiency
<b>SSC</b>	Seitwärts Streulicht	sideward scatter
<b>TEM</b>	Transmissions-Elektronen-Mikroskop	
<b>TERT</b>	Telomerase reverse Transkriptase	
<b>TIP60</b>		TAT interacting protein 60
<b>TRF1/2</b>		telomere response factor 1/2
<b>ü. N.</b>	über Nacht	
<b>WT</b>	Wildtyp	
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid	
<b>γH2AX</b>	phosphoryliertes Histon H2AX	





## ZUSAMMENFASSUNGEN

### I.1 ZUSAMMENFASSUNG

Adulte Stammzellen sind aufgrund Ihrer langen Funktions- und Lebensdauer das bevorzugte Ziel der altersabhängigen Akkumulation von DNA (Desoxyribonukleinsäure) -Schäden. Nach neuesten Forschungsergebnissen kann die Akkumulation von DNA-Schäden zum Verlust von Stammzellen oder deren Funktion führen, was als eine der grundlegenden Ursachen für Alterung verstanden wird. Trotz des bekannten Zusammenhangs zwischen Stammzellverlust und Alterung, ist der Stammzell-spezifische Ablauf der Reparatur von DNA-Schäden im Kontext der Stammzellnische kaum bekannt. Aus diesem Grund wurde in der Haut der adulten Maus der DNA-Reparaturmechanismus in den Stammzellen des Haarfollikels untersucht. Des Weiteren erforschten wir die biologischen Folgen, die sich für die Stammzellen infolge der Akkumulation von DNA-Schäden mit steigendem Alter und durch fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung ergeben. Durch die Analyse von reparaturprofizienten und reparaturdefizienten Mäusen im Alter von 2 Wochen bis 24 Monaten, sowie nach steigenden Fraktionen von 10 mGy (10, 20, 30, 40 und 50 Fraktionen), konnten wir eine Zunahme von DNA-Schäden, unter Verwendung des Markers 53BP1 (p53 binding protein 1), in Stammzellen und differenzierten Keratinozyten *in vivo* detektieren. Dabei wurde festgestellt, dass mit steigendem Alter die Zahl der 53BP1-Foci nur in den Stammzellen des Haarfollikels stetig ansteigt, während nach exogener Stimulation die Zunahme in beiden Zelltypen festgestellt werden konnte. Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurden 53BP1, sowie weitere Reparaturproteine, unter Verwendung der Durchflusszytometrie in Stammzellen und differenzierten Zellen analysiert. Durch diese Untersuchungen wurde klar, dass nicht nur 53BP1, sondern auch seine phosphorylierte Variante und pKu70 (phosphoryliertes Ku70) altersbedingt in den Stammzellen zunehmen. Zur näheren Charakterisierung der akkumulierenden 53BP1-Foci wurden zwei Methoden etabliert. Zum einen wurde eine Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung mit einer Immunfluoreszenz Färbung kombiniert, um die altersabhängige Kolokalisation der 53BP1-Foci mit der Telomerasequenz zu quantifizieren. Zum anderen untersuchten wir Immunogold-markierte Reparaturproteine im Transmissions-Elektronen-Mikroskop, um 53BP1 abhängig vom Kondensationsgrad des Chromatins und zwar auf der Ebene einzelner Moleküle charakterisieren zu können. Angesichts dieser Ergebnisse wurde klar, dass nur ein geringer Prozentsatz der altersabhängigen 53BP1-Foci dem Telomer zugeordnet ist. Zudem zeigte sich bei den Analysen am Transmissions-Elektronen-Mikroskop altersbedingt eine starke Anhäufung von kleinen 53BP1 Clustern auf kleinem Raum – meist unabhängig von pKu70 – im kompakten Heterochromatin. Somit könnten diese heterochromatischen Ansammlungen permanente Veränderungen der Chromatinstruktur darstellen, die durch die fehlende Reparatur oder die fehlerhafte Reparatur von DNA-Schäden entstanden sind. Im Gegensatz zur Alterung,



verteilen sich die 53BP1 Moleküle nach Bestrahlung meist in einzelnen großen Clustern, auch im kompakten Heterochromatin und ohne pKu70. Diese unterschiedliche Verteilung im Chromatinkontext scheint unterschiedliche Folgen für die Stammzellen zu induzieren. Bestrahlung erzeugt, im Gegensatz zur Alterung, Caspase-3 vermittelte Apoptose, sowie vermehrte Seneszenz in den Stammzellen, die einhergehen mit einer starken Heterochromatisierung. Folge der durch Bestrahlung induzierten Apoptose ist eine geringe Abnahme der suprabasalen Stammzellen, die durch eine Zunahme der basalen Stammzellen kompensiert werden können. Die Resistenz der alternden Stammzellen gegen ihren apoptotischen Abbau kann möglicherweise durch ihre geringe Teilungsrate bedingt sein. Wohingegen die geschädigten proliferierenden Zellen möglicherweise durch die gesteigerte Aktivierung des NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) Signalweges, der auch durch persistierende DNA-Schäden aktiviert wird, vor dem Abbau geschützt werden.

Untersuchungen von adulten Stammzellen in ihrer physiologischen Stammzellnische haben gezeigt, dass endogen und exogen induzierte DNA-Schäden über die Zeit zunehmen, was zu unterschiedlichen Veränderungen der Chromatinstruktur führt. Komplexere Schäden – die wahrscheinlich durch Bestrahlung verursacht werden – stimulieren zelluläre Signalwege, die durch Apoptose oder Seneszenz, eine Abnahme beziehungsweise Stilllegung der Stammzellen induzieren, was möglicherweise zur frühzeitigen Alterung führen kann.

## 1.2 SUMMARY

### Age-dependent accumulation of DNA damage in hair follicle stem cells

Adult tissue-specific stem cells are at high risk of accumulating deleterious DNA (deoxyribonucleic acid) lesions because they reside and self-renew in adult tissues for extended periods. Recent findings suggest that the accumulation of DNA damage leading to stem cell exhaustion could be a principal mechanism of ageing, but little is known about how tissue-specific stem cells sense and respond to DNA damage within their natural niche. Here, using mouse epidermis as a model, we characterize the molecular mechanisms by which hair follicle stem cells respond to DNA double-strand breaks, and define the functional consequences of DNA damage accumulation during physiological and accelerated ageing triggered by repetitive exposures to low doses of ionizing radiation. Analyzing repair-proficient and repair-deficient mice, ranging in age from 2 weeks to 24 months, or exposed to 2, 4, 6, 8 or 10 weeks of daily low-dose radiation of 10 mGy, respectively, we monitored the accumulation of DNA damage in skin biopsies. Using immunofluorescence microscopy the number of DSBs was quantified in hair follicle stem cells compared to differentiated keratinocytes by enumerating 53BP1-foci (p53 binding protein 1) per cell. In contrast to short-



lived keratinocytes the number of 53BP1-foci in hair follicle stem cells increased significantly with age, whereas with cumulative radiation dose an increasing number of 53BP1 is present in both cell types. To substantiate these results, 53BP1 and other repair proteins were analyzed in hair follicle stem cells and differentiated cells using flow cytometry. These analyses show an age-dependent increase of 53BP1, phospho-53BP1 and phospho-Ku70 (pKu70) in stem cells. To define the nature of persisting 53BP1-foci in the analyzed stem cells we first combined a fluorescence *in situ* hybridization with a 53BP1 immunofluorescence staining to quantify the age-dependent colocalization of persisting 53BP1-foci to telomeric repeats. Secondly, we performed transmission electron microscopy combined with immunogold-labeling to clarify the nature of the persisting foci at the single molecule level. These results demonstrate that only a limited number of persisting 53BP1-foci is assigned to the telomere sequence. The distribution of the marker 53BP1 in the ultrastructure of the chromatin was defined by multiple small 53BP1 clusters, predominantly independent of pKu70, scattered in compact heterochromatin of 24 months old stem cells. Consequently, these heterochromatic clusters probably reflect permanent chromatin rearrangements caused by the unrepaired or misrepaired DNA damages. In skin samples exposed to repetitive low-dose radiation, by contrast, most of the 53BP1 clusters appear as single huge conglomerations localized similarly in tightly packed heterochromatin, independent of pKu70. The different distribution induced by endogenous and exogenous stimuli lead to distinct cell reactions. Cumulative radiation dose, in contrast to ageing, induces caspase-3 depending stem cell apoptosis and enhanced stem cell senescence, associated with advanced chromatin compaction. Consequence of stem cell apoptosis by fractionated low dose radiation is a reduction of the suprabasal stem cells, possibly compensated by an increase in the number of basal stem cells. The resistance of aged hair follicle stem cells to apoptosis perhaps depends on their relative quiescence. Whereby, the protection of impaired proliferating cells is possibly supported by the NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) signaling pathway, which is also stimulated by persisting DNA damages.

Analyzing tissue-specific stem cells within their physiological niche, our results suggest that endogenously and exogenously induced DNA damage accumulates over time, but leading to different pattern of chromatin alterations. More complex DNA damage induced by ionizing radiation triggers cellular signaling pathways, such as apoptosis or senescence, that result in a faster depletion of stem cells, which in turn may contribute to accelerated ageing.





## 1 EINLEITUNG

### 1.1 STAMMZELLEN

Stammzellen sind nicht spezialisierte (undifferenzierte) Zellen, die aufgrund ihrer Ursprünglichkeit die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedene Zelltypen eines oder mehrerer Gewebe zu differenzieren. Die Stammzellen verharren die meiste Zeit ihres Lebens in Ruhe und teilen sich nur in seltenen Fällen und streng reguliert, um sich selbst und die nachfolgenden Zelltypen zu erhalten oder zu ersetzen (z.B. Haarfollikel Stammzellen; (Morris, R. J., *et al.*, 2004)). Dieser Prozess kann auf zwei unterschiedliche Arten ablaufen. Zum einen können sie sich, wie alle Zellen auch, symmetrisch in zwei gleiche Tochterzellen teilen. Diese Art der Vermehrung wird zum Aufrechterhalten des Stammzellpools durchgeführt. Des Weiteren sind sie in der Lage, sich asymmetrisch zu teilen, wodurch eine Tochterzelle entsteht, die die Stammzeleigenschaften weiter trägt, und eine weitere, die sich in eine organspezifische Funktionszelle ausdifferenziert. Ursprüngliche Untersuchungen in *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege) und *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) haben die asymmetrische Teilung als die häufigste Form aufgezeigt, wohingegen nur in seltenen Fällen auch symmetrische Teilungen zur Selbsterhaltung der Stammzellen durchgeführt werden (Lin, H. und Spradling, A. C., 1997; Sulston, J. E., *et al.*, 1983). Die Art der Stammzellen lässt sich anhand des Grades ihrer Ursprünglichkeit, dem Differenzierungspotential, unterscheiden. Totipotente Zellen haben eine uneingeschränkte Entwicklungsfähigkeit. Diese Zellen findet man nur in der Zygote, denn diese können einen kompletten Organismus bilden. Die nachfolgenden embryonalen Stammzellen, die im Inneren der Blastozyste entstehen, sind zwar in der Lage, sich in alle Zellen des Embryos, d. h. Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm, Endoderm), zu entwickeln, aber sie können keine Plazenta mehr bilden. Diese Zellen werden deshalb auch als pluripotente Stammzellen bezeichnet. Demgegenüber liegen adulte Stammzellen in einem ansonsten differenzierten Gewebe vor. Dabei werden Zellen, welche sich zwar nicht in alle Zelltypen des adulten Organismus, jedoch in viele verschiedene Zelltypen differenzieren können, als multipotent bezeichnet (z.B. Haarfollikel Stammzellen), während oligopotente Stammzellen sich nur noch in zwei oder drei Zelltypen und unipotente nur noch in einen bestimmten Zelltyp differenzieren können (Barrandon, Y. und Green, H., 1987; Morris, R. J., *et al.*, 2004; Myung, P. und Ito, M., 2012). Diese Stammzellen ermöglichen Geweben mit hohem Zellumsatz (z.B. Haut) oder nach Verletzung einen ständigen Zellnachschub bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Stammzellansammlung (Bickenbach, J. R., 1981). Zur Bewältigung dieser Aufgaben ist es wichtig, die Balance zwischen Ruhezustand, Differenzierung und Selbsterneuerung der Stammzellen zu kontrollieren. Denn eine unkontrollierte Teilungsfähigkeit kann zur Ausbildung von Tumoren führen und der Verlust der Teilungsfähigkeit kann demgegenüber zum Verlust der Regenerationskraft der Gewebe und somit zum Organversagen führen. Aus

# Einleitung

diesem Grund haben Stammzellen intrinsische, genetische Programme entwickelt, die im Wechselspiel mit der Stammzellumgebung, die Stammzellcharakteristiken aufrechterhalten und regulieren (Morrison, S. J., *et al.*, 1997). Alle Stammzellen benötigen unabhängig von ihrem Differenzierungsgrad und ihrer Lage eine definierte Umgebung. Dieses Verhalten wurde schon vor über 30 Jahren von Schofield in der Stammzellnischen Theorie postuliert [(Schofield, R., 1978) zitiert nach (Jones, D. L. und Wagers, A. J., 2008)]. Demnach besteht die Nische meist aus einer Basalmembran und spezialisierten Zelltypen, die die Stammzellen umgeben. Aber nicht nur Signalmoleküle von den umliegenden Zellen, Tochterzellen oder auch der humoralen Versorgung, sondern auch die extrazelluläre Matrix, sowie Zell-Zell-Kontakte tragen zur Steuerung des Verhaltens der Stammzellen bei. Somit unterstützt und reguliert die Nische die darin liegenden Stammzellen.

## 1.2 DAS AUFRECHTERHALTEN DER GENETISCHEN INTEGRITÄT

Die genetische Information jeder Zelle ist in der Basenfolge (Sequenz) der DNA gespeichert. Diese genetische Information sowie weitere Bestandteile jeder Körperzelle sind zu jeder Zeit unterschiedlichsten Reizen ausgesetzt (s. Abbildung 1-1).

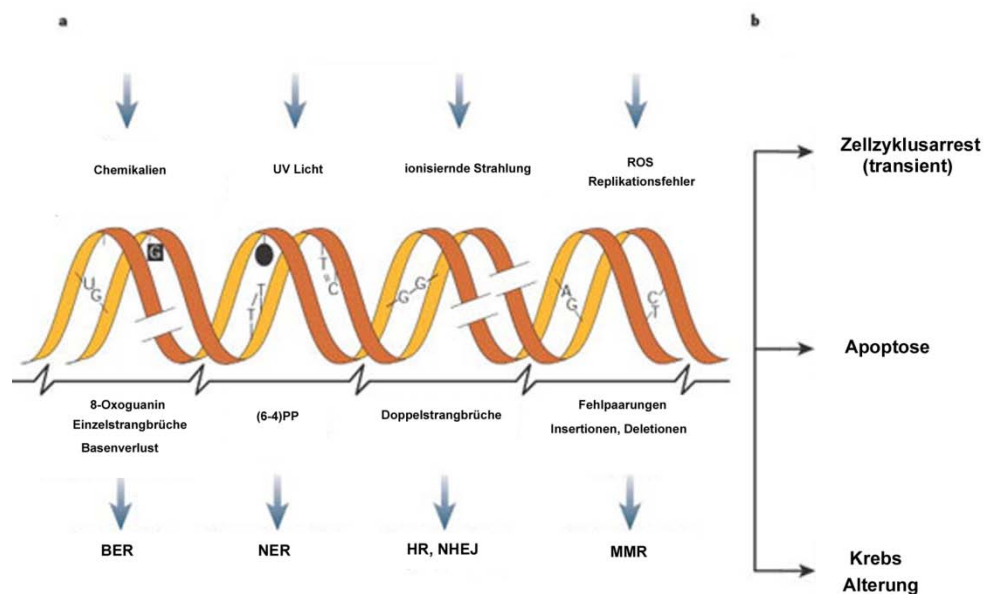


Abbildung 1-1: Reize, DNA-Schäden und die Folgen:

Unterschiedliche Reize erzeugen verschiedene Schäden. Diese Schäden können je nach Art des Schadens durch den entsprechenden Reparaturweg behoben werden, oder es kommt zu Zellzyklus Arrest, Alterung, Krebsentstehung oder Apoptose (ursprüngliches Bild übernommen von (Hoeijmakers, J. H., 2001)). ROS: Reaktive Sauerstoffspezies; (6-4)PP: 6-4 Photoprodukt; BER: Basen-Exzisionsreparatur; NER: Nukleotid-Exzisionsreparatur; HR: Homologe Rekombination; NHEJ: Nicht-Homologe-End-zu-End-Verknüpfung; MMR: Basen-fehlpaarungsreparatur



Dabei entstehen 1.000 bis 1.000.000 molekulare Schäden pro Tag in jeder Zelle (Lodish, H., *et al.*, 2004), die somit die genomische Integrität bedrohen. Dabei unterscheidet man endogene, das heißt von der Zelle infolge des zellulären Metabolismus selbst erzeugte Noxen, und exogene Reize, die aus der Umgebung auf den Organismus einwirken. Endogen erzeugte Schäden, unabhängig von Umwelteinflüssen, entstehen allein durch Nebenprodukte des zellulären Metabolismus oder direkt durch fehlerhafte Replikation der DNA während der Zellteilung (s. Abbildung 1-1) und erzeugen somit Schäden an der DNA. Wie 70-80% jeder Zelle, ist auch die DNA innerhalb des Zellkerns von einem wässrigen Milieu umgeben (Fellin, W., 2006). Dieser Kontakt zwischen Wasser und der DNA erzeugt einen ständigen Basenverlust infolge der Hydrolyse glykosidischer Bindungen innerhalb der DNA, wobei der Hauptanteil von endogen erzeugten DNA-Schäden durch die Wechselwirkung der DNA mit reaktiven Sauerstoffspezies (englisch: reactive oxygen species; ROS) entsteht. Dabei unterscheidet man Superoxid Anion Radikale, Hydrogenperoxide und Hydroxylradikale (Rink, H., 1971), die während normaler, zellulärer Prozesse, wie der zellulären Atmung in den Mitochondrien, Entzündung oder der Phagozytose gebildet werden [(Harman, D., 1972) zitiert nach (Harman, D., 2003); (Babior, B. M., *et al.*, 1973)]. Des Weiteren können auch Fehler während der Replikation der DNA entstehen. Denn auch die DNA Polymerase, die die komplementären Basen zusammenfügt, ist nicht fehlerfrei, was zum Einbau falscher Basen und infolgedessen bei keiner oder fehlerhafter Reparatur zu Mutationen in der DNA führt (Jackson, A. L. und Loeb, L. A., 2001; Schaaper, R. M., 1993). Kann daraus geschlussfolgert werden, dass die Aktivität des zellulären Metabolismus einen Einfluss auf die Ausbildung von endogen induzierten DNA-Schäden besitzt? Diese Frage muss noch untersucht werden. Zusätzlich zu den endogenen Reizen ist jeder Organismus auch äußeren, exogenen Reizen ausgesetzt. Zu diesen äußeren Reizen zählen UV-Strahlung, Chemikalien und ionisierende Strahlen (Abbildung 1-1). Ionisierende Strahlung wirkt infolge von natürlichen Quellen, wie der kosmischen und terrestrischen Strahlung, sowie inkorporierten Strahlenquellen durch Nahrung und Atemluft auf den Menschen. Demgegenüber steht die zivilisatorische Strahlenbelastung, die zusätzlich zur natürlichen Strahlung noch auf den Menschen einwirkt. Zu diesen durch den Menschen selbst erzeugten Strahlenquellen zählt neben der Strahlenexposition durch Kernkraftwerke insbesondere die Anwendung radioaktiver Stoffe und ionisierender Strahlung in der Medizin (z.B. Röntgen oder Radiotherapie) (Bundesamt für Strahlenschutz). Die ionisierende Strahlung lässt sich wiederum in Teilchen- und elektromagnetische Strahlung untergliedern. Elektromagnetische Strahlung (wie  $\gamma$ - oder Röntgenstrahlung) ist eine Photonenstrahlung die infolge von Wechselwirkungen mit der Elektronenhülle eines Trägermaterials (z.B. in der Röntgenröhre) generiert wird. Aufgrund der Abwesenheit von Masse und Ladung, im Gegensatz zur Teilchenstrahlung, kann diese Strahlung leicht

# Einleitung

Materie – wie z.B. Gewebe – durchdringen und Energie deponieren, die biologische Schäden auslöst. Dabei unterscheidet man zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung (Nikjoo, H., *et al.*, 1997). Bei der direkten Strahlenwirkung reagiert das Photon der elektromagnetischen Strahlung direkt mit Bestandteilen der DNA was z.B. zum Aufbrechen von kovalenten Bindungen, also der Induktion von Strangbrüchen, führen kann. Diese direkte Strahlenwirkung ist jedoch ein seltener Fall. Die Hauptmenge an Schäden entsteht indirekt durch chemische Sekundärprozesse von ionisierten Molekülen in der Umgebung der DNA (Swarts, S. G., *et al.*, 1992). Dabei handelt es sich meist um Wassermoleküle, die dann in Folge von Radiolyse ROS bilden, die wiederum die DNA schädigen (Rink, H., 1971). Durch exogene und endogene Reize entstehen eine Vielzahl an unterschiedlichen DNA-Schäden, wie z.B. DNA-DNA- und DNA-Protein-Vernetzungen, Basenveränderungen, Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche. Unter dem Einfluss von ionisierender Strahlung, die aufgrund ihrer hohen Energie sehr viele Schäden auf kleinem Raum erzeugt, entstehen jedoch vornehmlich Einzelstrangbrüche, Basenveränderungen, Doppelstrangbrüche (DSBs) und Anhäufungen von DNA-Schäden auf kleinem Raum (englisch: bulky lesions) (Ward, J. F., *et al.*, 1985).

Tabelle 1: DNA-Schäden nach 1 Gy ionisierender Strahlung:

(Tabelle übernommen von (Goodhead, D. T., 1994; Ward, J. F., 1988)).

<b>Einzelstrangbrüche</b>	1 000
<b>8-Hydroxyadenine</b>	700
<b>Thymin Schäden</b>	250
<b>DSBs</b>	40
<b>DNA-Protein-Vernetzungen</b>	150

Anhand der Zahl der unterschiedlichen Schäden infolge von 1 Gy ionisierender Strahlung (s. Tabelle 1) wird deutlich, dass am wenigsten DSBs entstehen, was aber keine Aussage über die Schwere der biologischen Konsequenzen zulässt. Denn DSBs sind die schwerwiegendsten DNA-Schäden, da hierbei die genetische Information beider DNA Stränge beeinträchtigt wird und zudem freie DNA-Enden – die Chromosomenaberrationen zur Folge haben können – entstehen. Darum ist schon ein einziger nicht reparierter Bruch ausreichend, falls er überlebenswichtige Gene betrifft, um den Zelltod oder kanzerogene Transformation auszulösen (Freifelder, D., 1965; Kaplan, H. S., 1966). Die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität – insbesondere in langlebigen Stammzellen – ist unerlässlich um das Überleben eines Organismus und der nachfolgenden Generationen sicherzustellen. Zum Erreichen dieses Ziels besitzt der eukaryotische Organismus ein komplexes System aus verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen mit schätzungsweise 200 Proteinen in Kombination mit der Zellzykluskontrolle (Seyffert, W., *et al.*, 2003). Da die genetische



Information in eukaryotischen Zellen, wie denen des Menschen, ca. 2 m lang ist und somit nicht in einen Zellkern mit 10 µm Durchmesser passen kann, ist eine Kompaktierung der DNA nötig.

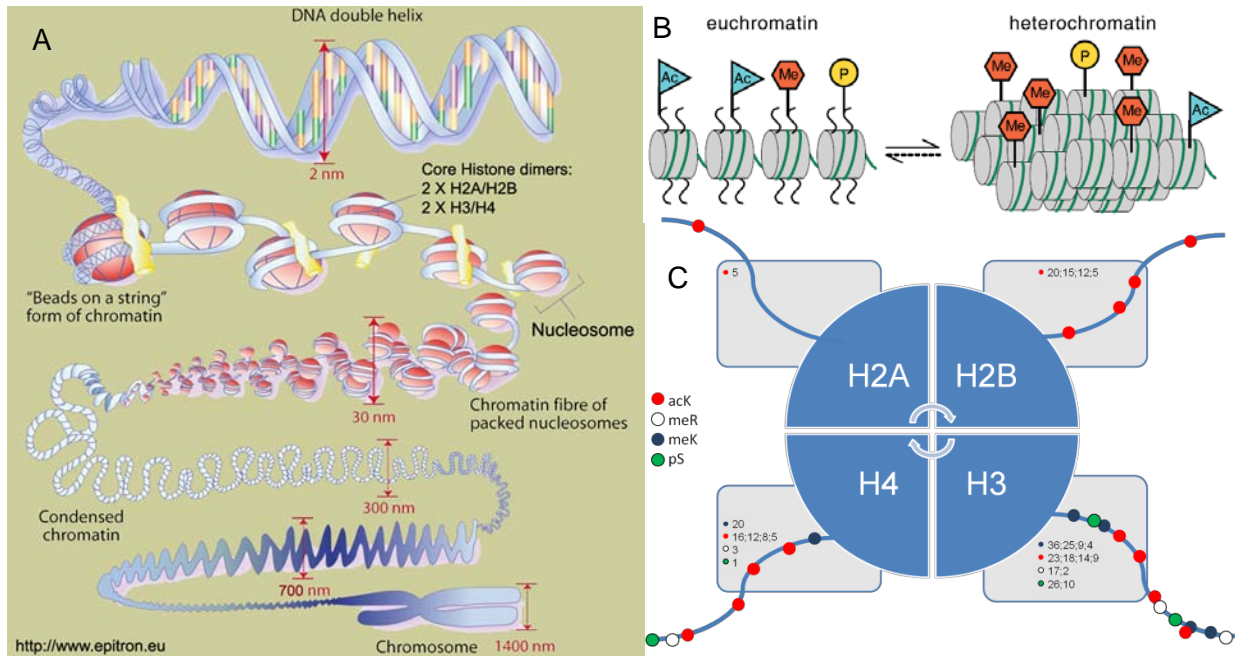


Abbildung 1-2: Chromatinaufbau:

A: Dabei wird der DNA Doppelstrang über Histone, dann durch Wechselwirkungen zwischen Histon H1 Molekülen zur 30 nm Struktur aufgewickelt und anschließend weiter komprimiert, bis das Metaphase Chromosom entsteht (Bild übernommen von (Gronemeyer, H.)). B: Die Kombination aus unterschiedlichen Histonmodifikationen hat Einfluss auf den Chromatinzustand (Eu- bzw Heterochromatin), Theorie des Histoncodes (Bild übernommen von (Jenuwein, T. und Allis, C. D., 2001)). C: Die unterschiedlichen Histone H2A, H2B, H3 und H4 eines Nucleosoms mit einigen posttranslationalen Modifikationen an verschiedenen Aminosäuren an den N-terminalen Armen. Dabei sind die modifizierten Aminosäuren mit Nummerierung in den Feldern der einzelnen Histone angegeben. Die Art der Aminosäure (acK: acetyliertes Lysin; meR: methyliertes Arginin; meK: methyliertes Lysin; pS: phosphoryliertes Serin) ist dabei als unterschiedlich farbiger Kreis dargestellt.

Die DNA wird, wie in Abbildung 1-2A zu sehen, im ersten Schritt 1.7-mal um ein Histon-Oktamer (aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4) gewunden und bildet somit ein Nucleosom. Dabei bestehen alle Histone aus einer globulären Kern-Komponente, sowie N- und C-terminalen Armen (s. Abbildung 1-2C). Zwischen den Nucleosomen liegt die DNA nackt als Doppelstrang vor und wird als Linker-DNA bezeichnet. Im nächsten Schritt kommt es zur Interaktion der einzelnen Nucleosomen infolge des Histons H1, das den Aus- und Eintrittsbereich der DNA auf dem Nucleosom fixiert. In weiteren Schritten entsteht durch das Aufdrehen der 30 nm Faser in Form ähnlich eines Telefonkabels eine 300 nm Struktur. Diese Strukturen werden dann über bestimmte Proteine an der Kernmembran aufgehängt und definieren durch ihre genaue Anordnung bestimmte Chromosomenterritorien. Somit ist ein reibungsloser Ablauf von Kernprozessen möglich (s. Abbildung 1-2A) (Seyffert, W., *et al.*, 2003). Die Aminosäuren der Histonarme sind Ziele von posttranslationalen Modifikationen,

# Einleitung

die die Chromatinstruktur und somit Prozesse, wie die Transkription, beeinflussen (Hebbes, T. R., *et al.*, 1988). Stark kondensierte Regionen (Heterochromatin) verhindern somit den Zugang von nötigen Proteinen, im Gegensatz zu offenen Regionen (Euchromatin) [(Comings, D. E., 1972) zitiert nach (Mello, M. L., 1983)]. Dadurch laufen innerhalb euchromatischer Regionen alle Prozesse ab, die für das zelluläre Überleben wichtig sind, während im Heterochromatin nicht benötigte DNA Regionen, wie Transposons oder regulierte Gene stillgelegt werden. Diese unterschiedlichen Chromatinzustände werden durch bestimmte Markierungen, die unabhängig von der DNA Sequenz, also epigenetisch sind, beeinflusst. Diese epigenetischen Informationen, die durch Histonmodifikationen kodiert werden, spielen hierbei eine besondere Rolle, denn diese können durch bestimmte Proteine oder den Austausch von Histonen schnell geändert werden, wodurch sich auch die Chromatinstruktur ändert (Rea, S., *et al.*, 2000). Dabei ist neben Acetylierung (ac) und Methylierung (me) auch die Phosphorylierung (p) besonders wichtig (s. Abbildung 1-2C), denn diese Modifikation der Histonvariante H2AX nimmt eine zentrale Rolle in der DNA-Reparatur ein (Rogakou, E. P., *et al.*, 1998). Dieser Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Chromatinzuständen und den vorhandenen Histonmodifikationen ist in der Theorie des „Histoncodes“ postuliert (Strahl, B. D. und Allis, C. D., 2000). Dabei gibt es einige Modifikationen, die für ein kondensiertes Chromatin (z.B. dreifach methyliertes Histon H3 am Lysin 9 (H3K9me3), (Bannister, A. J., *et al.*, 2001)) und andere, die für ein offenes Chromatin (z.B. acetylierte Histone H3 am Lysin 9 (H3K9ac) (Hebbes, T. R., *et al.*, 1988)) sprechen (s. Abbildung 1-2B). Jedoch ist bis heute nicht genau geklärt ob und wie sich die Chromatinstruktur in alternden Stammzellen verändert, und welchen Zusammenhang es diesbezüglich mit der DNA-Reparatur gibt. Die Verpackung der DNA in Form von Chromatin stellt somit eine Barriere für die Zugänglichkeit von Proteinen und Enzymen, die die DNA erreichen wollen, dar. Infolge von induzierten DNA-Schäden muss das umliegende Chromatin also zuerst geöffnet werden, damit verschiedene Reparaturfaktoren – abhängig vom nachfolgenden Reparaturmechanismus – den Schaden erreichen können. Dieser Prozess ist bei DNA-Schäden im Heterochromatin von viel größerer Bedeutung, als im Euchromatin. Zudem muss nach der Erkennung des Schadens der Zellzyklus an bestimmten Regulationspunkten (englisch: checkpoints) angehalten werden, um eine Reparatur zu ermöglichen. Dadurch wird die Bildung von dauerhaften Veränderungen in der DNA Sequenz oder im Chromatin, also Mutationen oder Epimutationen, und deren Weitergabe an Tochterzellen verhindert. Kommt es jedoch zu Mutationen in zentralen Proteinen des Zellzyklus, wie CDKN2a (p16), kann dies die Krebsentstehung fördern (Yarbrough, W. G., *et al.*, 1999). Folglich ist die Reparatur von Schäden ein Zusammenspiel unterschiedlicher Reparaturwege in Kombination mit dem Zellzyklus. Wie in Abbildung 1-1 zu erkennen ist, erzeugen die unterschiedlichen Reize auch unterschiedliche Schäden in der DNA, von

denen die meisten von spezialisierten Mechanismen erkannt und repariert werden. Einer der vielfältigsten Wege ist die Exzisionsreparatur. Dabei werden Schäden, die die Struktur der DNA verändern, z.B. Protein-DNA Interaktionen, meist durch die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) repariert. Im Gegensatz dazu werden modifizierte Basen über die Basen-Exzisionsreparatur (BER) eliminiert. Daneben werden Fehlpaarungen zwischen einzelnen Basen über die Basen-fehlpaarungsreparatur (englisch: mismatch repair; MMR) unter Kontrolle gebracht, wohingegen erzeugte DNA DSBs vornehmlich über die DSB-Reparatur erkannt und in der Folge auch repariert werden (Seyffert, W., *et al.*, 2003). Der Prozess der DNA DSB-Reparatur kann in drei Phasen eingeteilt werden. Nach der Detektion des Bruches wird das Chromatin um den Schaden herum geöffnet, dieser repariert, und der ursprüngliche Zustand des Chromatins an dieser Stelle wiederhergestellt. Der DNA DSB wird als erstes vom MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)-Komplex erkannt, wodurch inaktive ATM (englisch: ataxia-telangiectasia mutated) Dimere phosphoryliert und aktiviert werden. Diese phosphorylieren die Histonvariante H2AX am Serin 139 ( $\gamma$ H2AX). Das erzeugte  $\gamma$ H2AX ist nicht nur auf den Bruch beschränkt, sondern breitet sich in der DNA des Menschen bis zu 1 Mb stromauf- und abwärts des Schadens aus (Rogakou, E. P., *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von H2AX dient als Signal und Plattform zum Rekrutieren von verschiedenen Vermittler- und Chromatinmodulierungsproteinen, die eine Lockerung der Chromatinstruktur um den DSB erzeugen (Murr, R., *et al.*, 2006). Dabei bindet MDC1 (englisch: mediator of DNA damage checkpoint 1) direkt an  $\gamma$ H2AX und bietet zudem eine Bindestelle für ein weiteres Protein, nämlich 53BP1. Dieses dient daraufhin als Haltepunkt von aktivem ATM am DSB und fördert somit die Öffnung des Chromatins (s. Abbildung 1-3) (Goodarzi, A. A. und Jeggo, P. A., 2009).

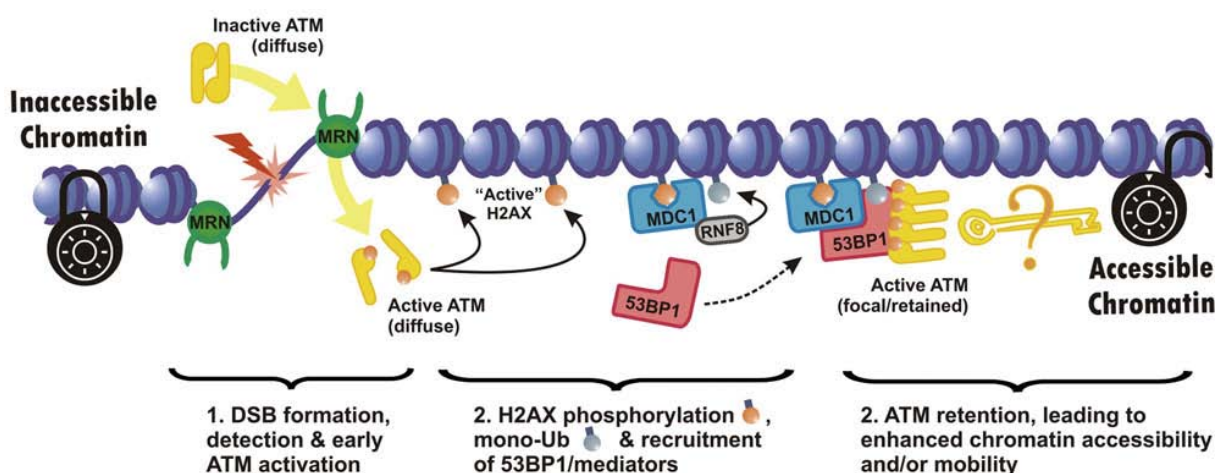


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Öffnungsprozesses des Chromatins:

Am DSB wird ATM durch den MRN-Komplex aktiviert, das danach H2AX phosphoryliert. Daran bindet MDC1, was wiederum die Anlagerung von 53BP1 an das nun ubiquitinylierte  $\gamma$ H2AX ermöglicht. Dieses stabilisiert dann die Bindung des aktiven ATM, was in der Folge das Chromatin um den DSB öffnet (Bild übernommen von (Goodarzi, A. A. und Jeggo, P. A., 2009)).

# Einleitung

Ist nach erfolgreicher Öffnung des Chromatins eine zweite DNA-Kopie zugänglich, wird der Bruch bevorzugt über die Homologe Rekombination (HR) repariert. Ist dies nicht der Fall, erfolgt die Reparatur über die Nicht-Homologe-End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ) (s. Abbildung 1-4).

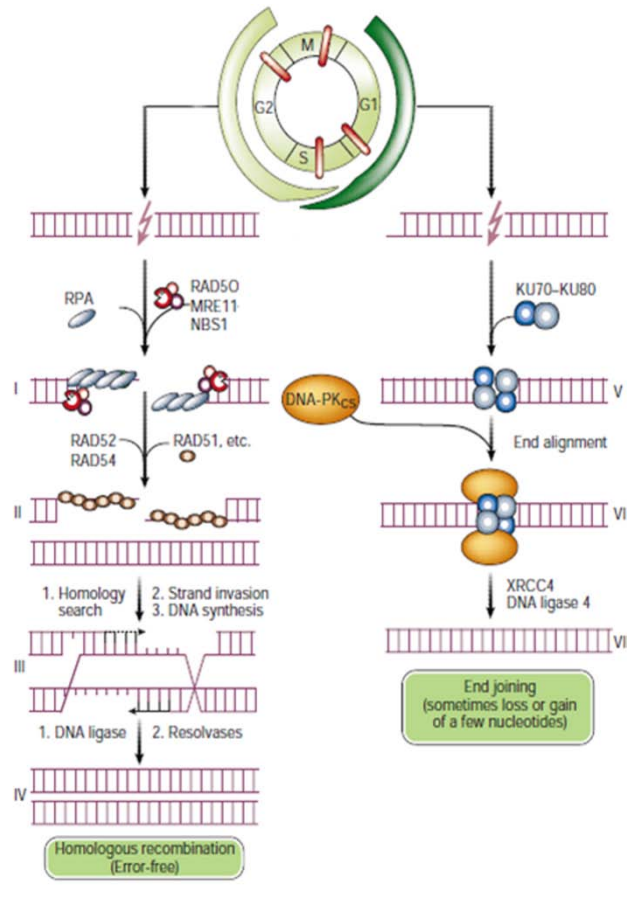


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der beiden DSB-Reparaturwege:

Die HR (linke Seite) läuft nur in Phasen mit doppeltem Chromosomensatz ab (späte S und G 2-Phase), wohingegen die NHEJ (rechte Seite) vornehmlich in den restlichen Phasen (G 1 und frühe S-Phase) abläuft. Bei der HR werden vom MRN-Komplex Einzelstrangüberhänge erzeugt, die in den komplementären Strang überführt werden und somit die Holliday-Struktur bilden. Damit kann von der Matrize die fehlende Information wiederhergestellt werden. Bei der NHEJ wird der DSB von zwei Ku70-Ku80 Heterodimeren gebunden, die die DSB-Enden in räumlicher Nähe halten. Zudem rekrutieren sie DNA-PKcs, um den DNA-PK Komplex zu bilden. Im Anschluss werden die beiden Enden von der DNA Ligase 4 wieder ligiert (ursprüngliche Abbildung genommen von (Hoeijmakers, J. H., 2001)).

Die HR ist auf die späte S-Phase und G 2-Phase beschränkt (s. Abbildung 1-4 , linke Seite), da dieser Reparaturweg ein intaktes Schwesterchromatid benötigt, um eine fehlerfreie Reparatur zu ermöglichen (Seyffert, W., et al., 2003). Dabei wird durch die Exonukleaseaktivität des MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)-Komplexes ein einzelsträngiger 3'-Überhang erzeugt, der durch Rad51 nach Suche von homologen Sequenzen in das Schwesterchromatid eingebracht wird, was eine definierte Struktur (englisch: Holliday-junction) bildet. Danach erfolgt die Neusynthese mit anschließender Religation der Stränge, bevor die einzelnen Chromatiden sich wieder trennen (Hoeijmakers, J. H., 2001). Befindet



sich die Zelle vorzugsweise in G<sub>1</sub>, G<sub>0</sub> oder der frühen S-Phase des Zellzyklus, in denen keine Matrize zugänglich ist, wird der Bruch über das NHEJ repariert (Seyffert, W., *et al.*, 2003) (s. Abbildung 1-4, rechte Seite). Dabei werden die freien Enden des Bruches als erstes von zwei Ku70-Ku80 Heterodimeren gebunden. Diese bilden eine Plattform für die Bindung von DNA-PKcs (englisch: DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) (Spagnolo, L., *et al.*, 2006), das nachfolgende Proteine sowie sich selbst phosphoryliert und aktiviert. Im Anschluss werden die Enden durch XRCC4 und Ligase4 religiert (Abbildung 1-4). Durch die fehlende Matrize können infolge des Reparaturvorganges Mutationen entstehen, wie z.B. der Verlust kleiner DNA-Sequenzen (Deletionen), oder der Einbau falscher Basen (Punktmutationen). Aus diesem Grund wird dieser Mechanismus auch als fehleranfällig (englisch: error-prone repair) bezeichnet (Seyffert, W., *et al.*, 2003). Ob epidermale Stammzellen diesen Reparaturweg nutzen, muss *in vivo* noch untersucht werden. Eines der Kernproteine des NHEJ ist Ku70. Dieses hoch konservierte Protein mit einer molekularen Masse von 70 kDa ist zusammen mit Ku80 Bestandteil des Ku-Komplexes. Diese beiden Proteine besitzen eine hohe Sequenz-unabhängige Affinität für freie DNA-Enden und sich selbst (Chan, D. W., *et al.*, 1999). Somit bindet der Ku-Komplex initial an beide DSB Enden, hält diese aufgrund der hohen Affinität zueinander über den gesamten Reparaturprozess – bis zur endgültigen Religation – in räumlicher Nähe (Walker, J. R., *et al.*, 2001). Zudem wurde durch vorherige Untersuchungen dargelegt, dass die DNA-PKcs-vermittelte Phosphorylierung von Ku70 (z.B. am Serin 6 (Mensch)) wichtig für die Aktivität des NHEJ ist (Douglas, P., *et al.*, 2005). Neben den zentralen Proteinen des NHEJ, wie Ku70, sind vermittelnde Proteine, die sich in großer Zahl am DSB ansammeln, wie 53BP1, von besonderer Bedeutung.

# Einleitung

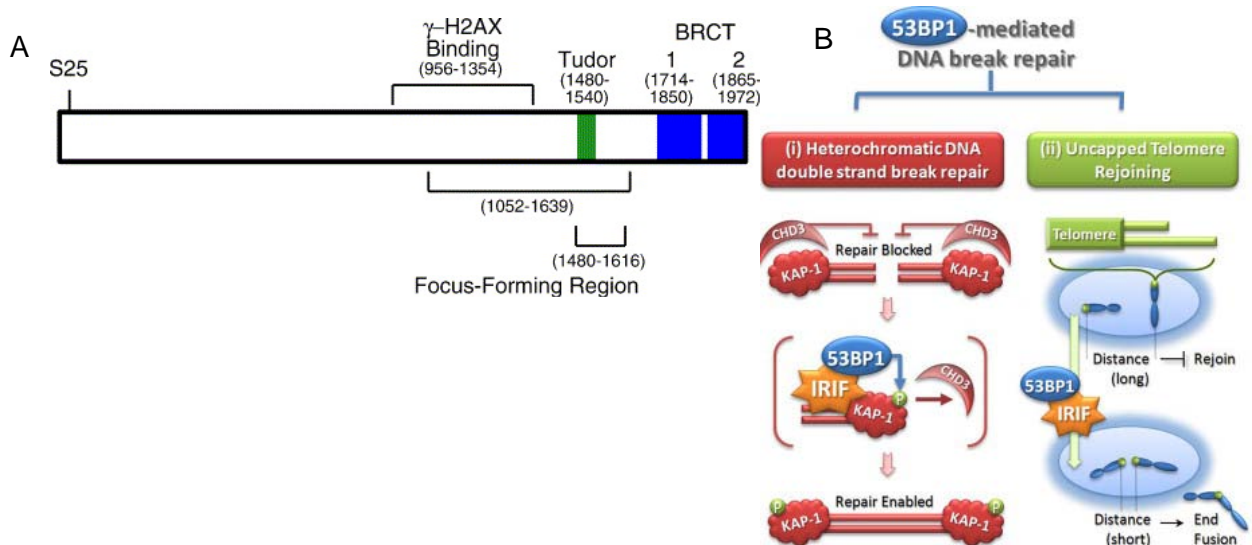


Abbildung 1-5: 53BP1 und seine Funktionen:

A: Schematische Darstellung des humanen 53BP1 Proteins. Dieses zeichnet sich durch seine drei spezifischen Domänen, Tudor und die beiden BRCT Domänen, aus. Zudem gibt es einen Sequenzbereich, der für die  $\gamma$ H2AX-Bindung und RIF-Bildung verantwortlich ist. Des Weiteren ist 53BP1 Ziel von posttranslationalen Modifikationen, wie der Phosphorylierung, z.B. am Serin 25 (S25) (Abbildung genommen von (Mochan, T. A., *et al.*, 2004)). B: Zwei zentrale Wege, in denen 53BP1 eine wichtige Rolle spielt. Zum einen ist 53BP1 an der Öffnung des kompakten Heterochromatins vor der DSB-Reparatur notwendig. Dabei fördert es die Phosphorylierung des Krüppel-assoziierten Proteins (KAP-1), was zur Freilassung vom Chromodomäne-Helikase-DNA-bindende Protein 3 (CHD3) führt (i). Zum anderen erkennt 53BP1 in Zusammenarbeit mit weiteren Reparaturproteinen ungeschützte Telomere und vermittelt die Endfusion (ii) (modifizierte Abbildung von (Noon, A. T. und Goodarzi, A. A., 2011)).

53BP1 erhielt seinen Namen aufgrund seiner Bindung an das Wachstumssuppressorprotein p53. Dabei bindet es die zentrale Region des p53 über die Protein-Protein-interagierenden BRCT Domänen (Iwabuchi, K., *et al.*, 1994). Des Weiteren weist der strukturelle Aufbau schon darauf hin, dass 53BP1 in der DDR involviert ist. Denn es besitzt bestimmte Bereiche, die für die Ansammlung am DSB und damit die lichtmikroskopische Darstellung als diskreter Punkt – dem Fokus – essentiell sind (s. Abbildung 1-5a). Für die Bindung an den DSB spielt die Tudordomäne eine wichtige Rolle, denn über diese können spezifisch methylierte Histone (wie die dimethylierte Form des Lysins 20 des Histons H4 (H4K20me2) (Botuyan, M. V., *et al.*, 2006)) gebunden werden. Somit hat 53BP1 im Rahmen der DSB-Reparatur Einfluss auf die Chromatinstruktur im Umfeld des Bruchs (s. Abbildung 1-5b) und auf die Zellzykluskontrolle, die p53 abhängig ist. Demgegenüber ist 53BP1 noch an weiteren Prozessen beteiligt. Zum einen erkennt und mobilisiert es freie Chromosomenenden (Telomere), die infolge zu häufiger Zellteilung so stark verkürzt sind, dass sonst schützende Proteine verloren gegangen sind (Abbildung 1-5b) (Dimitrova, N., *et al.*, 2008) (s. auch 1.3). Des Weiteren ist 53BP1 auch an der V(D)J-Rekombination und der Antikörperbildung in B- und T-Zellen beteiligt (Bothmer, A., *et al.*, 2011; Difilippantonio, S., *et al.*, 2008). Ob und auf



welche Weise 53BP1 in die zelluläre Alterung von Stammzellen involviert ist, ist noch unbekannt.

## 1.3 DER ALTERUNGSPROZESS

Können induzierte DNA-Schäden nicht oder nur fehlerhaft repariert werden, kann es im Folgenden zu Konsequenzen für die Zelle und den Organismus kommen (s. Abbildung 1-1b). Ein Beispiel hierfür ist der Prozess der Alterung. Alterung ist ein komplexer Mechanismus, der im Laufe der Zeit immer mehr Funktionen des Körpers beeinträchtigt. Ein Beispiel hierfür ist die verminderte Elastizität der Haut in Kombination mit einer verschlechterten Wundheilung mit steigendem Alter [(Clark, W., 1999) zitiert nach (Ho, A. D., *et al.*, 2005)]. Aufgrund der Tatsache, dass die ständige Erneuerung und auch Heilung vieler Organe, wie der Haut, auf das Vorhandensein und die Aktivität von adulten Stammzellen zurückzuführen ist, scheint sich bei verschlechterter Körperfunktion die Aktivität (z.B. hämatopoetische Stammzellen) oder Zahl der Stammzellen mit steigendem Alter zu verändern (Morrison, S. J., *et al.*, 1996b). Fraglich ist aber, ob dieser Zusammenhang auch für die Stammzellen des Haarfollikels gilt. Der Alterungsprozess der einzelnen Zellen wird zudem von vielen intrinsischen Faktoren, wie Telomerverkürzung oder DNA-Reparatur, beeinflusst. Der Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und dem Prozess der Alterung wurde in der DNA-Schadens Theorie der Alterung postuliert. Diese Theorie besagt, dass die wichtigste Ursache für den altersabhängigen Funktionsverlust des Organismus, der durch Veränderungen in Zellen und im Gewebeverband entsteht, die Akkumulation von DNA-Schäden ist [(Failla, G., 1958; Szilard, L., 1959) zusammengefasst in (Freitas, A. A. und de Magalhaes, J. P., 2011)]. Bedingt durch die ständige Schädigung der DNA haben Zellen zwar ein sehr gutes Netzwerk an Reparaturmechanismen aufgebaut, die versuchen die genomische Integrität ein Leben lang zu erhalten, doch können durch die fehlerhafte Reparatur Mutationen entstehen. Diese Mutationen akkumulieren nachweislich mit steigendem Alter (Best, B. P., 2009), was mit einer altersabhängigen Zunahme der Krebswahrscheinlichkeit assoziiert ist (Pompei, F., *et al.*, 2001). Ob es aber auch in alternden Stammzellen des Haarfollikels zur Akkumulation von DNA-Schäden kommt, ist noch nicht untersucht. Der Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und Alterung kann zudem anhand von Erkrankungen und Modellsystemen, die einen Defekt in der DNA-Reparatur aufweisen, noch verdeutlicht werden. Ein Beispiel hierfür ist der schwere kombinierte Immundefekt (englisch: severe combined immune deficiency; SCID) bei dem abnormale T- und B-Zellen die Funktion des Immunsystems zerstören, was eine mittlere Lebenserwartung von nur 9 Monaten in Mäusen nach sich zieht (Shultz, L. D., *et al.*, 1995). Eine Form des SCID, die durch den Verlust von B- und T-Lymphozyten charakterisiert ist (Alymphozytose) (Stephan, J. L., *et al.*, 1993), kann auch im SCID Mausmodell nachgewiesen werden. Diese SCID Mäuse zeigen aufgrund eines defekten

## Einleitung

DNA-PKcs Proteins eine defekte V(D)J Rekombination – was zum Verlust der Lymphozyten führt – und eine eingeschränkte DSB-Reparaturkapazität (Bosma, G. C., *et al.*, 1983; Chang, C., *et al.*, 1993). Aber nicht nur akkumulierende DNA-Schäden, sondern auch sich verkürzende Telomere beeinflussen den Alterungsprozess. Telomere sind spezielle Strukturen am Chromosomenende, die diese freien DNA-Enden vor der Erkennung als DSB schützen. Dafür besitzt der Telomerbereich eine hochrepetitive, tandemartige Aneinanderreihung einer Grundsequenz aus meist sechs Nukleotiden. Dadurch erreicht das Telomer in Abhängigkeit von der Spezies eine Länge von bis zu mehreren Tausend Basenpaaren (bp). Das Telomer formt infolge eines 3' Überhanges in Kombination mit spezifischen Proteinen eine Struktur aus mehreren Schleifen, wodurch keine freien DNA-Enden mehr vorliegen (Seyffert, W., *et al.*, 2003). Jedoch zeigt sich bei der Teilung und der dafür nötigen Replikation der DNA das Problem, dass ein Stück des Telomers verloren geht. Darum kommt es mit steigendem Lebensalter und der Zahl der Teilungen zu einer so starken Verkürzung, dass keine Telomerstruktur mehr gebildet werden kann und somit wieder freie DNA-Enden vorliegen, die zu Chromosomenfehlpaarungen führen können (Hastie, N. D., *et al.*, 1990). Ob dieser Umstand auch Auswirkungen auf den Alterungsprozess von HFSCs *in vivo* hat, ist bis heute noch nicht geklärt. Jedoch können spezielle Zellen (z.B. Stammzellen), die lebenslang im Körper verbleiben, durch ein bestimmtes Enzym – der Telomerase – dieser Verkürzung entgegenwirken (Seyffert, W., *et al.*, 2003). Da dieser Prozess aber nicht in allen Zellen abläuft und zudem die Telomeraseaktivität zu gering ist, um die Telomerverkürzung komplett zu kompensieren, erkennt das Reparaturnetzwerk diese freien Enden mit steigendem Alter und induziert Apoptose oder auch Seneszenz. Apoptose als kontrollierte Form des Zelltods schützt die umliegenden Zellen vor Entzündungsreaktionen infolge von komplettem Zellabbau durch Immunzellen. Die Aktivierung der Apoptose nach Schädigung der DNA läuft vornehmlich über das zentrale Protein ATM, das neben der Reparatur der Schäden auch die Zellzykluskontrolle, sowie die Apoptose induziert (Banin, S., *et al.*, 1998; Chaturvedi, P., *et al.*, 1999).



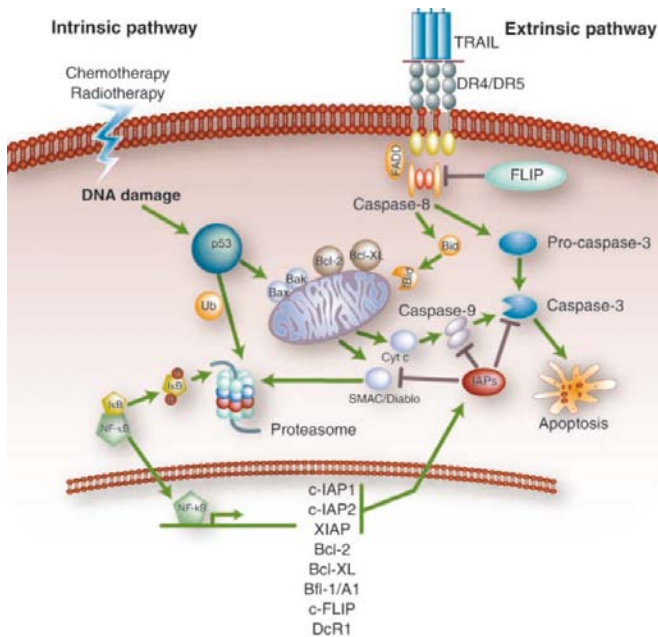


Abbildung 1-6: Die beiden Wege der Apoptose:

Der Signalweg der Apoptose kann extrinsisch über extrazelluläre Moleküle induziert werden, die dann über spezifische Rezeptoren die Caspase-8 aktivieren, die wiederum das zentrale Protein Caspase-3 aktiviert. Auf der anderen Seite kann der Abbau auch intrinsisch über DNA-Schäden aktiviert werden. Dabei spielt p53 eine zentrale Rolle, das wie auch Caspase-8, die mitochondriale Ausschüttung von pro-apoptischen Proteinen, wie Bax und Cytochrom C, fördert und die von anti-apoptischen (Bcl-2; Bcl-X) inhibiert. Auf diesem Weg wird somit wieder die Caspase-3 aktiviert. Ein Gegenspieler der Apoptose ist NF- $\kappa$ B, dieser Signalweg aktiviert viele anti-apoptische Gene (Abbildung übernommen von (de Vries, E. G., *et al.*, 2006)).

Apoptose kann über einen extrinsischen oder einen intrinsischen Weg induziert werden, wobei jeder dieser Wege zur Ausführungsphase, bei der die DNA fragmentiert wird, hinführt (s. Abbildung 1-6). Beim extrinsischen Weg wirken externe Moleküle aus der Zellumgebung durch die Bindung an Rezeptoren in der Zytoplasmamembran. Demgegenüber aktivieren unreparierte DNA-Schäden den intrinsischen Apoptoseweg über ATM und p53, bei dem infolge zellulären Stresses Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt wird (Banin, S., *et al.*, 1998; Marchenko, N. D., *et al.*, 2000). Beide Wege induzieren die Degradation der DNA durch die Caspase-Kaskade. Ein zentrales Protein dieser Kaskade, das durch unterschiedliche Stimuli induziert werden kann, ist das proteolytische Enzym Caspase-3 (Woo, M., *et al.*, 1998). Dieser Vorgang kann aber durch anti-apoptische Proteine (z.B. Bcl-2) verhindert werden. Das anti-apoptische Bcl-2 nimmt zudem in der Resistenz der Haarfollikel Stammzellen gegenüber DNA-Schäden vermittelter Apoptose eine zentrale Rolle ein (Sotiropoulou, P. A., *et al.*, 2010). Ob dieses Protein aber auch infolge der Alterung zum Schutz dieser Stammzellen aktiviert wird, ist noch unklar. Ein weiterer Gegenspieler der Apoptose ist der NF- $\kappa$ B-Signalweg, der infolge von extrazellulären oder auch intrazellulären Signalen (DNA-Schäden) (Wu, Z. H., *et al.*, 2006) eine Vielzahl von weiterführenden anti-apoptischen Genen aktiviert. Im Ruhezustand liegen die zentralen Proteine im Zytoplasma zusammen mit inhibierenden Proteinen (I $\kappa$ B $\alpha$ ) in einem Komplex vor. Nach Stimulation

# Einleitung

erfolgt die Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , wodurch NF- $\kappa$ B frei wird und in den Kern wandert, um dort die Zielgene zu aktivieren (Yaron, A., *et al.*, 1998). Somit ermöglicht die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in Kombination mit DNA-Reparaturmechanismen die Wiederherstellung der genetischen Integrität und unterdrückt somit die Apoptose. Die Frage die hierbei aufkommt ist, ob dieses Zusammenspiel auch während des Alterungsprozesses abläuft um die Zellen zu schützen? Neben der Apoptose können Zellen auch durch Seneszenz stillgelegt werden. Kultivierte Zellen erreichen den Zustand des unüberwindbaren Teilungsarrests, replikative Seneszenz, nach einer gewissen Zahl von Verdopplungen. Der Zustand der replikativen Seneszenz wurde zum ersten Mal 1961 von Hayflick und Moorhead beschrieben (Hayflick, L. und Moorhead, P. S., 1961). Untersuchungen in menschlicher Haut haben diesen Zustand auch *in vivo* mit dem Phänomen der Alterung in Verbindung gebracht (Dimri, G. P., *et al.*, 1995). Dabei verlieren Zellen nach einer gewissen Zahl von Teilungen die Teilungsfähigkeit und werden stillgelegt. Dieser Arrest wird von der Telomerverkürzung, der Akkumulation von interchromosomalen und telomerischen DNA-Schäden, sowie von der Aktivierung von Tumorsuppressor Proteinen, wie p16<sup>ink4a</sup> (englisch: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), beeinflusst und induziert (Krishnamurthy, J., *et al.*, 2004; von Zglinicki, T., *et al.*, 2005). Ist dieser Zustand auch in gealterten murinen Hautstammzellen vorherrschend? Diese Frage muss noch geklärt werden. Um den Alterungsprozess adulter Stammzellen, im Vergleich zu ausdifferenzierten Zellen, in ihrer Nische untersuchen zu können, eignet sich insbesondere die murine Haut. Denn im Haarfollikel der murinen Haut befinden sich die epidermalen Stammzellen in einer definierten, kompakten Struktur, der Stammzellnische (Cotsarelis, G., *et al.*, 1990; Fuchs, E. und Segre, J. A., 2000).

## 1.4 DIE HAUT

Die Haut ist ein mehrschichtiges Epithel, das den gesamten Organismus umgibt und ihn somit ein Leben lang vor äußeren Einflüssen und Reizen schützt. Die Haut besteht aus drei wesentlichen Einheiten. Zunächst der Subcutis, die überwiegend aus Bindegewebe und eingelagertem Fettgewebe besteht. Diese dient der Verbindung zu angrenzenden Knochen und der Wärmespeicherung. Oberhalb der Subcutis befindet sich die Dermis. Diese beinhaltet Kollagenfasern, elastische Fasern, sowie eine Vielzahl von Sinnesrezeptoren und Blutgefäßen, die die darüber liegende Epidermis mit Nährstoffen versorgen (Meves, A., 2006). Die Epidermis ist die äußerste Hautschicht. Sie besteht fast vollständig aus Keratinozyten (hornbildende Zellen), verknüpft durch Desmosomen, die an der Oberfläche von verhornten Plattenepithelzellen abgelöst werden (Meves, A., 2006). Damit die Haut ihre lebenslange Schutzfunktion ausführen kann, muss sich die Epidermis immer wieder erneuern. Dieser Vorgang wird als Homöostase bezeichnet und ersetzt abgestoßene oder tote Zellen und heilt Verletzungen der Hautoberfläche. Diese Homöostase wird durch

Stammzellen in der Basalzellschicht ermöglicht, die die Fähigkeit besitzen, schnell teilende Tochterzellen, auch transient amplifizierende Zellen genannt, zu bilden. Diese Zellen teilen sich einige Male schnell hintereinander, bevor sie auf dem Weg zur Hautoberfläche ausdifferenzieren ((Potten, C. S., 1974) zitiert nach (Fuchs, E., 2008)); (Mackenzie, I. C., 1997)). Dieser Weg von der Basalzellschicht zur Oberfläche der Epidermis in der Maus dauert ca. 8-9.5 Tage [(Potten, C. S., *et al.*, 1987) zitiert nach (Koster, M. I., 2009)]. Die Epidermis wird in behaarten Hautregionen von Haarfollikeln durchbrochen. Der Haarfollikel ist in Mäusen zwischen dem 5.-9. Tag nach der Geburt vollständig ausgebildet (Paus, R., *et al.*, 1998). Dafür ist eine Interaktion von Dermis und Basalzellschicht der Epidermis nötig (Hardy, M. H., 1989).

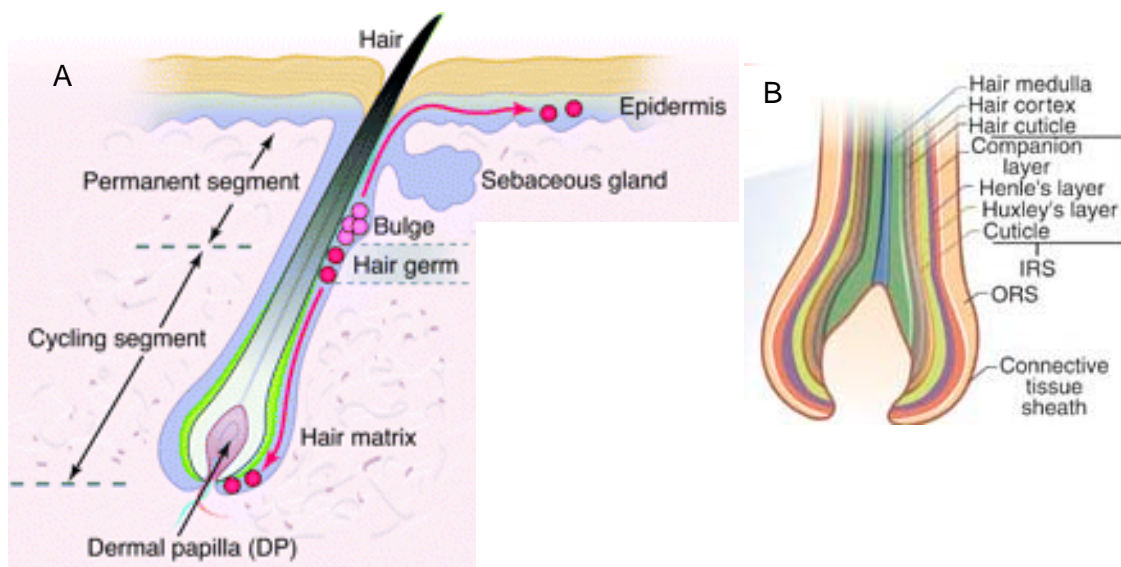


Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau des Haarfollikels:

A: Permanenter und zyklischer Bereich des Haarfollikels mit Stammzellregion und zugehöriger Talgdrüse. Hervorgehoben sind die ruhenden Stammzellen im bulge (pink) und die sich teilenden Tochterzellen an den Zielorten (rot) (Bild übernommen von (Li, L. und Clevers, H., 2010)). B: Erläuterung der einzelnen Schichten des Haarfollikels (Bild übernommen von (Cotsarelis, G., 2006)). IRS, innere Wurzelscheide; ORS, äußere Wurzelscheide.

Der Haarfollikel besteht aus mehreren Schichten, vergleichbar mit einer Zwiebel (s. Abbildung 1-7B). Jede Schicht, von der innersten, der Haar Medulla, bis zur äußersten, der äußeren Wurzelscheide, besitzt eine definierte Funktion. Die sich aktiv teilenden Zellen sind auf die äußere Wurzelscheide, die sekundäre Keimregion und den Haarbulbus (unterster Teil des Haarfollikels) beschränkt (s. Abbildung 1-7A). Wie in Abbildung 1-7A weiter zu erkennen ist, unterteilt sich der Haarfollikel in zwei Bereiche, den permanenten Bereich – vom Ansatz an der Epidermis bis unter den Wulst – und den zyklischen Bereich, der von der sekundären Keimregion bis zur Spitze des Haarfollikels reicht. Der permanente Bereich bleibt, wie der Name schon sagt, über die gesamte Dauer in einem Zustand, während sich der zyklische Bereich während des Wachstumsprozesses des Haares in Folge des Haarzyklus verändert. Um dieses Wachstum zu ermöglichen, sind im Wulst (bulge) der

# Einleitung

äußeren Wurzelscheide, vergleichbar mit der Basalschicht der Epidermis, Stammzellen angesiedelt. Der Haarwulst selbst wurde zum ersten Mal von Feiertag abgebildet [(Feiertag, I., 1875) zitiert nach (Stöhr, P. H., 1903)] und 1903 von dem Morphologen P.H. Stöhr als „Wulst“ definiert, da er als ausgewölbte Struktur an der Ansatzstelle des Haarmuskels lokalisiert ist (Stöhr, P. H., 1903). Im Haarfollikel lassen sich unterschiedliche Stammzellpopulationen identifizieren, die innerhalb und auch außerhalb der bulge Region liegen. Die ursprünglichsten Stammzellen der Epidermis, die Haarfollikel Stammzellen (HFSCs), die als erste adulte Stammzellen isoliert wurden, befinden sich an der Basalmembran des bulge. Diese Zellpopulation wurde aufgrund ihrer seltenen Teilungsaktivität als „label-retaining cells“ identifiziert (Cotsarelis, G., *et al.*, 1990) und im Nachhinein auch unter Verwendung von mikrodisektionierten Haarfollikeln und anschließender Transplantation unter die Nierenkapsel von haarlosen Mäusen, als Stammzellen identifiziert (Oshima, H., *et al.*, 2001). Diese können alle Zellen des Haarfollikels, der Talgdrüse und der Epidermis bilden (Oshima, H., *et al.*, 2001). Zudem haben sie das Potential, auch Nicht-Epithelzellen, wie Neuronen, Zellen der Blutgefäße oder Schwannsche Zellen zu bilden, was den pluripotenten Charakter dieser Stammzellen widerspiegelt (Amoh, Y., *et al.*, 2005a; Amoh, Y., *et al.*, 2005b; Amoh, Y., *et al.*, 2004). Inwieweit diese Zellen aber einen durch DNA-Schäden induzierten Alterungsprozess durchlaufen muss noch geklärt werden. Um die HFSCs des bulge näher charakterisieren zu können, ist eine Markierung dieser Stammzellen unerlässlich. Dafür wurden im Laufe der Stammzelluntersuchungen einige Proteine identifiziert, die spezifisch in diesen Stammzellen vorkommen. HFSCs können über die Expression von  $\alpha 6$  Intergrin identifiziert werden. Dieses Adhäsionsprotein ist Teil der Integrin Familie, die als Oberflächenproteine fungieren und ruhende Stammzellen in ihrer Nische fixieren. Aber dieser Marker ist nicht auf die Zellen der bulge Region beschränkt, da er auch in den Zellen der Epidermis exprimiert wird (Trempe, C. S., *et al.*, 2003). Dieser Umstand macht eine spezifische Untersuchung der HFSCs mit diesem Marker unmöglich. Demgegenüber lassen sich die HFSCs des Menschen mittels CD200 und die der Maus mittels CD34 spezifisch nachweisen. Diese beiden Marker sind Transmembranproteine, die speziesspezifisch auf der Oberfläche der HFSCs vorkommen (Ohyama, M., *et al.*, 2006; Trempe, C. S., *et al.*, 2003). Dabei konnte in der Maus für CD34 nachgewiesen werden, dass es die Stammzellen im Haarwulst markiert und mit dem Marker Keratin 15 in dieser Region kolokalisiert (Trempe, C. S., *et al.*, 2003).



## 2 ZIELE DER ARBEIT

Der Alterungsprozess eines Individuums ist stark von dem Alterungsprozess der einzelnen Stammzellpopulationen abhängig. Wobei der Alterungsprozess der Stammzellen wiederum von intrinsischen, genetischen Veränderungen – wie akkumulierender DNA-Schäden – wie auch von den Zellen der Umgebung [zusammengefasst in (Rando, T. A., 2006)] beeinflusst wird.

Aus diesem Grund werden unter Verwendung der murinen Haut als *in vivo* Modell die Stammzellen des Haarfollikels in ihrer physiologischen Nische untersucht. Dieser Umstand ist von besonderer Bedeutung, da nur auf diese Art gewährleistet werden kann, dass alle zu untersuchenden Phänomene reale Phänomene im lebenden Organismus widerspiegeln. In diesem *in vivo* Modell soll in diesem Zusammenhang zunächst geklärt werden, ob es mit steigendem Alter in den Haarfollikel Stammzellen, sowie in den differenzierten Keratinozyten zu einer Akkumulation von DNA-Schäden kommt. Zudem ist von großem Interesse, ob die altersabhängige Zunahme nur über die Zeit oder aufgrund einer verminderten Reparaturkapazität bedingt ist. Des Weiteren sollen die altersabhängigen DNA-Schäden noch genauer in der Ultrastruktur des Zellkerns – dem Chromatinkontext – charakterisiert werden. Hierbei ist die Frage zu klären, ob es sich um unreparierte Doppelstrangbrüche, um verkürzte und somit ungeschützte Telomere oder vielmehr um altersabhängige Chromatinveränderungen handelt. Letztlich sind dann noch die Folgen – die sich für die Stammzellen durch endogene und exogene Stimulation ergeben – zu untersuchen. Dabei soll beleuchtet werden, ob es in Folge des Alterungsprozesses oder nach Bestrahlung zu Veränderungen in den Stammzellen oder der Stammzellnische kommt, die die Zahl oder die Funktion der Stammzellen beeinflussen.



## 3 MATERIAL UND METHODIK

### 3.1 MATERIAL

Im Folgenden sind alle Materialien und Lösungen, die für die Durchführung der Versuche verwendet wurden, unter Angabe der Hersteller alphabetisch aufgelistet (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Materialliste unter Angabe des Herstellers:

Produkt	Hersteller
<b>0.5 ml Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss</b>	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
<b>5 µm Zellnetz mit Rundbodengefäß</b>	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
<b>70 / 40 µm Zellnetz</b>	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
<b>Benzil</b>	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>Block-Lösung</b>	AURION Immuno Gold Reagents & Accessories, Wageningen, Niederlande
<b>BSA-c</b>	AURION Immuno Gold Reagents & Accessories, Wageningen, Niederlande
<b>Chelex</b>	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
<b>Citrat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>DAB-Reagenz (Sigma FAST 3,3-Diaminobenzidin Tabletten)</b>	Sigma Aldrich-Steinheim-Deutschland
<b>Dako REAL Target Retrieval solution (10x)</b>	Dako Dänemark A/S, Glostrup, Dänemark
<b>Di-Natriumphosphat (<math>\text{Na}_2\text{HPO}_4</math>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG-Karlsruhe-Deutschland
<b>Dispase (1mg/ml) in DMEM/F-12</b>	Stemcell Technologies SARL, Grenoble, Frankreich
<b>DMEM/F-12 (3:1) Medium ohne Kalzium Sonderanfertigung (Ref 041-96401M)</b>	GIBCO Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Einbettkassetten für Routine</b>	NeoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH-Heidelberg-Deutschland
<b>Ethanol</b>	Sigma Aldrich-Steinheim-Deutschland
<b>Formaldehyd (37%)</b>	Merck KGaA-Darmstadt-Deutschland
<b>Formamid</b>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Fetales Kälberserum</b>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland



<b>Glutaraldehyd (50%)</b>	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA
<b>Glyzin</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Mo, USA
<b>Hämatoxylin</b>	Vektor laboratories Inc., Burlington, CA, USA
<b>Hardset Eindeckmedium mit Dapi</b>	Vektor laboratories Inc., Burlington, CA, USA
<b>HCL</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Mo, USA
<b>Immunoblock</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Kaliumhexacyanidoferrat (III)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumhexacyanoferrat</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Kaliumhydrogenphosphat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG-Karlsruhe-Deutschland
<b>LR-Gold</b>	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>Magnesiumchlorid</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Mo, USA
<b>N,N-Dimethylformamid (DMF)</b>	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumnitrit (NaN<sub>3</sub>)</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Natriumphosphat (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, Mo, USA
<b>Nickel-Grid</b>	Agar Scientific, Stansted, England
<b>Normalserum-Ziege (NS)</b>	PAA Laboratories GmbH-Pasching-Österreich
<b>Nunclon surfac Petrischalen (ø 9 cm)</b>	Nunc und Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
<b>Paraffin</b>	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik, Edermünde, Deutschland
<b>Parafilm</b>	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
<b>Paraformaldehyd (32%)</b>	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA
<b>Penicillin/Streptomycin, flüssig</b>	Biochrom AG-Berlin-Deutschland
<b>Pioloform BM18</b>	Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>PNA probe (Telomer)</b>	Panagene, Daejeon, Korea
<b>RNeasy Micro und Minikit</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<b>Wasserstoffperoxid (30%) (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)</b>	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland



<b>SSC-Puffer</b>	Appllichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>SuperScript III First-strand-Synthese System für reverse Transkription</b>	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Tris</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Triton X-100</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Trypsin (0.5%) 10x</b>	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<b>Tween-20</b>	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
<b>Uranylacetat</b>	Merck KGaA-Darmstadt-Deutschland
<b>Vectastain ABC-Kit (peroxidase standard)</b>	Vektor laboratories Inc., Burlington, CA, USA
<b>wässriges Einbettmedium</b>	Dako Dänemark A/S, Glostrup, Dänemark
<b>X-Gal (5-bromo-4-chloro-indolyl-<math>\beta</math>-D-Galaktopyranosid)</b>	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Xylol Pharm.</b>	Hediger, Stuttgart, Deutschland
<b>Objektträger</b>	Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland
<b>Deckgläser</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Feinpinzette</b>	Medical Highlights Germany GmbH, Rohrdorf, Deutschland
<b>Sezierschere</b>	Medical Highlights Germany GmbH, Rohrdorf, Deutschland
<b>Skalpell</b>	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
<b>Klinge</b>	C. Bruno Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
<b>Rundbodengefäß</b>	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
<b>SYBR Green PCR Kit</b>	Qiagen, Hilden, Deutschland

Ein Bestandteil der verwendeten Materialien, der in den *in vivo* Untersuchungen eine zentrale Position einnimmt, ist der Antikörper. In den Untersuchungen werden verschiedene primäre, wie auch sekundäre Antikörper verwendet, die in der Tabelle 3 und der Tabelle 4 aufgelistet sind.



Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper:

Antikörper unter Angabe des Herstellers und der verwendeten Verdünnung bei den einzelnen Applikationen. Des Weiteren werden Besonderheiten des Versuchsablaufes dokumentiert.

	Antigen	Ursprung	Firma	IHC	TEM	Durchfluss -zytometer
DNA-Reparatur	53BP1	Kaninchen	Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX,USA	1:200	1:200	1:100
	p53BP1	Kaninchen				
	$\gamma$ H2AX	Kaninchen				
	pKu70 (S5)	Kaninchen	Abcam plc., Cambridge, UK		1:150	1:100
	pDNA- PKcs	Kaninchen	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA		1:500	1:500
Nische	p1kB $\alpha$	Maus	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA	1:150 Citrat- Puffer (pH 6), 96°C 45 min		
Apoptose & Seneszenz	p16 <sup>ink4a</sup>	Kaninchen	Cell Applications Inc., San Diego, CA, USA	1:200; ü.N. 4°C; Citrat- Puffer (pH 6), 60°C 30 min		1:200
Apoptose & Seneszenz	Caspase- 3	Kaninchen	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1:600, ü.N. 4°C; Citrat- Puffer (pH 6), 96°C 20 min		1:600
Proliferation	Ki67	Ratte	Dako Dänemark A/S, Glostrup, Dänemark	1:200		



<b>Stammzellmarker</b>	<b>α6-Integrin - FITC</b>	Ratte	Abcam plc., Cambridge, UK			15µl für 1x10 <sup>6</sup> Zellen
	<b>CD34</b>	Ratte	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA	1:50	1:50	1:50
<b>Histonmodifikationen</b>	<b>H4K16ac</b>	Kaninchen	Abcam plc., Cambridge, UK	1:200	1:200	1:100
	<b>H3K9ac</b>	Kaninchen		1:200	1:200	
	<b>H3K9me3</b>	Kaninchen		1:400	1:400	
	<b>H3K9ac</b>	Kaninchen		1:200	1:200	



Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper:

Unter Angabe des Herstellers und der verwendeten Verdünnung bei den einzelnen Applikationen.

	Antikörper	Firma	Konzentration
IFM	Alexa Fluor 488/568 Ziege anti-Kaninchen	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	1:400
	Alexa Fluor 488/568 Ziege anti-Maus		
	Alexa Fluor 488/568 Ziege anti-Ratte		
Durchfluss- zytometrie	Ziege anti-Kaninchen IgG F(ab') <sub>2</sub> - APC-Cy7	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA	1:500
	Ziege anti-Ratte-APC	Molecular Probes (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)	1:600
TEM	Ziege anti-Maus IgG/M (10 nm)	AURION Immuno Gold Reagents & Accessories, Wageningen, Niederlande	1:30
	Ziege anti-Kaninchen (6 / 10 nm)		
	Ziege anti-Ratte (6/10nm)		
IHC	Ziege anti-Kaninchen-biotinyliert	Dako Dänemark A/S- Glostrup-Dänemark	1:200
	Kaninchen anti-Ratte-biotinyliert		
	Kaninchen anti-Maus-biotinyliert		
	Kaninchen anti-Ziege-biotinyliert		

Im weiteren Verlauf werden alle verwendeten Geräte und die Computersoftware, die für die Durchführung und die Auswertung der Versuche wichtig sind, mit zugehörigem Hersteller aufgelistet (s. Tabelle 5 und Tabelle 6).

Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten Gerätschaften unter Angabe des Herstellers:

Produkt	Hersteller
Ausblockstation	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Brutschrank	(Heraeus) Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Diatome Messer (45°)	Diatome AG, Biel, Schweiz
Durchflusszytometer (BD FACSCanto II)	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Einbettautomat (Shandon Excelsior ES )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fluoreszenzmikroskop (E600)	Nikon, Tokio, Japan



<b>Konfokales Fluoreszenzmikroskop</b>	Nikon, Tokio, Japan
<b>Kryotank (Arpege 170)</b>	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Kühlzentrifuge ((5810R) 50, 15 ml Reaktionsgefäße)</b>	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
<b>Kühlzentrifuge ((Biofuge, fresco) 0.5, 1, 2 ml Reaktionsgefäße)</b>	(Heraeus) Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Light Cyclor</b>	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
<b>Linearbeschleuniger (Artist; 6MV)</b>	Siemens AG, Healthcare Sector, Erlangen, Deutschland
<b>Magnetrührer mit Heizfunktion</b>	(Stuart), VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<b>Mikrotom (RM2235)</b>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>NanoDrop (2000c)</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Pipetten</b>	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
<b>Sterilbank (HeraSafe)</b>	(Heraeus) Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Transmissions-Elektronen Mikroskop (Biotwin)</b>	Fei Company, Hillsboro, Or, USA
<b>Ultra-Mikrotom</b>	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
<b>Vortex-Genie 2</b>	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
<b>Wärmeschrank</b>	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
<b>Wasserbad</b>	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Computersoftware unter Angabe des Herstellers:

Produkt	Hersteller
Analysis	TEM zugehörige Software
Excel	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Durchflusszytometer Diva Software	BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA
Light Cycler Software	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
OriginPro 8.5G Programm	OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA
Photoshop	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
Word	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA

### 3.1.1 MÄUSE

Die Untersuchungen wurden unter Verwendung von C57BL/6J ((C57BL/6JNCrl; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany), (C57BL/6JJRj; Janvier; Le genest saint isle; France)) und SCID (CB17/Icr-Prkdc scid/Crl; Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) Mäusen unterschiedlichen Alters (0,5, 3, 12, 18, 24 Monate) durchgeführt. Sechs bis sieben Tiere wurden in einem Käfig mit separater Belüftung, unter identischen und standardisierten Laborbedingungen (Temperatur  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  mit einer Luftfeuchtigkeit von  $55 \pm 10\%$  und einem 12:12 h langen Tag-Nacht Zyklus) gehalten. Zudem hatten alle Tiere während des gesamten Experiments freien Zugang zu Futter und Wasser. Die zu Grunde liegenden Versuchsprotokolle wurden durch das Tierhaltungs- und Tierversuchskomitee der Universität des Saarlandes genehmigt (Genehmigungsnummer: 12/2009).

## 3.2 METHODIK

### 3.2.1 BESTRAHLUNG

Alle Bestrahlungen erfolgten an einem 6 MV-Linearbeschleuniger (Dosisrate: 200 mGy/min) als Ganzkörperbestrahlungen in einem Plexiglaszylinder mit einem 1 cm dicken Plexiglas Deckel. Dieser ist wichtig für die Erzeugung eines homogenen Bestrahlungsfeldes in der gesamten Maus. Um die homogene Dosisverteilung von ca. 80-95% in der gesamten Maus zu validieren, wurde die Bestrahlung mittels ADAC Pinnacle, einem dreidimensionalen Planungsprogramm, geplant.

## 3.2.1.1 EINZEITBESTRAHLUNG

Bei einer Einzeitbestrahlung wurde den unterschiedlich alten Tieren (0.5, 3, 12, 18, 24 Monate) einmalig eine Dosis von 0.01-6 Gy appliziert.

## 3.2.1.2 FRAKTIONIERTE NIEDRIGDOSISBESTRAHLUNG

Neben einer Einzeitbestrahlung wurden zudem junge Mäuse (3 Monate) einer fraktionierten Bestrahlung mit einer sehr niedrigen Dosis (10 mGy) unterzogen (s. Abbildung 3-1).

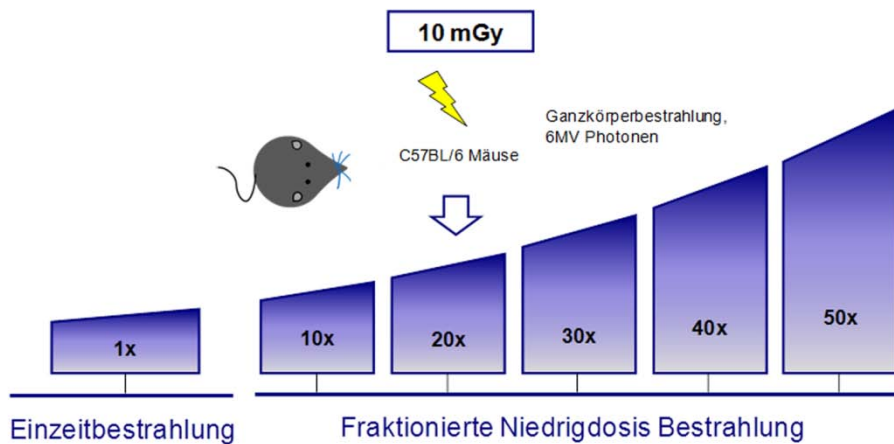


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus:

Dabei wurden C57BL/6 Mäuse einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen. Bei einer Einzeitbestrahlung wurde den Tieren einmalig eine Dosis von 10 mGy appliziert, während sie bei einer fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung jeden Tag, fünfmal die Woche mit der zu applizierenden Dosis (10 mGy) bestrahlt wurden. Nach 10, 20, 30, 40, und 50 Bestrahlungen wurden die Gewebe für die nachfolgenden Analysen asserviert.

Hierbei folgt man dem Verlauf einer klinischen Strahlentherapie, wobei die Mäuse jeden Tag, fünf Tage die Woche, einer Dosis von 10 mGy (Ganzkörper) ausgesetzt (1 Bestrahlung pro Tag = eine Fraktion) wurden. Diese tägliche Bestrahlung erfolgte über 2, 4, 6, 8 oder 10 Wochen hinweg.

## 3.2.2 GEWEBEENTNAHME

Bei der Einzeitbestrahlung wurde zum einen die Reparaturkinetik zu unterschiedlichen Zeiten (0.5, 5, 24, 48 h) nach einer definierten Dosis (2 Gy), sowie die Induktion 0.5 h nach unterschiedlichen Dosen (0.01-2 Gy) untersucht. Bei der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung erfolgten die Untersuchungen 24 bzw. 72 h nach der letzten Fraktion einer Bestrahlungszeit von 2-10 Wochen. Unbestrahlte Kontrollmäuse sowie bestrahlte Mäuse wurden zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten durch eine intraperitoneale Injektion (Rompun / Ketamin) (0.1 ml / 10 g Körpergewicht aus dem Muskelrelaxanz Xylazin (Rompun) und dem Narkosemittel Ketamin in einem 1:2 Verhältnis, verdünnt in 0.9%-iger Natriumchlorid Lösung) narkotisiert. Nach einer kurzen Wartezeit (5-10 min), bis keine



Reflexe mehr an den Mäusen zu erkennen waren, wurde die gesamte Maus mittels eines elektrischen- sowie im Anschluss eines Nassrasierers vollständig am Thorax enthaart.

Im Anschluss wurde

- für die Seneszenz-assoziierte- $\beta$ -Galaktosidase-Färbung, Immunfluoreszenz-färbung, immunhistochemische Färbung, Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung und die Expressionsanalyse ein 0.5 x 2 cm großes Stück der Rückenepidermis entnommen.
- für die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie ein 1 mm x 1 mm x 2 mm großes Stück der Rückenepidermis entnommen.
- für die Isolierung der HFSCs die gesamte Maus mit 70% Ethanol abgewaschen und trocknen gelassen. Anschließend wurde die Maus auf dem Bauch fixiert. Unter Verwendung von Sezierpinzette und -skalpell wurde dann ein vollständiger dorsaler Schnitt vom Kopf bis zum Schwanz und zwei zirkulierende Schnitte hinter den Vorderbeinen und vor den Hinterbeinen gemacht. Mittels Pinzette wurde die restliche Haut nun in einem Stück abgezogen. Dabei war zu beachten, dass Fettgewebe und Blutgefäße möglichst entfernt werden und dass die Haut unversehrt bleibt.

### 3.2.3 SENESZENZ-ASSOZIIERTE- $\beta$ -GALAKTOSIDASE-FÄRBUNG

Der Zustand der Seneszenz kann unter Verwendung von X-Gal, das durch den Verdau von  $\beta$ -Galaktosidase zu einer unlöslichen, blauen Verbindung wird, nachgewiesen werden. Für den spezifischen Nachweis der Seneszenz-assoziierten- $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) ist es von entscheidender Bedeutung, dass diese Reaktion bei einem pH von 6 erfolgt. Denn nur so kann von der lysosomalen  $\beta$ -Gal Aktivität, die in fast allen Zellen auftritt, und bei einem pH von 4 erfolgt, unterschieden werden (Debacq-Chainiaux, F., *et al.*, 2009). Das verwendete Protokoll wurde auf Grundlage von Untersuchungen von Gannon etabliert (Gannon, H. S., *et al.*, 2011).

Die entnommenen Hautproben wurden unter Verwendung einer Pinzette zu einer Rolle geformt und anschließend 2-mal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid und 12 mM Gesamt-Phosphat, pH 7,2-7,4) gewaschen. Danach wurden die Proben 20 min bei RT in 4% neutral gepuffertem Formalin (140 ml 37%-iges Formaldehyd, 11.9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 9.1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , auf 1 l mit Aqua dest. ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) aufgefüllt, pH 6.8) vorfixiert. Wiederum wurde 2-mal mit PBS gewaschen und die Haut dann über Nacht (ü. N.) bei Raumtemperatur (RT) oder 5 h bei 37°C in der Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Für die Färbelösung wurde zuerst ein Grundpuffer aus 40 mM Citrat und 40 mM Natriumphosphat hergestellt und auf pH 6 eingestellt. Dazu wurden 5 mM Kaliumhexacyanoferrat, 5 mM Kaliumhexacyanidoferrat (III), 2 mM Magnesiumchlorid, 150 mM Natriumchlorid gemischt und anschließend 1 mg/ml X-Gal gelöst in DMF zugegeben.



Diese Lösung musste nach dem Zusetzen des X-Gals sofort verwendet werden. Danach wurden die Proben wieder 2-mal mit PBS gewaschen und ü. N. in 4% Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (s. 3.2.4).

## 3.2.4 EINBETTVERFAHREN FÜR SENESZENZ-ASSOZIIERTE- $\beta$ -GALAKTOSIDASE-FÄRBUNG, IMMUNHISTOCHEMIE, IMMUNFLUORESCENZ, FLUORESCENZ-*IN-SITU*-HYBRIDISIERUNG

Um das entnommene Gewebe über einen langen Zeitraum haltbar zu machen und somit auch untersuchen zu können, muss die nach der Entnahme auftretende Autolyse des Gewebes unterbunden werden. Aus diesem Grund werden Gewebeproben in Formalin fixiert. Dabei werden die Proteine an freien Aminogruppen vernetzt. Da somit aber das Gewebe einen gummiartigen Zustand eingeht, muss für die spätere Anfertigung von Dünnschnitten, die für die weitere Analyse nötig sind, das Gewebe in einer starren und gleichmäßigen Konsistenz erhalten werden. Dies wird durch die Einbettung in Paraffin erreicht. Da Paraffin aber nicht wasserlöslich ist, muss das Gewebe über eine Alkoholreihe in Xylol überführt werden (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006).

Die entnommenen Hautproben wurden unter Verwendung einer Pinzette zu einer Rolle geformt und anschließend sofort in 4% neutral gepuffertem Formalin für ca. 16 h bei RT fixiert. Danach wurden die Proben in eine Einbettkassette überführt und in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben in einem Einbettautomat, nach folgendem Programm:

1 h 30 min Formalin

1 h 5 min Alkohol 50%

1 h 5 min Alkohol 70%

1 h 5 min Alkohol 80%

1 h 5 min Alkohol abs.

1 h 5 min Alkohol abs.

55 min Xylol

55 min Xylol

1 h 20 min Xylol

1 h Paraffin

1 h 20 min Paraffin

1 h 20 min Paraffin

in Paraffin überführt und in einer Ausblockstation in einen Paraffinblock eingegossen. Von diesen Gewebelöcken konnten dann an einem Schlitten-Mikrotom 4-7  $\mu$ m dicke Schnitte angefertigt werden. Die Schnitte wurden dann von der Wasseroberfläche der an das Messer angrenzenden Wanne auf saubere und fettfreie Objektträger aufgenommen und von dort



kurz in ein 50°C warmes Wasserbad gehalten um sich von Falten, die durch Stauchung während des Schneidvorganges entstanden sind, zu befreien. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 10 h bei 37°C in einem Wärmeschrank trocknen gelassen, bevor sie nochmals für ca. 1 h bei 56°C auf dem Objektträger aufgebacken wurden. Dadurch ging das filigrane Gewebe im folgenden Färbeprozess nicht verloren oder kaputt.

## 3.2.5 IMMUNFLUORESZENZ

Der Nachweis von Proteinen innerhalb von Zellen wird durch die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen in der indirekten Immunfluoreszenz Mikroskopie (IFM) möglich. Diese lassen sich durch Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen und emittieren daraufhin Licht einer anderen Wellenlänge, die Emission. Diese Emission lässt sich dann mittels eines Fluoreszenzmikroskops, das bestimmte Filter besitzt, die nur Licht einer definierten Wellenlänge durchlassen, detektieren. Bei der indirekten IFM werden bestimmte Regionen einzelner Proteine (Antigene) von spezifischen Antikörpern (primär) erkannt. Diese können wiederum durch einen sekundären Antikörper, der ein Fluorophor trägt, gezielt gebunden und somit das gesuchte Protein detektiert werden. Vorteil der Verwendung von zwei Antikörpern, ist ein intensiveres Signal, da mehrere sekundäre Antikörper einen primären erkennen können, was das Fluoreszenzsignal verstärkt (s. Abbildung 3-2) (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006).

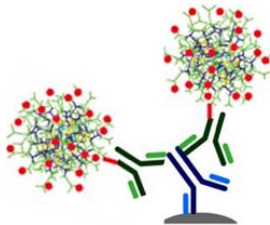


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz:

Dabei bindet der Y-förmige Primärantikörper (blau) mit seiner variablen und Antigen-spezifischen Region an das gesuchte Protein (grau). Dieser wird dann von mehreren sekundären Antikörpern (grün), die mit einem Fluorophor (rot) verbunden sind, an seiner konstanten Region spezifisch erkannt und gebunden (Bild übernommen von (Lorat, Y., 2012)).

Die getrockneten Schnitte (aus 3.2.4) wurden für 3 x 7 min in Xylol eingelegt (unter dem Abzug) und dabei das Paraffin entfernt. Gleichzeitig wurde die spätere Pufferlösung zum Demaskieren der Antigenbindungsstellen, die durch das Paraffin vielleicht vernetzt wurden (Retrieval-Lösung), angesetzt (270 ml dH<sub>2</sub>O + 30 ml 10-fach Retrieval-Lösung) und im Wasserbad auf 95°C erwärmt. Die Objektträger wurden dann aus dem Xylol in 100%-igen Alkohol überführt und 3 min auf dem Magnetrührer inkubiert. Danach wurden die Proben 3 min in jeder Alkoholstufe der absteigenden Alkoholreihe (95, 90, 80, 70%) inkubiert und zum Schluss kurz in dH<sub>2</sub>O geschwenkt, um die Gewebeschnitte zu bewässern. Nach der Alkoholreihe wurden die Proben in die Retrieval-Lösung überführt und 1 h bei 95°C gekocht. Die Lösung mit den inkubierten Proben wurde dann für ca. 10 min bei RT abgekühlt, um die Schnitte anschließend in dH<sub>2</sub>O zu schwenken und in PBS mit 1% Ziegen-Serum (PBS/NS) für 1 h bei RT zu blocken. Danach wurden die Schnitte mit dem primären Antikörper



verdünnt in PBS/NS in einer Feuchtkammer inkubiert (Bedingungen s. Tabelle 3). Anschließend wurden die Schnitte 3 x 10 min in PBS auf dem Magnetrührer gewaschen, wobei nach jeweils 10 min die PBS Lösung ausgetauscht wurde. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten im Dunkeln. Die sekundären Antikörper wurden 1:400 mit PBS/NS verdünnt, die Objektträger mit jeweils 200 µl der Lösung bedeckt und anschließend 1 h bei RT in einer Feuchtkammer inkubiert. Nachfolgend wurden die Schnitte wieder 3 x 10 min in PBS gewaschen. Dann wurden die Schnitte kurz getrocknet, mittels Einbettmedium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, unter einem Deckglas eingedeckt und bei 4°C getrocknet.

## 3.2.6 IMMUNHISTOCHEMIE

In der Immunhistochemie (IHC) werden wie in der IFM auch Antikörper verwendet, die hierbei aber kein spezifisches Fluorochrom, sondern Biotin tragen. Dieses Biotin wird von einem Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex irreversibel über Avidin gebunden. Nach dieser Bindung wird durch Zugabe des Substrats 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) eine chemische Reaktion mit der gebundenen HRP induziert, die ein unlösliches, braunes Präzipitat hervorbringt, das lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Ein Vorteil dieser Methode ist eine hohe Sensitivität, da an ein Avidin vier Biotin-Moleküle binden können. Zusätzlich dazu können an einen Primäantikörper mehrere Biotin gekoppelte Sekundäantikörper binden, wodurch sich aus einem Antigen ein sehr großer Komplex ergibt, der sehr gut detektierbar ist (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006).

Die getrockneten Schnitte (aus 3.2.4) wurden bis nach der Demaskierung der Antigenstruktur, unter Zuhilfenahme der Retrieval-Lösung, wie in 3.2.5 behandelt. Nachfolgend wurden die Schnitte zum Abblocken der endogenen Peroxidase mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75 ml dH<sub>2</sub>O und 3 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) für 25 min bei RT behandelt. Danach wurden die Schnitte mit Leitungswasser abgespült und kurz in PBS geschwenkt. Nach dem Abblocken unspezifischer Bindungen durch eine Inkubation in PBS/NS für 1 h wurden die Schnitte mit primärem Antikörper und anschließend mit Sekundäantikörper für 1 h inkubiert. Nach allen Inkubationszeiten mit Antikörpern wurden die Schnitte 2 x 5 min in PBS auf dem Magnetrührer gewaschen. Während der Inkubationszeit des sekundären Antikörpers musste schon der ABC-Komplex angesetzt werden. Dafür wurden 2 Tropfen Lösung A (Avidin Lösung; ABC-Kit, VECTOR laboratories) und 2 Tropfen Lösung B (Biotinylierte Meerrettich Peroxidase H; ABC-Kit, VECTOR laboratories) in 10 ml PBS gemischt und 30 min bei RT (dunkel) inkubiert. 200 µl dieser Lösung wurden nach dem sekundären Antikörper auf jeden Objektträger aufgetragen und für 30 min bei RT in der Feuchtkammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte 2 x 5 min in PBS gewaschen und 2 bis 10 min, je nach Antigen, mit dem



DAB-Reagenz (angesetzt entsprechend den Herstellerangaben) detektiert. Der Transfer der Schnitte ins PBS erfolgte abhängig vom Bräunungsgrad der Schnitte. Anschließend wurden die Zellkerne der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin gegengefärbt. Dafür wurden die Schnitte 45 sec in Hämatoxylin inkubiert und dann in dH<sub>2</sub>O überführt. Die Färbung erfolgte aber erst durch die Inkubation der Schnitte unter fließendem Leitungswasser für ca. 1 min. Zum Schluss wurden die Schnitte noch kurz getrocknet und dann mit wässrigem Eindeckmedium versiegelt.

### 3.2.7 *IN VIVO* FLUORESZENZ-*IN-SITU*-HYBRIDISIERUNG IMMUN-FLUORESZENZ DOPPELFÄRBUNG

Bei der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) kann eine einzelsträngige DNA-Sequenz, die spezifisch für eine bestimmte genomische Region ist und ein direkt gekoppeltes Fluorophor trägt, dazu genutzt werden, komplementäre DNA-Sequenzen im Genom sichtbar zu machen (Lottspeich, et al., 2006). Um die repetitive Telomersequenz insbesondere in Formalin fixierten Paraffinschnitten zu detektieren, ist eine spezifische und hochstabile Telomerprobe erforderlich. Um eine spezifische Hybridisierung der Telomerprobe an das fixierte Chromatin zu gewährleisten, muss eine starke Denaturierung erfolgen. Zudem sollte in unserem Fall anschließend noch eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt werden, was eine noch höhere Affinität der Probe zur Zielsequenz erfordert. Aus diesem Grund wurde eine synthetische (englisch: peptide nucleic acid; PNA) DNA Probe verwendet. Dabei ist das Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine Polyamidkette ersetzt, was eine höhere Affinität und Spezifität der Bindung ermöglicht (Cambridge Research Biochemicals). Somit wurde das verwendete Protokoll auf der Grundlage des vom Hersteller empfohlenen Protokolls (Panagene), in Kombination mit Protokollen für Paraffin eingebettete Gewebeschnitte (TelomerePNA FISH kit, DAKO; (Kronic, D., et al., 2009)), etabliert.

Die getrockneten Schnitte (aus 3.2.4) wurden bis nach der Demaskierung der Antigenstruktur, unter Zuhilfenahme der Retrieval-Lösung, wie in 3.2.5 behandelt. Danach wurden die Schnitte 2 x 3 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen, kurz in 96% Ethanol getaucht und anschließend an der Luft getrocknet. Danach wurde die Telomerprobe (67 µg/ml) in Hybridisierungspuffer (HP) (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 10 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7.5), 70% Formamid) auf 800 ng/ml verdünnt. Auf jeden Schnitt wurden jeweils 15 µl der Telomerprobe pipettiert, einzeln mit kleinen Deckgläsern abdeckt und für genau 3 min bei 80°C in einer Feuchtkammer im Wasserbad denaturiert. Danach erfolgte über 2 h bei 37°C (ohne Licht) das Hybridisieren im Brutschrank. Dann wurden die Objektträger 2 x 20 min bei RT mit Puffer1 (70% Formamid, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2)), 1 min bei RT in PBS, 5 min bei 55°C in 0.1 x SSC-Puffer auf dem Heizrührer und zum Schluss nochmal 2 x 5 min bei RT mit



PBS + 0.05% Tween-20 gewaschen. Nach einem kurzen Schwenken in dH<sub>2</sub>O startete die anschließende Fluoreszenzfärbung mit einer 30 minütigen Inkubation (RT) in einem Blockierungs-Puffer (3% Immunoblock, 0.1% Triton X-100, 0.05% Tween-20, 0.05% NaN<sub>3</sub> in PBS). Nachfolgend wurde der verwendete Primäantikörper (anti-53BP1) 1.5 h bei RT oder ü. N. bei 4°C inkubiert. Der nachfolgende Prozess ist mit dem Ablauf in 3.2.5 identisch.

### 3.2.8 AUSWERTUNG AM HELLFELD- BZW. FLUORESZENZMIKROSKOP

Die Hellfeldmikroskopie ermöglicht eine möglichst objektgetreue Vergrößerung des verwendeten Präparates. Da aber transparente Präparate mit wenig Kontrast sehr schlecht abgebildet werden können, muss hierfür eine Gegenfärbung erfolgen. Die Lichtquelle ist hierbei eine Glühlampe, die meist unter dem Präparat sitzt (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006). Aufnahmen und Auswertungen der Seneszenz-Untersuchungen (3.2.3) wurden unter Hellfeldeinstellungen am Nikon Mikroskop durchgeführt. Dabei wurde zur Detektion von CD34/Sa-β-Gal doppelpositiven HFSCs jeweils das gesamte Präparat von drei biologischen Replikaten untersucht. Zur Quantifizierung der Seneszenz wurden in jungen (2 Monate), alten (24 Monate) und fraktioniert bestrahlten Hautproben (50 x 10 mGy, 72 h) 300 CD34-positive HFSCs sowie 500 Keratinozyten auf ihre SA-β-Gal-Färbung hin untersucht. Zur Erstellung des seneszenten Indexes wurde die Zahl der positiven Zellen durch die Gesamtzahl aller untersuchten Zellen geteilt und aus drei biologischen Replikaten der Mittelwert und der Standardfehler berechnet.

In der Fluoreszenzmikroskopie benötigt man im Gegensatz dazu eine sehr starke Lichtquelle, z.B. eine Quecksilber-Hochdrucklampe, die ein breites Spektrum an Wellenlängen erzeugt. Von diesem großen Spektrum werden aber nur die Wellenlängen vom Anregungsfilter durchgelassen, die für die Anregung des gewählten Fluorophors erforderlich sind. Dieses Spektrum wird dann vom dichroischen Spiegel durch das Objektiv und auf das Präparat geleitet. Durch die Anregung emittiert das Fluorophor Licht einer höheren Wellenlänge, das dann wieder durch Objektiv, Spiegel und Emissionsfilter zum Betrachter gelangt (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006). Die Auswertung der in 3.2.5 und 3.2.7 angefertigten Färbungen erfolgte dabei an einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Nikon. Dabei wurden für die Immunfluoreszenzuntersuchungen mindestens 40 Foci und/oder 40 Zellen ausgewertet. Das bedeutet, dass bei Präparaten, bei denen jede Zelle mindestens einen Fokus enthält mindestens 40 Zellen gezählt wurden. Bei Präparaten, bei denen nicht jede Zelle einen Fokus aufweist, mussten so viele Zellen untersucht werden, bis 40 Foci in Summe gezählt wurden. Bei den Telomer Untersuchungen wurden Aufnahmen am konfokalen Mikroskop gemacht, während die Auswertungen am Fluoreszenzmikroskop durchgeführt wurden. Dabei wurden jeweils 50 53BP1-Foci auf ihre Kolokalisation mit der

Telomerprobe hin untersucht. Bei allen Untersuchungen wurden mindestens drei biologische Replikate für die Auswertung herangezogen. Zur Quantifizierung der Apoptose wurden in jungen (2 Monate), alten (24 Monate) und fraktioniert bestrahlten Hautproben (50 x 10 mGy, 72 h) 300 CD34-positive HFSCs sowie 500 Keratinozyten auf ihre Caspase-3 Färbungen hin untersucht. Zur Erstellung des apoptotischen Indexes wurde die Zahl der positiven Zellen durch die Gesamtzahl aller untersuchten Zellen geteilt und aus drei biologischen Replikaten der Mittelwert und der Standardfehler berechnet.

### 3.2.9 TRANSMISSIONS-ELEKTRONEN-MIKROSKOPIE

In der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM) kann durch die Unabhängigkeit von der Wellenlänge des Lichtes das Auflösungsvermögen im Vergleich zur Lichtmikroskopie um ein Vielfaches gesteigert werden. Dabei können organische Moleküle bis zu einer Größe von 0.2 nm aufgelöst werden.

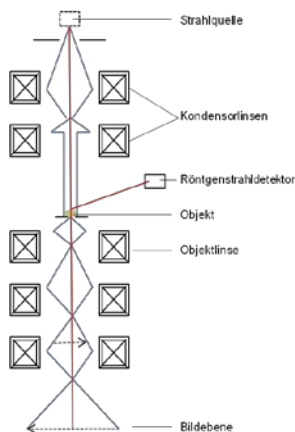


Abbildung 3-3: Schematischer Aufbau des Transmissions-Elektronen-Mikroskops: Das Mikroskop besteht aus einer Strahlenquelle, von der aus Elektronen beschleunigt werden, die mit Hilfe von magnetischen Linsen so gebündelt werden, dass ein scharfes und um ein Vielfaches vergrößertes Abbild des zu untersuchenden Objektes entsteht (Vorlage des Bildes aus (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006)).

Dieses Mikroskopieverfahren arbeitet nicht mit einer Glühbirne als Strahlenquelle, sondern nutzt einen LaB6-Kristall, von dem durch elektrische Aufheizung Elektronen zu einer Anode hin beschleunigt werden. Der restliche Aufbau ist einem Lichtmikroskop sehr ähnlich. Dabei wird auch hier der Strahl durch Linsen, magnetische Linsen, fokussiert und durchstrahlt das Präparat, wonach dann das vergrößerte Abbild entsteht. Im Unterschied zum Lichtmikroskop müssen das Objekt sowie der gesamte Strahlengang in einem Hochvakuum vorliegen, da nur so die Interaktion der Elektronen mit Luftmolekülen reduziert und die Auflösung stark vergrößert werden kann. Um biologische Präparate, wie z.B. Gewebe, im TEM untersuchen zu können, ist aufgrund des Hochvakuums eine Stabilisierung der Probe durch die Einbettung in ein Resinharz nötig. Die Elektronen können das Präparat nur durchdringen, wenn es sehr dünn ist, deshalb müssen Ultradünnschnitte der eingebetteten Proben (ca. 80 nm) angefertigt werden (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006).

Um einzelne Proteine auf diesen Gewebeschnitten detektieren zu können, wird auch hier eine Immunfärbung verwendet, die im TEM analysiert wird. Der Unterschied zur indirekten IFM besteht im Wesentlichen im verwendeten Sekundärantikörper.

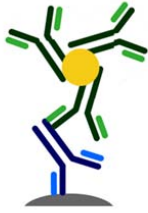


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Immunogoldfärbung:

Dabei bindet der Y-förmige Primärantikörper (blau) mit seiner variablen und Antigen-spezifischen Region an das gesuchte Protein (grau). Dieser wird dann von einem der Antikörper (grün), die mit dem Goldpartikel verbunden sind, an seiner konstanten Region spezifisch erkannt und gebunden (Bild übernommen von (Lorat, Y., 2012)).

Bei der Immunfärbung fürs TEM trägt der Sekundärantikörper kein Fluorophor, da dieser im TEM nicht nachweisbar wäre, sondern einen Goldpartikel einer definierten Größe, der mehrere sekundäre Antikörper an sich befestigt hat (s. Abbildung 3-4), Immunogoldfärbung. Diese Tatsache ermöglicht es bei Quantifizierungen einem Antigen genau einen Goldpartikel zuzuordnen. Außerdem sind auch hier Doppelfärbungen möglich, wobei nicht unterschiedlich farbige Fluorophore, sondern unterschiedlich große Goldpartikel verwendet werden (6 und 10 nm).

### 3.2.9.1 LR-GOLD EINBETTUNG

Entnommene Gewebeproben wurden sofort in der Fixierlösung (2% Paraformaldehyd, 0.05% Glutaraldehyd, 1% PBS) für mindestens 12 h inkubiert. Danach wurden die Gewebeproben in ein 0.5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Darauffolgend wurden die Proben in einer steigenden Alkoholreihe entwässert. Dabei durchliefen sie die folgenden Stufen:

30% EtOH, 15 min bei 4°C

50% EtOH, 15 min bei 4°C

50% EtOH, 30 min bei -20°C

70% EtOH, 30 min bei -20°C

80% EtOH, 30 min bei -20°C

90% EtOH, 60 min bei -20°C

99% EtOH, 3 x 30 min bei -20°C

Daraufhin wurden die Proben mit steigenden LR-Gold Konzentrationen infiltriert:

30% LR-Gold in 99% Ethanol 30 min bei -20°C

50% LR-Gold in 99% Ethanol 60 min bei -20°C

70% LR-Gold in 99% Ethanol 60 min bei -20°C

Pures LR-Gold 60 min bei -20°C

LR-Gold + 0.1% Benzil, ü. N. bei -20°C

Am nächsten Tag wurde die LR-Gold + 0.1% Benzil-Lösung nochmals erneuert und das 0.5 ml Reaktionsgefäß gefüllt, dass so wenig Sauerstoff wie möglich im Reaktionsgefäß verblieb. Der verbleibende Sauerstoff würde das Auspolymerisieren des Benzils verhindern. Zum Auspolymerisieren wurden die Proben über Nacht in einer -20°C UV-Box gelagert.



## 3.2.9.2 SEKTIONIEREN VON GEWEBESCHNITTEN

Die in LR-Gold-Benzil-Lösung konservierten Hautproben mussten für das nachfolgende Sektionieren zuerst, unter Verwendung einer Rasierklinge, in eine Trapezform getrimmt werden. Danach konnte die Probe unter Verwendung eines Diamantmessers in 75-80 nm dicke Schnitte sektioniert werden. Das Trimmen der Probe sowie das anschließende Anfertigen von sehr dünnen Schnitten erfolgten an einem Ultra-Mikrotom. Die erzeugten Schnitte wurden im Weiteren von der Wasseroberfläche der mit Wasser gefüllten Wanne des Ultra-Mikrotoms auf den 2 x 1 mm großen Pioloformfilm eines Nickel Trägermaterials (Grid) übertragen und getrocknet.

## 3.2.9.3 IMMUNOGOLDFÄRBUNG

Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte auf einem Tropfen (30 µl) der jeweils verwendeten Lösung, der auf Parafilm in einer Feuchtkammer pipettiert wurde. Als erstes wurden Aldehydgruppen durch eine 20 minütige Inkubation auf einer Glyzin-Lösung (50 mM Glyzin in PBS, pH 7.4) abgesättigt. Danach wurden die Gewebeschnitte 30 min auf einer Block-Lösung inkubiert, was weitere unspezifische Bindungen abblockt. Bevor die Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper inkubiert wurden, mussten sie 3 x 5 min mit Inkubationspuffer (0.1% BSA-c in PBS, pH 7.4 (mit 1 M HCl)) gewaschen werden. Dabei wurde der Grid alle 5 min mit der Gewebeseite auf einen neuen Tropfen Inkubationspuffer gelegt. Die verwendeten Antikörper wurden wie in Tabelle 3 angegeben in Inkubationspuffer verdünnt und die Grids ü. N. oder bei einer Doppelfärbung auch 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Gewebeschnitte 6 x 5 min mit Inkubationspuffer gewaschen und für 1 h bei RT auf den 1:30 verdünnten, Gold-markierten Sekundärantikörpern (s. Tabelle 4) inkubiert. Danach wurde wieder 6 x 5 min mit Inkubationspuffer und 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Färbung durch die 30 minütige Inkubation auf 2% Glutaraldehyd in PBS fixiert. Um bei der Auswertung die Goldbeads Regionen mit viel DNA auf kleinem Raum (Heterochromatin) oder mit wenig DNA (Euchromatin) zuordnen zu können, wurden anschließend die DNA und die Proteine der Gewebeproben kontrastiert. Dafür wurden die Grids für 2 min bei RT auf Uranylacetat inkubiert, kurz auf einem Tropfen dH<sub>2</sub>O abgespült und dann mit einem fussselfreien Tuch trocken getupft. Bei einer Doppelfärbung wurde nach dem Waschvorgang infolge des Sekundärantikörpers der zweite Primärantikörper verwendet und die Färbung entsprechend wiederholt.

## 3.2.9.4 AUSWERTUNG AM TRANSMISSIONS-ELEKTRONEN-MIKROSKOP

Für die Auswertung wurden 3 x 50 Zellkernanschnitte von HFSCs ausgewertet. Dabei wurden die 53BP1 bzw. pKu70 Beads und Cluster mit der Zahl der zugehörigen Beads, sowie die Zugehörigkeit zu Eu- (hell) bzw. Heterochromatin (dunkel) dokumentiert. Die



quantitative Auswertung wurde für HFSCs von jungen (3 Monate) und alten (24 Monate) unbestrahlten C57BL/6 Mäusen durchgeführt. Für die statistische Auswertbarkeit wurden jeweils drei biologische Replikate herangezogen.

## 3.2.10 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNG

Die Durchflusszytometrie ist eine elegante Methode, um einzelne Zellpopulationen, die sich aufgrund von bestimmten Eigenschaften unterscheiden, in einem Gemisch zu identifizieren und das Vorkommen von bestimmten intrazellulären Proteinen zu quantifizieren. Der Durchflusszytometer besteht zum einen aus einer Vibrationskammer, die aus dem Zellgemisch kleinste Tropfen generiert – die nur eine Zelle enthalten – sowie aus einer Messeinheit, in der die Einzelzellen an einem Laser vorbeigeführt werden. Dieser Laser kann Größe und Granularität durch das vorwärts Streulicht (englisch: forward scatter; FSC) und das seitwärts Streulicht (englisch: sideways scatter; SSC) bestimmen (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006). Zudem werden durch den Laser Fluorophore angeregt, die in einer vorherigen Immunfärbung bestimmte Oberflächenantigene und intrazelluläre Zielantigene anfärben. Die Emission aller verwendeten Fluorophore sowie der FSC und SSC werden für jede Zelle detektiert und die Daten gespeichert. Somit können je nach angewähltem x und y Parameter (z.B. FSC-SSC) die Zellen als einzelne Punkte in Punktwolken dargestellt werden, um einzelne Zellpopulationen einzugrenzen und anschließend weiterführend zu analysieren. Die Herstellung der Einzelzellsuspension sowie die Markierung der Stammzellen für die Durchflusszytometrie wurden auf Grundlage des Protokolls von Nowak, und Fuchs etabliert (Nowak, J. A. und Fuchs, E., 2009). Die zusätzliche intranukleäre Färbung für verschiedene Antikörper (s. Tabelle 3) wurde ohne zu Grunde liegendes Protokoll selbst etabliert und optimiert.

### 3.2.10.1 HERSTELLUNG EINER EINZELZELLSUSPENSION AUS DER MURINEN EPIDERMIS

Die aus 3.2.2 entnommenen Hautstücke wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit einer 1%-igen Penicillin/Streptomycin-Lösung überführt, kurz gewaschen und dann unter die Sterilbank transportiert. Anschließend wurde die Haut zur Entfernung von Fett und Blutgefäßen mit der Epidermis nach unten auf eine Kühlplatte gespannt und vorsichtig mit dem senkrecht gehaltenen Skalpell abgeschabt. Dies erfolgte so lange, bis die Haut stumpf und transparent aussah. Dabei ist es wichtig nicht zu stark zu drücken, damit die Stammzellpopulation, die tief in der Dermis liegt, nicht zerstört wird. Nachdem das restliche Fettgewebe mit den Blutgefäßen entfernt war, konnten alle Hautstücke in einer Petrischale (ø 9 cm) schwimmend mit der Epidermis nach oben auf 10 ml PBS gelagert werden, bis alle Stücke fertig präpariert waren. Um im Folgenden die Dermis von der Epidermis abzutrennen,





musste darauf geachtet werden, dass die Epidermis völlig trocken blieb, da sonst auch Zellen der Epidermis abgelöst werden. Danach wurde das PBS entfernt, durch 10 ml Dispase (1 mg/ml) ersetzt und die Haut bei 4°C ü. N. inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Dispase verworfen und die Haut mit 10 ml PBS gespült. Dann wurden 10 ml einer 0.25%-igen Trypsinlösung (verdünnt in PBS) eingefüllt und die Haut wieder schwimmend für 20 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Haut mit der Epidermis nach oben auf den Deckel der Petrischale gelegt, eine Ecke der Dermis durch eine Pinzette festgehalten und gleichzeitig mit dem Skalpell durch leichten Druck die Epidermis von der Dermis abgeschabt. Die Dermis wurde verworfen und die Stücke der Epidermis in der Trypsinlösung unter Verwendung des Skalpells zerkleinert. Danach wurden sie in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einer 10 ml Pipette (abgeschnittene Spitze) so lange gemischt, bis eine homogene Lösung entstand. Dabei wurde das Reaktionsgefäß immer auf Eis gehalten. Die Lösung wurde dann durch ein Zellnetz mit einer Porengröße von 70 µm gesiebt und durch 20 ml des kalten DMEM-F12 Kulturmediums mit Chelex-behandeltem FBS (2%) gespült, was auch das Trypsin abstoppte. Die Zellsuspension wurde anschließend über ein Zellnetz der Porengröße 40 µm gestrichen, wieder durch 20 ml des kalten DMEM-F12 Kulturmediums mit Chelex-behandeltem FBS (2%) gespült und anschließend in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellsuspension wurde danach in der vorgekühlten Zentrifuge 10 min bei 350 g (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 5 ml des kalten Färbepuffers (1 ml Chelex-behandeltes Kälberserum + 49 ml steriles PBS) resuspendiert und 10 min bei 200 g (4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 1 ml Färbepuffer aufgenommen und über ein Zellnetz der Porengröße 5 µm in ein Rundbodengefäß überführt.

### 3.2.10.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE DREIFACHFÄRBUNG

Dafür wurden ca.  $1 \times 10^6$  frisch isolierte und vitale Zellen pro Ansatz verwendet. Die verwendete Zellzahl wurde in vielen Voruntersuchungen am Durchflusszytometer eingestellt und festgelegt. Die Zellen wurden in einem Rundbodengefäß mit dem CD34 Antikörper (Verdünnung s. Tabelle 3) 30 min bei 4°C inkubiert, wobei die Zellen alle 10 min invertiert wurden. Nachfolgend wurde ca. 500 µl Färbepuffer zugegeben und die Zellen für 10 min bei 300 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden erneut gewaschen. Danach wurde das Pellet in 100 µl Färbepuffer aufgenommen und der anti-Ratte-APC Antikörper zugegeben (Verdünnung s. Tabelle 4). Dieser Antikörper wurde auch 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit Färbepuffer gewaschen. Nach den zwei Waschschrritten wurden die Zellen für die intrazelluläre Färbung vorbereitet. Dafür wurden die Zellen 15 min bei RT in 0.5%-igem Formaldehyd fixiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zelle unter Verwendung von 0.1% Triton X-100/1% BSA in PBS



für 15 min und 0.5% Triton X-100 für 5 min bei RT. Anschließend wurden die zu untersuchenden Antikörper (Verdünnungen s. Tabelle 3) in 0.1%-igem Triton X-100 mit 1% BSA in PBS verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert (alle 10 min invertiert, damit sich die Zellen nicht absetzen). Nach zwei Waschschritten, bei denen die Zellen mit 500 µl 0.1%-igem Triton X-100/1% BSA in PBS aufgefüllt und bei 300 g abzentrifugiert wurden, wurde der spezifische Sekundärantikörper, der mit APC-Cy7 gekoppelt ist (Verdünnung s. Tabelle 4), in 0.1%-igem Triton X-100/1% BSA in PBS verdünnt und für 1 h bei RT mit den Zellen inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen wieder zweimal gewaschen wonach eine weitere extrazelluläre Färbung mit einem  $\alpha 6$  Integrin-FITC Antikörper erfolgte. Dabei wurde das Zellpellet in 100 µl Färbepuffer gelöst, der Antikörper (Verdünnung s. Tabelle 3) zugegeben, die Zellen erneut für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal gewaschen.

### 3.2.10.3 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE

Für die Analyse wurden die einzelnen Proben nach der letzten Waschung mit 300 µl Färbepuffer aufgenommen und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Um eine Auswertung zu ermöglichen, wurden zuvor die zu untersuchenden Parameter, die einzelnen Fluoreszenzen, etabliert. Dafür wurden zuerst ungefärbte Zellen verwendet, mit deren Hilfe der Detektionsbereich des FSC und SSC festgelegt wurde. Nachdem die zu untersuchende Zellpopulation festgelegt war, wurden Einzelfärbungen für jede Fluoreszenz durchgeführt und die Spannung des Anregungslasers so eingestellt, dass der Detektionsbereich alle zu untersuchenden Zellen, d.h. für diesen Fluoreszenzmarker positive wie auch negative Zellen, einschließt. Darauffolgend wurden alle verwendeten Fluoreszenzen (FITC; APC; APC-Cy7) aufeinander kompensiert. Diese rechnerische Abschwächung oder Verstärkung der einzelnen Kanäle wurde aufgrund der natürlichen Überlappung der einzelnen Fluoreszenzspektren nötig (s. Abbildung 3-5) (Becton Dickinson and Company, 2012). Die Überlappung ist insbesondere zwischen den Spektren der Fluorophore APC und APC-Cy7 zu erkennen.

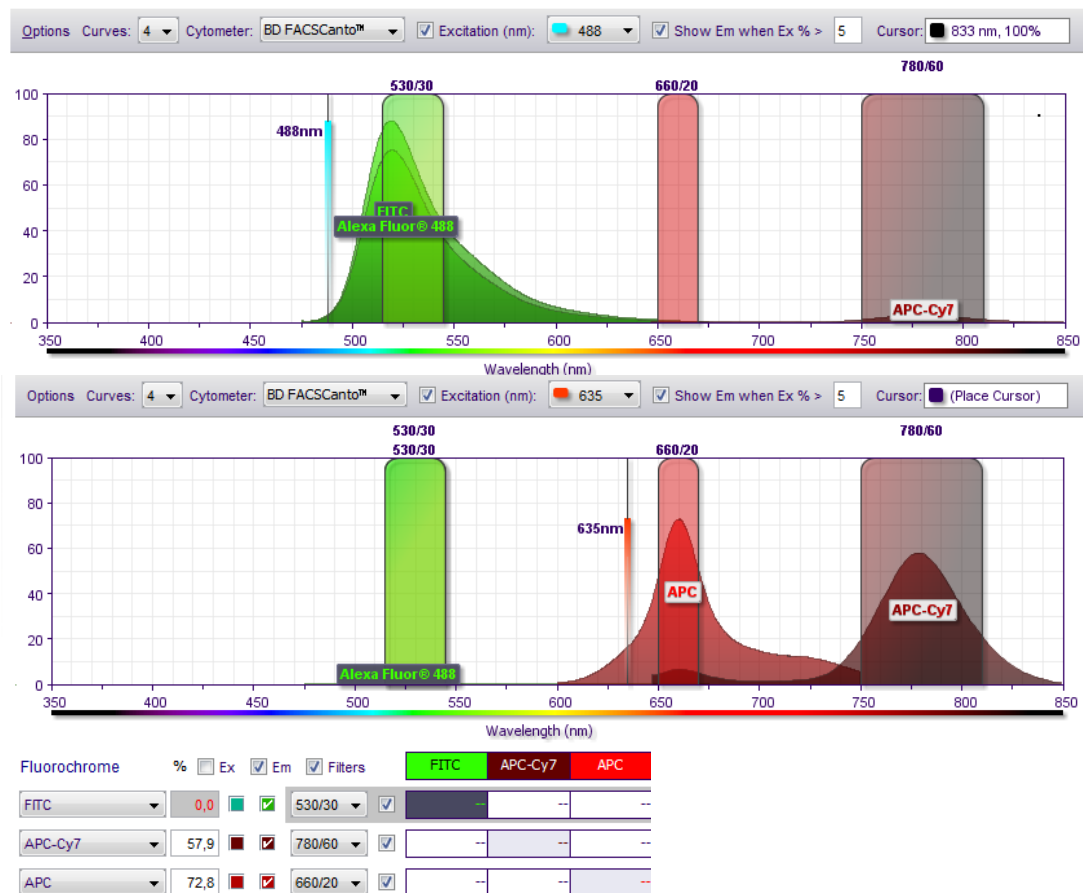


Abbildung 3-5: Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe:

Dabei sind in der oberen Abbildung die Emissionsspektren nach Anregung mit dem Laser 488 und im unteren Bild mit dem Laser 635 zu erkennen. Dabei zeigt sich, dass zwischen FITC und den beiden APC Farbstoffen kaum eine Überlappung stattfindet, es aber zwischen APC und APC-Cy7 eine geringe Überlappung im APC Kanal gibt (Abbildungen übernommen von (Becton Dickinson and Company, 2012)).

Danach war es möglich, aus dem Zellgemisch, das nach der Isolierung der Epidermiszellen vorliegt, vier unterschiedliche Zellpopulationen anhand ihrer Fluoreszenzen zu unterscheiden.

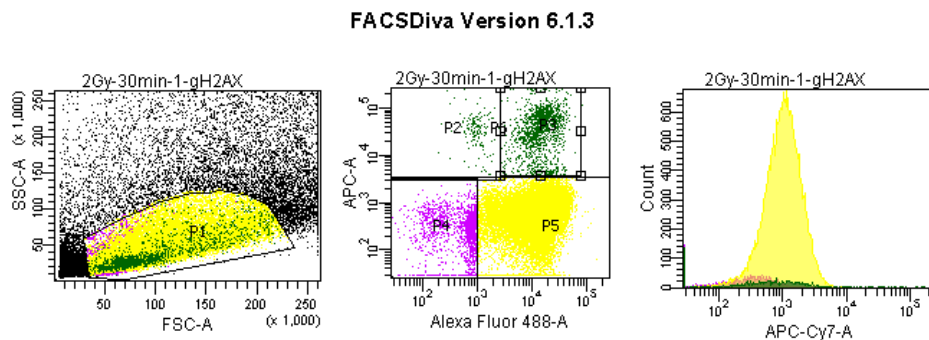


Abbildung 3-6: Beispielhafte durchflusszytometrische Analyse:

Dabei werden zuerst die Zellen der Epidermis anhand von Größe und Granularität eingegrenzt (P1). Danach wird P1 anhand der Stammzellmarker (CD34 (APC-A)/ $\alpha 6$  Integrin (Alexa Fluor 488-A)) in die verschiedenen Populationen aufgetrennt (CD34<sup>+</sup> (P6) und CD34<sup>-</sup> (P4+P5)); sowie CD34<sup>+</sup>  $\alpha 6$ <sup>low</sup> (P2) und CD34<sup>+</sup>  $\alpha 6$ <sup>high</sup> (P3)). Diese verschiedenen Populationen werden dann auf ihre intrazelluläre Fluoreszenzintensität des APC-Cy7 Markers untersucht.



Dabei unterscheidet man differenzierte Zellen (CD34<sup>-</sup>) und zwei Stammzellpopulationen (CD34<sup>+</sup>/α6<sup>-</sup> und CD34<sup>+</sup>/α6<sup>+</sup>) (s. Abbildung 3-6). Durch die zusätzliche interne Färbung (APC-Cy7) konnten nun alle Populationen hinsichtlich bestimmter interner Antigene untersucht werden. Um eine gleichbleibende Auswertbarkeit der Daten zu ermöglichen, wurde bei jeder durchflusszytometrischen Messung darauf geachtet, dass – wenn möglich – mindestens 30000 Zellen in der mittels FSC und SSC definierten Population liegen.

### 3.2.10.4 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE AUSWERTUNG

Dabei wurden von der Diva Software für alle definierten Zellpopulationen der Median der APC-Cy7 Emission, die Zahl der gemessenen Ereignisse jeder Population (events), sowie der prozentuale Anteil jeder Zellpopulationen in Bezug auf alle Epidermiszellen (P1) (% parent) angegeben (s. Tabelle 7).

Tabelle 7: Statistische Auswertung:

Parameter, die von der Auswertesoftware des Durchflusszytometers angegeben werden. Bei den einzelnen Populationen werden die Zahl der gemessenen Events, die prozentuale Verteilung zu P1 sowie die unterschiedlichen Parameter des zu untersuchenden Fluorophors dokumentiert.

Populations	#Events	%Parent	APC-Cy7-A Min	APC-Cy7-A Max	APC-Cy7-A Mean	APC-Cy7-A Median	APC-Cy7 SD
P2	706	0,7	-1923	14926	1013	701	1545
P3	2646	2,7	-1276	19304	1736	1474	1311
P4	6309	6,4	-190	2352	248	121	319
P5	88070	89,8	-233	12779	1063	1009	669
P6	3368	3,4	-1923	19304	1588	1247	1424

All diese Daten wurden aus drei unabhängigen Untersuchungen von 3 Monate alten Kontrollmäusen, 24 Monate alten Mäusen und 20 x 10 mGy bestrahlten Mäusen ermittelt. Der Median der alten, sowie bestrahlten Tiere wurde auf den Median der zugehörigen Kontrollgruppe normiert. Auf diese Weise können die verschiedenen Populationen miteinander verglichen werden. Zudem wurden noch der Mittelwert der Mediane der unabhängigen Versuche, sowie der zugehörige Standardfehler, ermittelt.

### 3.2.11 EXPRESSIONSANALYSE

Zur semiquantitativen Analyse der Transkription verschiedener Gene muss zum einen die RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert werden. Weiterhin muss für eine darauf folgende Analyse mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) die RNA, die sich von DNA anhand einer Base, nämlich dem Uracil, unterscheidet, in die kodierende DNA (cDNA) mittels reverser Transkription umgeschrieben werden. Dieser Vorgang erfolgt unter Zuhilfenahme einer Reversen Transkriptase, die das Umschreiben von RNA in DNA ermöglicht. Dabei sind RNA spezifische Oligonukleotide von ca. 20 bp Länge (Primer) nötig, die die RNA nur spezifisch an den Poly-A-Schwanz der genkodierenden RNA (englisch:



messenger RNA; mRNA) binden, die Oligo(dt)-Primer. Für die nachfolgende genspezifische Analyse der DNA müssen erneut neue, genspezifische Primer und eine DNA-Polymerase eingesetzt werden (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006). Bei der Echtzeit-PCR (englisch; real time PCR; qPCR) erfolgt die Messung der erzeugten Produkte nach jedem Zyklus. Dafür ist in dem PCR-Ansatz ein interkalierender Farbstoff, SYBRGreen, dessen Fluoreszenzintensität nach jedem Zyklus die Menge an Produkt widerspiegelt, enthalten. Für die spätere Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben wird bei jedem PCR Lauf der Schwellenwert-Zyklus (englisch: threshold cycle; Ct-Wert) bestimmt. Dieser sagt aus, in welchem Zyklus zum ersten Mal eine höhere Fluoreszenz, also PCR Produkt, als im Hintergrund gemessen wurde. Dabei ist der Ct-Wert umso kleiner, je mehr Ausgangsmaterial (cDNA des bestimmten Gens) vorgelegen hat. Auf diese Weise ist bei dem Einsatz der gleichen Menge an Gesamt cDNA ein Vergleich zwischen unterschiedlichen Genen möglich. Um zu garantieren, dass die gemessenen Produkte auch spezifisch sind, d.h. keine unspezifischen Primerfehlpaarungen darstellen, durchlaufen die Produkte nach der Amplifikation eine Schmelzkurve. Dabei wird die Temperatur gleichmäßig gesteigert. Da jeder Doppelstrang, je nach Basenzusammensetzung, bei einer bestimmten Temperatur auseinander bricht, und dann das Fluoreszenzsignal abrupt abnimmt, kann somit die Spezifität des Produktes garantiert werden (Lottspeich, F. und Engels, J., 2006; Seyffert, W., *et al.*, 2003). Die Expressionsanalyse von ausgesuchten DNA-Reparaturproteinen, sowie von alterungsspezifischen Genen erfolgte in der Haut von 0.5 Monate alten Kontrollmäusen, 24 Monate alten Mäusen und 50 x 10 mGy bestrahlten Mäusen unter Verwendung von genspezifischen Primern.

### 3.2.11.1 RNA ISOLIERUNG AUS GEWEBE

Die in 3.2.2 entnommenen Gewebeproben wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann im Kryotank bis zur Verwendung gelagert. Für die Isolierung der RNA wurde ein spezifisches RNA Extraktionskit nach dem beigefügten Protokoll für RNA Extraktion aus Gewebe verwendet.

### 3.2.11.2 REVERSE TRANSKRIPTION

Aus der RNA Isolierung (3.2.11.1) wurden jeweils 4-5 µg (gemessen im Nano Drop) der RNA Extraktion zur Erstellung der cDNA unter Verwendung eines Reverse Transkription-Kits eingesetzt. Das Experiment wurde nach Angaben des Herstellers mit Oligo(dt)-Primern durchgeführt.



## 3.2.11.3 REAL-TIME PCR

Die Analyse der in 3.2.11.2 hergestellten cDNA erfolgte unter Verwendung von spezifischen Primern für TP53BP1, PRKDC, XRCC6, BCL2 und ACTB. Primersequenzen übernommen von (Sotiropoulou, P. A., *et al.*, 2010)) (s. Tabelle 8).

Tabelle 8: Untersuchte Gene:

Primersequenz, zugehörige Schmelz- und Anlagerungstemperatur (Metabion)

Gen	Primer	Schmelztemperatur	Anlagerungs-temperatur
<b>TP53BP1</b> (53BP1)	Vorwärts 5'-AGACACTCCTTGCCTGAT-3'	54°C	47°C
	Revers GTTCCGGATTTGATACA	48°C	
<b>ACTB</b> (β-Aktin)	Vorwärts ACCAACTGGGACGATATGGAGAAGA	66°C	60°C
	Revers TACGACCAGAGGCATACAGGGACAA	67°C	
<b>PRKDC</b> (DNA-PKcs)	Vorwärts TGCCGGGGCCAGTTACC	60°C	60°C
	Revers AGGGCTTCTTCTCTACAATCACGA	64°C	
<b>XRCC6</b> (Ku70)	Vorwärts TCCAGCTTGTCTTCTCCCTTATG	65°C	60°C
	Revers AGATCTACCACTTGCTCC	54°C	
<b>BCL2</b> (Bcl-2)	Vorwärts ATGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTG	69°C	60°C
	Revers GGCCAGGCTGAGCAGGGTCTT	70°C	

Dabei wurde die cDNA der unterschiedlichen Proben, unter Verwendung eines SYBR Green PCR Kits, mittels qPCR analysiert. Die Menge an eingesetzter cDNA wurde mittels NanoDrop gemessen, um die PCR Reaktionen später zu vergleichen. Dafür wurde ein 30er PCR Ansatz hergestellt,

<b>15 µl</b>	SyberGreenMix
<b>1.5 µl</b>	Primer (forward)
<b>1.5 µl</b>	Primer (reverse)
<b>2-4 µl</b>	cDNA
<b>ad 30 µl</b>	DEPC Wasser



der danach mit folgendem PCR-Programm mit angefügter Schmelzkurve analysiert wurde.

<b>15 min</b>	94°C	} 40x
<b>15 sec</b>	94°C	
<b>45 sec</b>	Annealingtemp. (s. Tabelle 8)	
<b>1 min</b>	72°C	
∞	4°C	

### 3.2.11.4 AUSWERTUNG

Die Auswertung der zu untersuchenden Gene erfolgte relativ zum Haushaltsgen ACTB ( $\beta$ -Aktin). Das Haushaltsgen dient dabei als Referenzgen, dessen Expressionsanalyse notwendig ist, um zum Beispiel Konzentrationsunterschiede im Untersuchungsmaterial zwischen den Replikaten wieder auszugleichen. Die Expressionsmenge des Zielgens in der Haut infolge von Alterung und Bestrahlung wird relativ zu jungen, unbestrahlten Kontrollen angegeben. Diese relative Quantifizierung der Expressionsanalyse kann aus den gewonnenen  $C_t$ -Werten wie folgt erstellt werden (Livak, K. J. und Schmittgen, T. D., 2001):

$$C_t\text{-Wert (Zielgen)} - C_t\text{-Wert (Haushaltsgen)} = \Delta C_t$$

$$\Delta C_t\text{-Wert (altes oder bestrahltes Gewebe)} - \Delta C_t\text{-Wert (Normalgewebe)} = \Delta \Delta C_t$$

Die Differenz von + oder – 1 eines  $C_t$ -Wertes entspricht dem zweifachen Unterschied in der cDNA Ausgangskonzentration. Die n-fache Expression x wird daher wie folgt berechnet:

$$X = 2^{-\Delta \Delta C_t}$$

Dabei entspricht ein Wert von 1 einer gleich starken Expression im Vergleich zur Kontrolle. Werte >1, zeigen eine Erhöhung, Werte <1 eine Erniedrigung der Zielgenexpression gegenüber der Kontrolle auf. Für die Auswertung werden mindestens drei unabhängige Experimente herangezogen.

### 3.2.12 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten wurden jeweils der Mittelwert sowie der zugehörige Standardfehler von drei bis fünf Tieren pro Datenpunkt berechnet. Die Signifikanz der zu vergleichenden Proben wurde durch den Mann-Whitney Test im OriginPro 8.5G Programm ermittelt. Dabei ist, falls nicht anders angegeben, die Signifikanz mittels \* angezeigt und mit  $p \leq 0.05$  definiert.

## 4 ERGEBNISSE

Der Alterungsprozess der einzelnen Organe, wie z.B. der Haut, und demnach des gesamten Organismus sind stark von dem Alterungsprozess der einzelnen Stammzellpopulationen abhängig. Dieser Umstand beruht auf der Funktion der Stammzellen, die die ständige Erneuerung und auch Heilung der Organe ermöglichen. Der Alterungsprozess der Stammzellen selbst scheint wiederum von intrinsischen Faktoren wie der Anhäufung von DNA-Schäden, die das Überleben und die Funktion der Stammzellen bedingen, beeinflusst zu werden. Daraus könnte geschlossen werden, dass bei verschlechterter Funktion eines Organs die Aktivität oder Anzahl der Stammzellen mit steigendem Alter zurückgeht. Vor diesem Hintergrund ist es das primäre Ziel dieser Arbeit, altersabhängige DNA-Schäden in langlebigen Stammzellen in ihrer physiologischen Nische zu untersuchen.

### 4.1 NACHWEIS VON DNA-SCHÄDEN IN EPIDERMALEN STAMMZELLEN

Zur Analyse von adulten Stammzellen in ihrer physiologischen Nische ist es zunächst von besonderer Bedeutung ein *in vivo* Modellsystem zu wählen, das eine größere Anzahl von identifizierbaren Stammzellen auf engem Raum besitzt, die zudem eine spätere Quantifizierung von nukleären Proteinen erlauben. Aus diesem Grund wurde die murine Haut, in denen die HFSCs in der kompakten bulge Region angesiedelt sind, als Modellsystem ausgewählt. Zur Identifizierung der Stammzellen wurden Immunfärbungen mit einem spezifischen Antikörper gegen das membranständige Glykoprotein CD34 etabliert, die in Kombination mit der definierten Lage der Stammzellen – innerhalb der bulge Region – unterhalb der Talgdrüse eine Identifizierung der HFSCs *in vivo* erlauben (s. Abbildung 4-1).



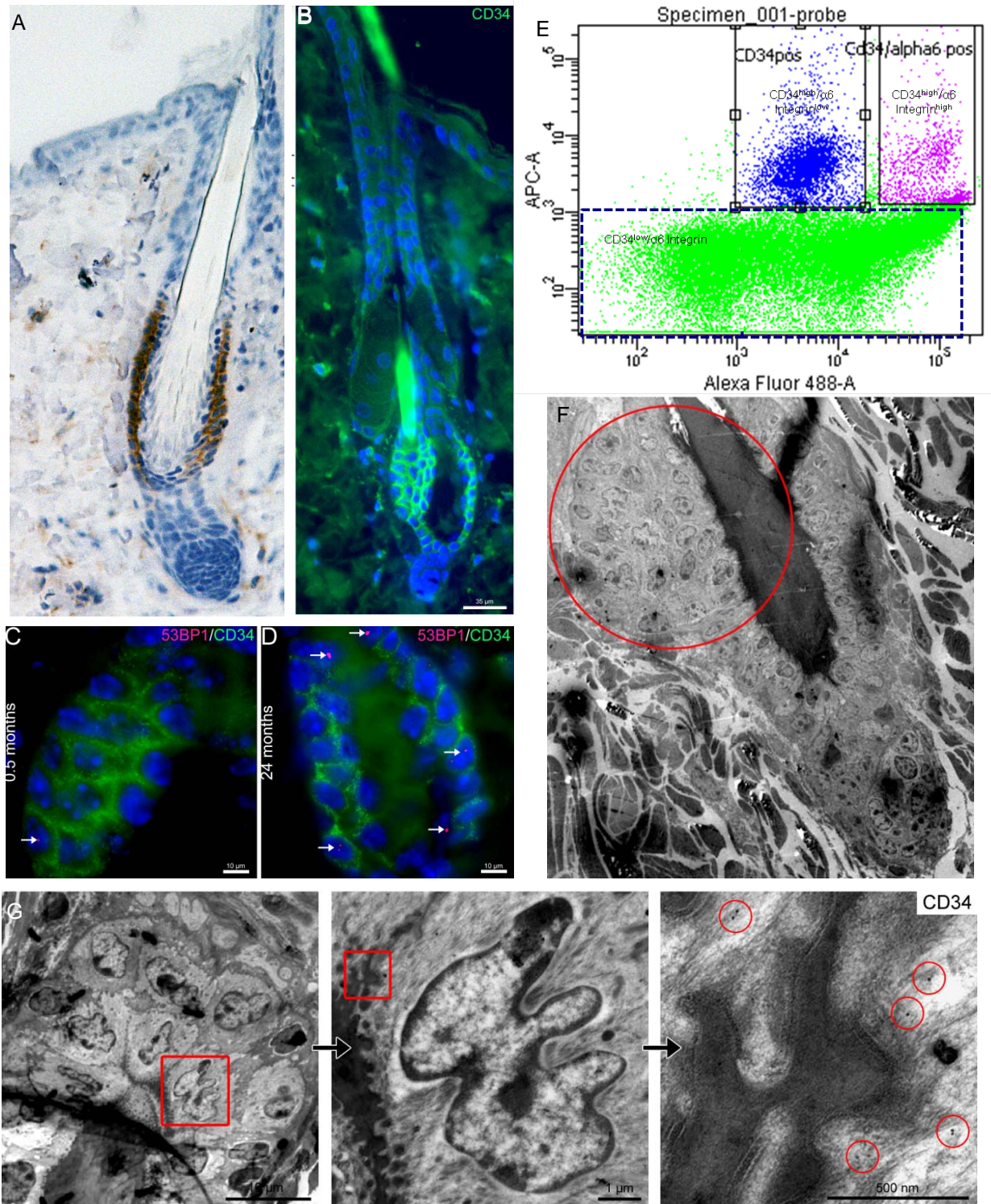


Abbildung 4-1: Identifizierung und Analyse von CD34-positiven Stammzellen:

A+B: Hellfeldaufnahme (A) und Fluoreszenzaufnahme (B) eines CD34 gefärbten Haarfollikels. C+D: Die CD34/53BP1 Immunfluoreszenz Doppelfärbung zeigt eine unterschiedliche Zahl an 53BP1-Foci (rot; weiße Pfeile) in jungen (C) und alten (D), unbestrahlten HFSCs. E: Durchflusszytometrische Charakterisierung der unterschiedlichen epidermalen Zelltypen mittels CD34 (APC-A) und  $\alpha 6$  Integrin (Alexa Fluor 488-A). Dabei zeigen sich zwei Stammzellpopulationen, die sich durch die Expressionsstärke von  $\alpha 6$  Integrin unterscheiden. F: TEM Aufnahme eines Haarfollikels mit bulge Region (roter Kreis). G: TEM Aufnahme einer CD34 Immunofärbung. HFSCs (mittleres Bild), die in der bulge Region angesiedelt sind (linkes Bild) werden durch CD34 Goldbeads an der Zytoplasmamembran identifiziert (rechtes Bild). Rote Kästen sind in nachfolgendem Bild vergrößert dargestellt.

Die Verwendung des CD34 Antikörpers ermöglicht somit die *in vivo* Markierung der Zytoplasmamembran der Stammzellen des Haarfollikels in verschiedenen Mikroskopieverfahren (IHC, IFM, TEM) (A, B, F, G). Dabei wird in Abbildung 4-1A und B deutlich, dass eine große Anzahl an HFSCs kompakt in der Stammzellnische unterhalb der Talgdrüse (B) vorliegt. Des Weiteren wird durch die Verwendung des hochauflösenden TEM die Struktur der bulge Region (F; roter Kreis), sowie der einzelnen Stammzellen (G, mittleres Bild), verdeutlicht. Die HFSCs sind durch ihre irreguläre Zellkernform, die ausgeprägten Zell-Zell-Kontakt (englisch: gap junctions) an der Zytoplasmamembran und insbesondere durch die abgegrenzten hoch kompakten Heterochromatin Bereiche morphologisch charakterisiert (G). Durch einen zweiten epidermalen Marker ( $\alpha 6$  Intergrin), der mit CD34 kombiniert wird, können die HFSCs auch im Durchflusszytometer identifiziert werden (s. Abbildung 4-1E). Bei dieser Charakterisierung sind zunächst die CD34-positiven Stammzellen von den CD34-negativen differenzierten Zellen anhand der CD34 Expression unterscheidbar. Weiterhin können zwei CD34-positive Stammzellpopulationen durch ihre  $\alpha 6$  Integrin Intensität voneinander getrennt werden (CD34-positive,  $\alpha 6$  Integrin gering positive (CD34<sup>+</sup>/  $\alpha 6^{\text{low}}$ ) und CD34-positive  $\alpha 6$  Integrin hoch-positive (CD34<sup>+</sup>/  $\alpha 6^{\text{high}}$ ) Zellen). Zur nachfolgenden *in vivo* Quantifizierung der DNA-Schäden in den HFSCs wird eine immunologische Doppelfärbung aus CD34 und dem DSB Marker 53BP1 herangezogen (s. Abbildung 4-1C, D). Dabei akkumuliert 53BP1 in so großer Zahl um den DNA DSB, dass es lichtmikroskopisch als diskreter Punkt oder Fokus sichtbar gemacht werden kann. Diese 53BP1-Foci (Pfeile) sind in 0.5 (C) und 24 Monate (D) alten CD34-positiven HFSCs nachweisbar. Neben 53BP1 können noch weitere Reparaturproteine, wie  $\gamma$ H2AX, in Foci nachgewiesen werden (s. Abbildung 4-2).

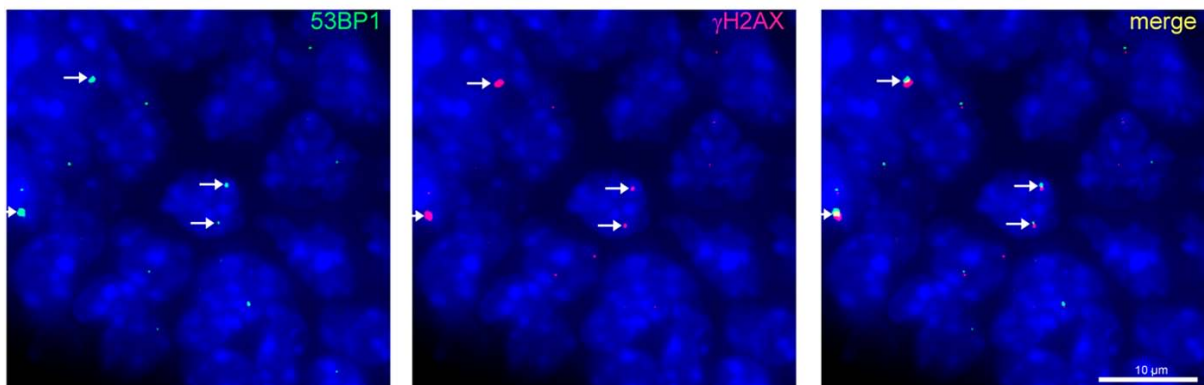


Abbildung 4-2: Kolokalisation von 53BP1 und  $\gamma$ H2AX:

Fluoreszenzaufnahme einer bulge Region, gefärbt mit 53BP1 (grün; linkes Bild) und  $\gamma$ H2AX (rot; mittleres Bild). Dabei zeigt sich bei der Überlagerung (merge) eine teilweise Kolokalisation der 53BP1 und  $\gamma$ H2AX-Foci (weiße Pfeile).

Doppelfärbungen von 53BP1 und  $\gamma$ H2AX in der Immunfluoreszenz zeigen eine Kolokalisation der beiden Foci in den Zellen der bulge Region (weiße Pfeile) (s. Abbildung 4-2). Die

Kolokalisation von 53BP1 mit weiteren Reparaturproteinen unterstützt die Verwendung von 53BP1 als DSB-Marker in den HFSCs. Zudem entspricht laut Literatur ein Fokus einem DSB (Rothkamm, K. und Löbrich, M., 2003), was eine Quantifizierung von DNA-DSBs durch die zahlenmäßige Erfassung von 53BP1-Foci in den HFSCs und differenzierten Keratinozyten ermöglicht. Der Nachweis der DNA-Schäden in den HFSCs und den differenzierten Keratinozyten ermöglicht die Verwendung der murine Haut als *in vivo* Modellsystem für die nachfolgenden altersabhängigen Untersuchungen.

## 4.2 ALTERSABHÄNGIGE AKKUMULATION VON 53BP1-FOCI IN EPIDERMALLEN STAMMZELLEN

Vor dem Hintergrund, dass HFSCs über nahezu die gesamte Lebensspanne einer Maus in ihrer Stammzellnische verbleiben (Morris, R. J. und Potten, C. S., 1999), sollten diese Zellen eine starke Prädisposition für die Anhäufung von endogen induzierten Schäden über die Zeit haben. Um diese Frage zu untersuchen, wurde die Haut von 0.5, 3, 12, 18 und 24 Monate alten reparaturprofizienten C57BL/6 Tieren, sowie von 3 und 12 Monate alten reparaturdefizienten SCID Mäusen, entnommen, asserviert und in 4  $\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte getrimmt. Diese Gewebeschnitte wurden im Anschluss einer 53BP1/CD34 Immunfluoreszenz Doppelfärbung unterzogen und unter einem Fluoreszenzmikroskop per Auge ausgewertet. Zur Quantifizierung wurde die Zahl der 53BP1-positiven HFSCs (CD34<sup>+</sup>) und differenzierten Keratinozyten in Prozent ermittelt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 4-3A dargestellt. Zur näheren Untersuchung der altersabhängigen Akkumulation von 53BP1-Foci wurde eine quantitative durchflusszytometrische Analyse verschiedener – auch phosphorylierter („aktivierter“) – Reparaturproteine herangezogen. Dafür wurde aus der Haut von 3 Monate und 24 Monate alten Mäusen eine Einzelzellsuspension hergestellt, in der unter Verwendung der beiden Stammzellmarker (CD34,  $\alpha 6$  Integrin) die zu untersuchenden Zellpopulationen (CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>/ $\alpha 6^{\text{low}}$ , CD34<sup>+</sup>/ $\alpha 6^{\text{high}}$ ) definiert wurden. Anschließend wurde in den einzelnen Zellpopulationen – anhand einer intranukleären Färbung – die zellspezifische Fluoreszenzintensität der verschiedenen Reparaturproteine gemessen. Zur Quantifizierung wurde der Median der Fluoreszenzintensität der gesamten Zellpopulation in den alten Mäusen auf den der jungen Mäuse normiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 4-3B zu sehen.

# Ergebnisse

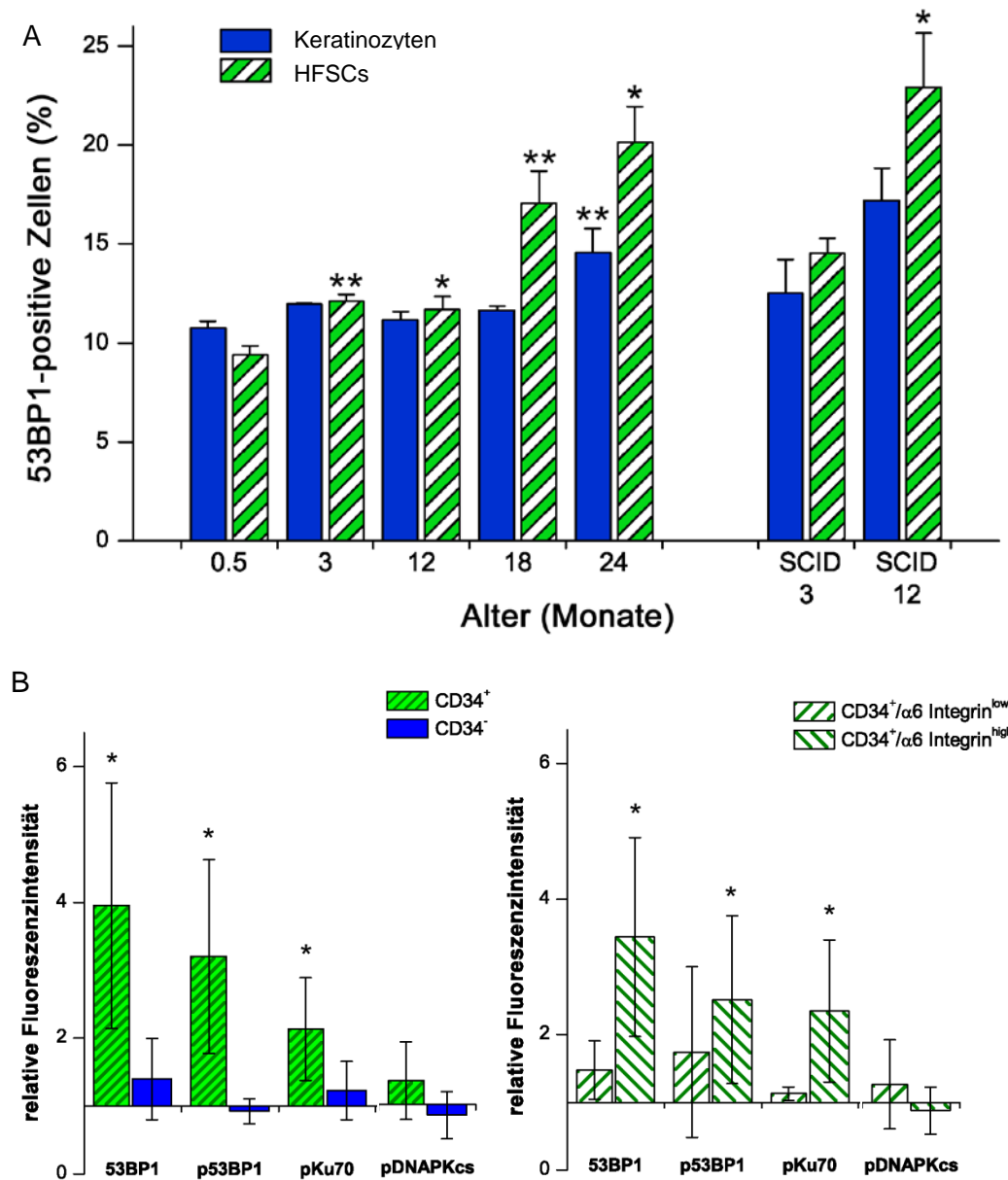


Abbildung 4-3: Altersabhängige Veränderungen in der Anzahl der Reparaturproteine:

A: Fluoreszenzuntersuchung von C57BL/6 und SCID Tieren mit steigendem Alter (0,5, 3, 12, 18 und 24 Monate). Dabei wurden die 53BP1-positiven HFSCs (grün gestreift) im Vergleich zu den Keratinozyten (blau) analysiert. Altersabhängig kommt es in beiden Tieren zu einer Zunahme an 53BP1-positiven Stammzellen. B: Durchflusszytometrische Analyse von verschiedenen Reparaturproteinen des NHEJ. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität der einzelnen Reparaturproteine in 24 Monate alten Tieren auf das Fluoreszenzsignal aus 0,5 Monate alten Kontrollen normiert. Diese Untersuchung konnte für verschiedene Populationen der Epidermis durchgeführt werden. Dabei sind, im Gegensatz zu den CD34<sup>-</sup>-Zellen (blau), 53BP1, p53BP1 und pKu70 in 24 Monate alten CD34<sup>+</sup> (linkes Diagramm) und CD34<sup>+</sup>/α6<sup>high</sup> (rechtes Diagramm) Zellen hochreguliert. \* = signifikant erhöht im Vergleich zur jungen Kontrolle. \*\* = signifikant erhöht im Vergleich zur jüngeren Gruppe.; p ≤ 0,05

In der altersabhängigen Immunfluoreszenz Analyse wurde das Alter der Mäuse der Anzahl an 53BP1-positiven Zellen gegenüber gestellt (s. Abbildung 4-3A). In den reparaturprofizienten C57BL/6 Mäusen und den reparaturdefizienten SCID Mäusen ist mit steigendem

Alter eine Zunahme an 53BP1-positiven HFSCs (grün quergestreift) zu verzeichnen. Das Level an 53BP1-positiven HFSCs nimmt in den C57BL/6 Tieren kontinuierlich von der jüngsten Gruppe – mit den wenigsten 53BP1-Foci (0.5 Monate: 9.41%  $\pm$  0.44%) – über das mittlere Alter bis zu den ältesten Tieren – mit der größten Steigerung (18 Monate: 17.1%  $\pm$  1.6%; 24 Monate: 20.2%  $\pm$  1.8% 53BP1-positive Zellen) – zu. Diese Zunahme ist in den HFSCs der SCID Tiere noch deutlicher ausgeprägt. Im Gegensatz zu den reparaturprofizienten Tieren, weisen die HFSCs der SCID Tiere schon nach 12 Monaten eine signifikant erhöhte Foci-Zahl im Vergleich zur vorherigen Altersgruppe auf (3 Monate: 14.54%  $\pm$  0.74%; 12 Monate: 22.93%  $\pm$  2.74% 53BP1-positive Zellen). In den differenzierten Zellen weisen nur die 24 Monate alten, reparaturprofizienten Keratinozyten eine geringe, aber signifikante Erhöhung an 53BP1-Foci auf. Somit scheint es mit steigendem Alter zu einer kontinuierlichen Zunahme an 53BP1-Foci in HFSCs zu kommen, die durch eine verminderte DNA-Reparatur – aufgrund eines defekten Reparaturproteins – nochmals verstärkt wird. Diese Zunahme der DNA-Schäden wird bei der durchflusszytometrischen Analyse noch verdeutlicht (s. Abbildung 4-3B). In CD34-positiven Zellen ist altersabhängig eine relative Zunahme an 53BP1 (3.95  $\pm$  1.81), p53BP1 (3.20  $\pm$  1.43) und pKu70 (2.14  $\pm$  0.76) – einem zentralen Protein des NHEJ – im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Dem gegenüber weisen die CD34-negativen Zellen keine signifikante Erhöhung an 53BP1 oder einem anderen Reparaturprotein, im Vergleich zur Kontrolle, auf. Diese Ergebnisse bestätigen und untermauern somit die alterabhängige Zunahme an DSBs, die schon in der Immunfluoreszenz – unter Verwendung der 53BP1-Foci – aufgezeigt wurde. Bei näherer Analyse der Stammzellpopulationen zeigt sich, dass nur die basalen HFSCs (CD34<sup>+</sup>/α6<sup>high</sup>) eine signifikante Erhöhung normiert auf die Kontrolle aufweisen (rechtes Diagramm). Somit vollzieht sich die stammzellspezifische Zunahme an DNA-Schäden zu einem großen Teil in den basalen Stammzellen.

In der Summe demonstrieren die Ergebnisse eine altersabhängige Zunahme an 53BP1 und pKu70, was für die Akkumulation von endogen induzierten DNA-Schäden mit dem Alter spricht. In Kombination mit den Erkenntnissen aus den SCID Tieren wird zudem aufgezeigt, dass der Einfluss der verminderten DNA-Reparatur in den Stammzellen stärker zum Tragen kommt als in den differenzierten Funktionszellen.

#### 4.2.1 ABNAHME DER REPARATURKAPAZITÄT MIT DEM ALTER

Die Zunahme von DSBs kann auf Grundlage unterschiedlicher Mechanismen entstehen. Entweder kommt es durch die endogenen Reize zu einer stetigen Ansammlung an Schäden oder Mutationen über die lange Lebenszeit dieser Zellen, oder die DNA-Reparaturkapazität verschlechtert sich mit steigendem Alter, was dazu führt, dass nicht mehr alle Schäden



behooben werden können und sich somit auch Schäden anhäufen. Um abzuklären, ob die altersabhängige Zunahme der 53BP1-Foci wirklich aufgrund einer Verschlechterung der DNA-Reparaturkapazität mit steigendem Alter in Verbindung steht, wird die DSB-Reparaturkapazität in unterschiedlich alten Mäusen gemessen. Zuvor muss – zum Vergleich der Reparaturkapazität beider Zelltypen – sichergestellt werden, dass beide Zelltypen eine vergleichbare DSB-Induktion aufweisen. Dafür wurden junge Mäuse mit steigender Dosis (0.01, 0.1, 0.5, 1, 2 Gy) bestrahlt und 30 min nach Bestrahlung die Haut entnommen, fixiert und eingebettet. Zur nachfolgenden, altersabhängigen Analyse der DNA-Reparaturkapazität wurden Mäuse der verschiedenen Altersgruppen (0.5, 3, 12, 18 und 24 Monate) mit 2 Gy ionisierender Strahlung unter einem 6MV-Linearbeschleuniger Ganzkörper bestrahlt und zu verschiedenen Zeitpunkten (0.5, 5, 24, 48 h) nach der Bestrahlung die Haut asserviert. Unter Verwendung der Immunfluoreszenz Doppelfärbung aus 53BP1 und CD34 wurde die Zahl der 53BP1-Foci in den CD34-positiven Stammzellen und den Keratinozyten *in vivo* nach unterschiedlichen Dosen ionisierender Strahlung (Induktion) und zu den verschiedenen Zeiten (Reparatur) ausgewertet. Für den Vergleich der Induktion der beiden Zelltypen wird in Abbildung 4-4A die steigende Dosis gegen die Anzahl an 53BP1-Foci pro Zelle dargestellt. Beide Zelltypen weisen bei steigender, applizierter Dosis eine lineare und vergleichbare Zunahme an 53BP1-Foci von 0.01 Gy (HFSCs:  $0.05 \pm 0.01$ , Keratinozyten:  $0.11 \pm 0.02$  Foci pro Zelle) bis zu 1 Gy (HFSCs:  $7.00 \pm 0.23$ , Keratinozyten:  $7.53 \pm 0.08$  Foci pro Zelle) auf. Bei einer applizierten Dosis  $>1$  Gy beobachten wir eine geringere Foci-Zahl als von der Linearitätsgerade zu erwarten wäre, wodurch klar wird, dass bei höheren Dosen die Linearität verloren geht. Aber aufgrund der vergleichbaren Induktion beider Zelltypen kann die Reparaturkapazität beider Zelltypen in den weiteren Untersuchungen in Relation gesetzt werden.

# Ergebnisse

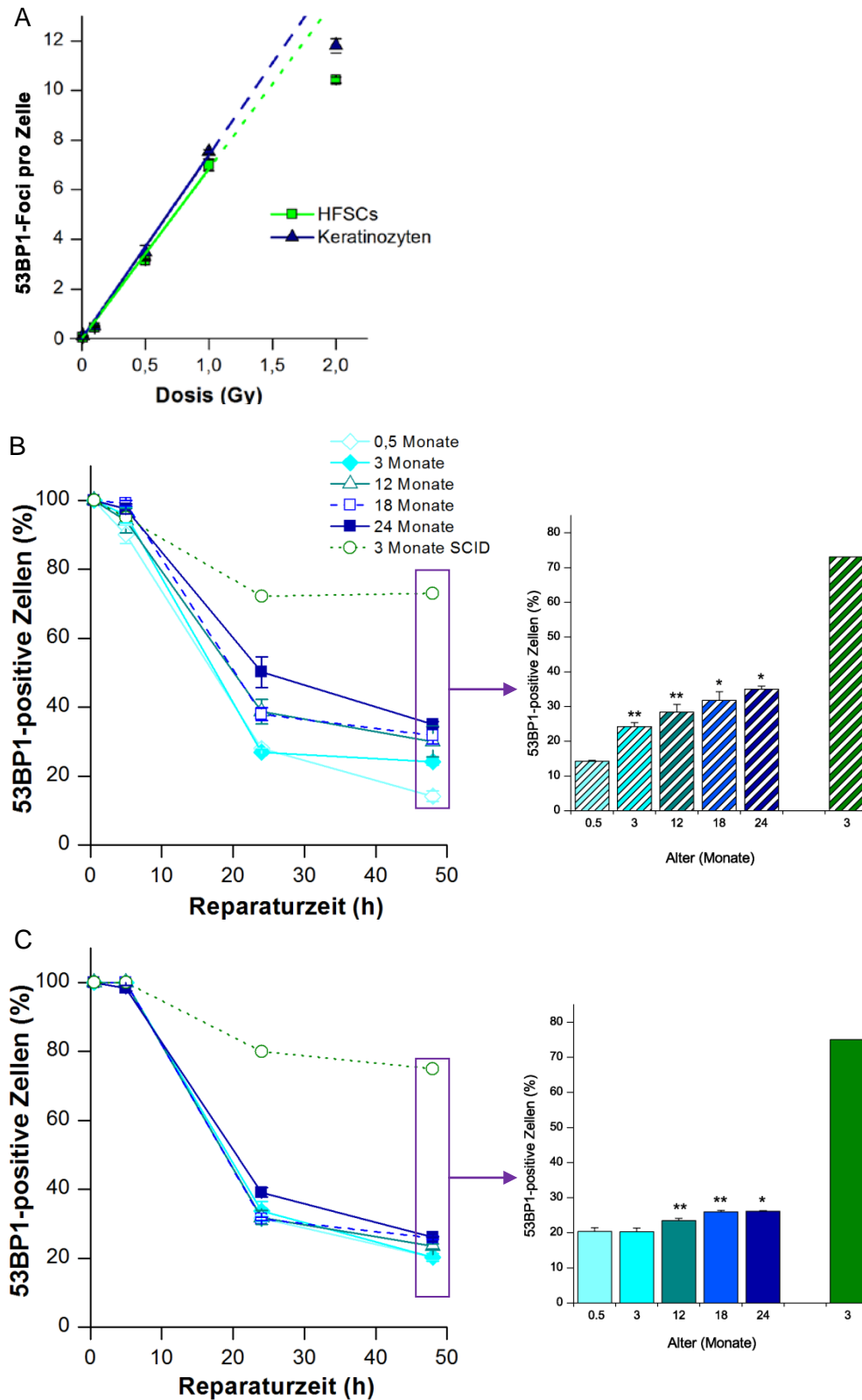


Abbildung 4-4: Induktion und Reparatur von DSBs:

A: Quantifizierung von 53BP1-Foci pro Zelle 0.5 h nach Bestrahlung mit steigender Dosis (0.01-2 Gy). Nachweis einer vergleichbaren DSB-Induktion. B+C: Quantifizierung von 53BP1-positiven HFSCs (B) und Keratinozyten (C) zu unterschiedlichen Zeiten (0.5-48 h) nach Bestrahlung mit 2 Gy. Altersabhängiger Vergleich der Reparatur 48 h nach 2 Gy Bestrahlung (Balkendiagramm). Altersabhängige Zunahme der 53BP1-positiven HFSCs (B) und Keratinozyten (C). \* = signifikant erhöht im Vergleich zur jungen Kontrolle.; \*\* = signifikant erhöht im Vergleich zur jüngeren Gruppe;  $p \leq 0.05$ .

Nach dem Abgleich der Induktion, die in beiden Zelltypen vergleichbar ist, konnte auch die Reparaturkapazität der beiden Zelltypen gegenüber gestellt werden (s. Abbildung 4-4B und C). Bei der Betrachtung des Kurvenverlaufs wird deutlich, dass bei steigender Reparaturzeit die Zahl der 53BP1-positiven HFSCs (B) und Keratinozyten (C) – unabhängig vom Alter – kontinuierlich abnimmt. Im Vergleich zur SCID Maus, bei der über den gesamten Reparaturzeitraum 70-80% 53BP1-positive Zellen verbleiben, weisen alle Altersgruppen der reparaturprofizienten Mäuse somit eine „normale“ Reparatur auf. Beim altersabhängigen Vergleich der Reparatur 48 h nach 2 Gy Bestrahlung (s. Abbildung 4-4B und C; Balkendiagramme) wird eine Zunahme an 53BP1-positiven Zellen deutlich. In den HFSCs (B) zeigt sich eine stetige Zunahme an 53BP1-positiven Zellen von  $14.20\% \pm 1.57\%$  in den 0.5 Monate alten HFSCs bis zu  $35.00\% \pm 0.85\%$  in den 24 Monate alten Stammzellen. In den Keratinozyten (C) ist 48 h nach der Bestrahlung mit 2 Gy auch eine geringfügige, aber signifikante Zunahme der 53BP1-Foci mit zunehmendem Alter (0.5 Monate:  $20.37\% \pm 1.10\%$ ; 24 Monate:  $25.96\% \pm 0.44\%$ ) nachweisbar. Diese verbleibenden Foci 48 h nach Bestrahlung könnten als verbleibende DSBs gewertet werden. Im direkten Vergleich ist im Alter von 0.5 Monaten die Reparaturkapazität der Stammzellen 1.6-fach besser als die der differenzierten Zellen, jedoch nimmt die Reparaturkapazität in den Stammzellen über die Zeit ab, bis sie nach 24 Monaten sogar eine 1.4-fach schlechtere Reparatur aufweisen.

Somit kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die altersabhängige Zunahme der 53BP1-Foci in HFSCs zusammen mit einer verminderten Reparaturkapazität mit dem Alter einher geht. Dabei ist der Verlust der Reparaturkapazität aber nicht auf die Stammzellpopulation beschränkt.

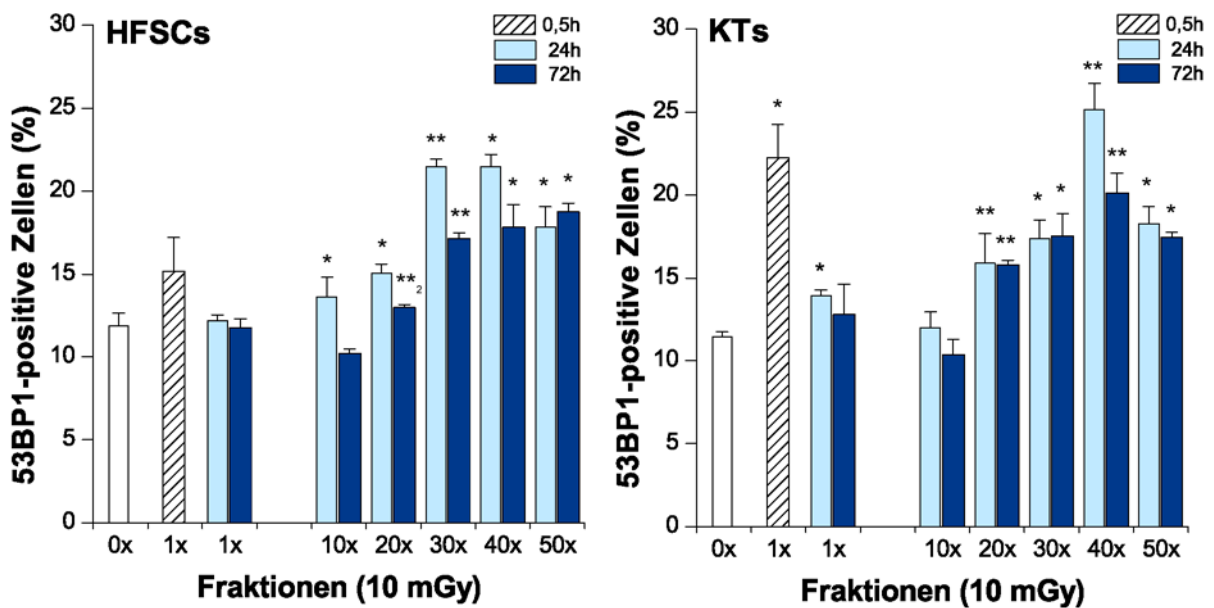
## 4.2.2 AKKUMULATION VON 53BP1-FOCI NACH FRAKTIONIRTER NIEDRIGDOSISBESTRAHLUNG

Unter Berücksichtigung der bisherigen Ergebnisse – die eine Verbindung zwischen DNA-Reparatur und dem Alterungsprozess nachgewiesen haben – und dem Umstand, dass durch Bestrahlung sowie durch endogene Stimulation DNA-Schäden infolge von ROS induziert werden (Hall, E. und Giaccia, A., 2006; Jackson, A. L. und Loeb, L. A., 2001), wird eine Arbeitshypothese aufgestellt. In dieser Arbeitshypothese wird postuliert, dass eine stetige exogene Stimulation eine Zunahme an 53BP1-Foci induziert, die mit dem alterungsabhängigen Verlauf vergleichbar ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden 3 Monate alte Mäuse über einen Zeitraum von bis zu 10 Wochen jeden Tag (1 Bestrahlung/Tag = 1 Fraktion), von Montag bis Freitag, mit einer sehr niedrigen Dosis von 10 mGy bestrahlt (fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung). 24 bzw. 72 h nach der letzten Fraktion (10, 20, 30, 40, 50 Fraktionen) wurden die 53BP1-positiven HFSCs und



Keratinocyten mittels 53BP1/CD34 Doppelfärbung am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Abbildung 4-5A zu sehen. Für die weiterführende, quantitative Analyse mehrerer Reparaturproteine (auch phosphorylierter, zentraler Proteine des NHEJ, pKu70) nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung wurde aus der Haut von 20 x 10 mGy bestrahlten Mäusen nach einer Reparaturzeit von 72 h eine Einzelzellsuspension hergestellt. Durch eine immunologische Anfärbung von Reparaturproteinen (53BP1, pKu70, usw.) – kombiniert mit der Markierung der Stammzellen – kann der Gehalt der einzelnen Reparaturproteine in den zu untersuchenden Zellpopulationen im Durchflusszytometer ermittelt werden (s. Abbildung 4-5B).

A



B

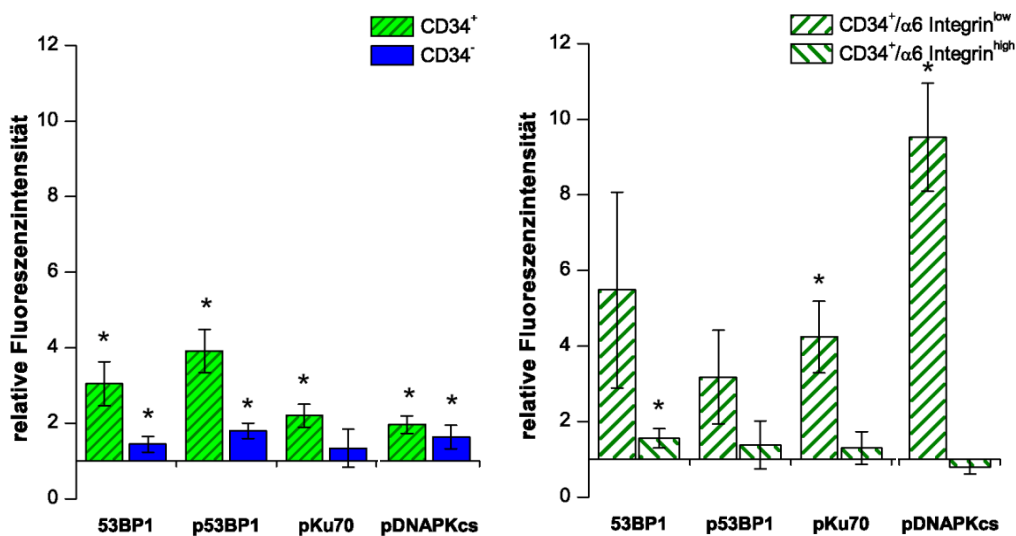


Abbildung 4-5: Analyse von Reparaturproteinen nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung:

A: Quantifizierung von 53BP1-positiven HFSCs (linkes Bild) und Keratinozyten (rechtes Bild) 24 (hellblau) bzw. 72 h (dunkelblau) nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung. Mit steigenden Fraktionen ist eine Zunahme der 53BP1-

positiven Zellen zu verzeichnen. Signifikanz: \*: signifikant höher im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle; \*\*: signifikant höher im Vergleich zur vorherigen Fraktion und gleichzeitig zur unbestrahlten Kontrolle; \*\*: signifikant höher im Vergleich zur vorherigen Fraktion ( $p \leq 0.05$ ) B: Durchflusszytometrische Analyse von verschiedenen Reparaturproteinen des NHEJ. Dabei wurde die relative Fluoreszenzintensität der einzelnen Reparaturproteine 72 h nach 20 x 10 mGy Bestrahlung analysiert. Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität aller Reparaturproteine in CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/α6<sup>low</sup> und CD34<sup>-</sup> Zellen nach Bestrahlung. \* : signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle ;  $p \leq 0.05$ .

In der Immunfluoreszenz ist 0.5 h nach einer einmaligen Applikation (quergestreift) von 10 mGy eine leichte Zunahme der 53BP1-positiven HFSCs (linkes Diagramm) und eine signifikante Erhöhung der 53BP1-positiven Keratinozyten (rechtes Diagramm) zu verzeichnen (s. Abbildung 4-5A). 72 h nach der Einzeitbestrahlung ist in beiden Zelltypen wieder das Hintergrundniveau der Kontrolle (weiß) erreicht (11.42%  $\pm$  0.31% 53BP1-positiv Zellen). 24 h (hellblau) nach fraktionierter Bestrahlung steigt die Zahl der 53BP1-positiven HFSCs bis zur dreißigsten Fraktion kontinuierlich an und stagniert anschließend auf einem signifikant erhöhten Plateau bis zur fünfzigsten Fraktion (17.84%  $\pm$  1.21% 53BP1-positiv HFSCs). 72 h (dunkelblau) nach der Bestrahlung zeigt sich ein stetiger Anstieg der 53BP1-Foci bis zur fünfzigsten Fraktion (18.75%  $\pm$  0.54% 53BP1-positiv HFSCs). Vergleicht man die beiden Reparaturzeitpunkte (24 h und 72 h) miteinander, weisen die HFSCs nach 24 h meist einen höheren Gehalt als nach 72 h auf. Daraus lässt sich folgern, dass in den HFSCs die Reparatur nach 24 h noch nicht abgeschlossen ist. In den Keratinozyten ist 24 und 72 h nach fraktionierter Bestrahlung eine vergleichbare Zunahme der 53BP1-positiven Zellen bis zur vierzigsten Fraktion, und ein Absinken auf ein signifikant erhöhtes Plateau – im Vergleich zur Kontrolle – nach der fünfzigsten Fraktion (18,25%  $\pm$  1,04% 53BP1-positiv Keratinozyten) nachweisbar. In beiden Zelltypen wird somit durch eine stetige exogene Stimulation eine Zunahme an 53BP1-Foci induziert. Dieses Ergebnis wird in der Durchflusszytometrie noch verdeutlicht (s. Abbildung 4-5B). Dabei ist 72 h nach fraktionierter Bestrahlung eine Zunahme aller untersuchten Reparaturproteine in den CD34-positiven (grün quergestreift) und CD34-negativen Zellen (blau), normiert auf die unbestrahlte Kontrolle, nachweisbar. Bei näherer Betrachtung der Stammzellpopulationen, erzeugt die fraktionierte Bestrahlung, im Gegensatz zur Alterung, eine Zunahme der Reparaturproteine vornehmlich in den suprabasalen Stammzellen (CD34<sup>+</sup>/α6<sup>low</sup>) (rechtes Diagramm). Einzige Ausnahme ist die geringe, aber signifikante Erhöhung von 53BP1 in den basalen Stammzellen (1.56  $\pm$  0.26) (CD34<sup>+</sup>/α6<sup>high</sup>). Auffällig ist auch die sehr starke Zunahme an pDNA-PKcs in den suprabasalen Stammzellen (9.52  $\pm$  1.42), die im gesamten Stammzellpool kaum zum Tragen kommt. Basierend auf der Tatsache, dass der Großteil aller akuten Schäden nach 72 h repariert sein sollte, werden diese Ergebnisse nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung (Abbildung 4-5) mit denen der Alterung (Abbildung 4-3) verglichen. Die HFSCs weisen unabhängig vom verwendeten Stimulus (Alterungsprozess oder Bestrahlung) eine vergleichbare Akkumulation der 53BP1-positiven Zellen auf

(Alterungsprozess:  $20.2\% \pm 1.8\%$ ; Bestrahlung:  $18.75\% \pm 0.54\%$  53BP1-positive HFSCs). Zudem induzieren beide Stimuli eine Zunahme an p53BP1 und pKu70 in den HFSCs. Diese Ergebnisse bestätigen somit die aufgestellte Arbeitshypothese, dass durch eine stetige exogene Stimulation eine 53BP1 Zunahme induziert wird, die mit dem altersabhängigen Verlauf vergleichbar ist. Neben diesen Gemeinsamkeiten scheinen die beiden Reize aber auch unterschiedliche Auswirkungen zu haben. Durch den Alterungsprozess wird eine Erhöhung von Reparaturproteinen in den basalen Stammzellen verursacht, während Bestrahlung Schäden in den differenzierten Funktionszellen und den suprabasalen Zellen induziert.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die langlebigen HFSCs mit steigendem Alter kontinuierlich 53BP1-Foci akkumulieren, was mit einer Verschlechterung der DNA-Reparaturkapazität einhergeht. Diese altersabhängige Zunahme an 53BP1, sowie von zentralen und „aktivierten“ Reparaturproteinen des NHEJ (pKu70), konnte infolge einer stetigen Stimulation auch in jungen Mäusen hervorgerufen werden. Somit scheint es einen direkten Zusammenhang zwischen Veränderungen der DNA-Reparatur und der Alterung von Stammzellen zu geben.

## 4.3 CHARAKTERISIERUNG DER 53BP1-FOCI

Auf Grundlage der nachgewiesenen altersabhängigen Akkumulation von 53BP1-Foci in den langlebigen HFSCs, soll die Art dieser 53BP1-Foci im Zusammenspiel mit assoziierten Proteinen im weiteren Verlauf der Arbeit näher untersucht werden.

### 4.3.1 ALTERSABHÄNGIGE 53BP1-FOCI SIND NICHT DEM TELOMER ZUZUORDNEN

Ein Ereignis das bekannterweise mit Alterung und der DSB-Reparatur in Verbindung gebracht wird ist die Telomerverkürzung, die die Detektion der Chromosomenende durch Proteine der DSB-Reparatur – wie 53BP1 – induziert (Noon, A. T. und Goodarzi, A. A., 2011). Um herauszufinden, ob die altersabhängige Zunahme an 53BP1-Foci möglicherweise durch die Verkürzung der Telomere bedingt ist, wurde eine 53BP1 Immunfluoreszenzfärbung mit einer *in vivo* FISH kombiniert. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden 3 und 24 Monate alte Hautproben in Formalin eingebettet und daraus 4  $\mu$ m dicke Gewebeschnitte getrimmt. Zur Detektion der Telomere wurde eine Fluoreszenz-markierte PNA Probe, die spezifisch die Telomerasequenz erkennt, auf die Gewebeprobe hybridisiert. Im Anschluss wurden die 53BP1-Foci mittels einer Immunfärbung detektiert. Für die quantitative Auswertung der Kolo-kalisation von Telomer und 53BP1-Fokus ist die Analyse von einzelnen Ebenen eines Zellkerns wichtig, da infolge der z-Stapel Aufnahmen viele Ebenen auf eine

projiziert werden, und somit auch darunter oder oberhalb liegende Telomere als überlappend mit dem Fokus gewertet werden könnten. Aus diesem Grund werden nachgewiesene 53BP1-Foci (rot) durch den gesamten Zellkern nachverfolgt, um kolocalisierende Telomere (grün) zu identifizieren (weiße Pfeile) (s. Abbildung 4-6B; merge). Für die Analyse wurden in HFSCs – die aufgrund ihrer Morphologie und Lage identifiziert wurden – und Keratinozyten von drei biologischen Replikaten 50 53BP1-Foci auf ihre Kolokalisation mit dem Telomer hin untersucht.

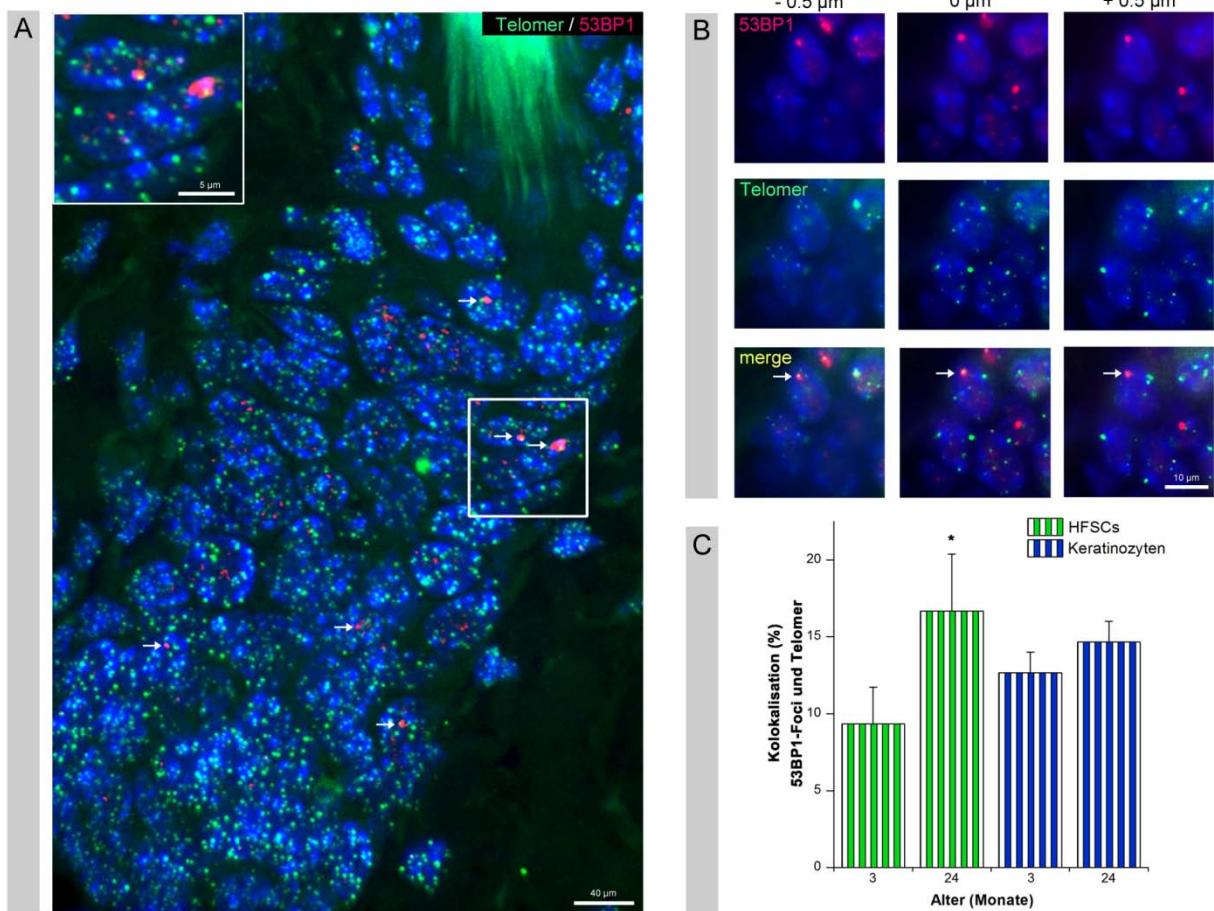


Abbildung 4-6: Telomer-assoziierte 53BP1-Foci:

A: Konfokale Aufnahmen eines 24 Monate alten Haarfollikels. Telomere wurden durch eine *in vivo* FISH mit einer Fluorophor-gekoppelten PNA-Sonde (grün) markiert, während die 53BP1-Foci durch eine Immunfärbung detektiert wurden (rot). Zellkerne sind durch Dapi (blau) hervorgehoben. Der weiß umrahmte Bereich ist im eingefügten Bild nochmals vergrößert dargestellt. In manchen Fällen zeigt sich eine Kolokalisation zwischen den 53BP1-Foci und den Telomeren. B: Fluoreszenzaufnahmen einzelner Ebenen durch eine bulge Region im Abstand von 0.5  $\mu$ m. Nachverfolgung einer Kolokalisation eines 53BP1-Fokus (rot) und der Telomer-Sonde (grün) in einem Dapi gefärbten Kern (weiße Pfeile). Dabei ist die Überlagerung in der unteren Reihe zu sehen (merge). C: Quantitative Auswertung der Telomer-assoziierten Foci in 3 und 24 Monate alten HFSCs (grün gestreift) und Keratinozyten (blau gestreift). In 24 Monate alten Stammzellen ist eine signifikante Erhöhung der Kolokalisation nachweisbar. \*: signifikant erhöht im Vergleich zur jungen Gruppe;  $p \leq 0.05$ .

Durch die konfokale Aufnahme – bei der mehrere Ebenen auf eine reduziert werden – wird deutlich, dass in allen Zellen eines 24 Monate alten Haarfollikels viele Telomere sichtbar sind (grüne Punkte), während nur in manchen Zellen auch 53BP1-Foci detektiert werden (s. Abbildung 4-6A). In einigen Fällen kommt es, wie in dem eingefügten Bild (weißer Rahmen) vergrößert dargestellt, zur Überlappung von Telomer und 53BP1-Fokus. Durch die altersabhängige Quantifizierung der Kolo-kalisation von 53BP1 und dem Telomer (s. Abbildung 4-6C) wird deutlich, dass es in den HFSCs mit dem Alter zu einer signifikanten Erhöhung (24 Monate:  $17 \pm 3.51\%$  Kolo-kalisation) im Vergleich zur jungen Kontrolle (3 Monate:  $8.67 \pm 1.76\%$  Kolo-kalisation) kommt. Diese Zunahme ist in den Keratinozyten nicht zu verzeichnen. Es zeigt sich aber auch, dass nur 17% der in 24 Monate alten Stammzellen nachgewiesenen 53BP1-Foci dem Telomer zuzuordnen sind. Somit kann die Existenz von mehr als 80% der 53BP1-Foci in 24 Monate alten HFSCs, also ein sehr großer Anteil, nicht auf dieses Phänomen zurückgeführt werden. Aus diesem Grund ist die Mehrheit der 53BP1-Foci in alten HFSCs nicht den Telomeren zuzuordnen.

#### 4.3.2 HETEROCHROMATISCHE 53BP1-ANSAMMLUNGEN WEISEN KEINE KOLOKALISATION MIT PKU70 AUF

Auf Grundlage der vorherigen Ergebnisse ist klar, dass nicht alle altersabhängigen 53BP1-Foci am Telomer assoziiert sind. Darum soll nun geklärt werden, ob diese Foci überhaupt aktiv prozessierte DNA-DSBs markieren. Dazu wurde ein weiteres Protein des NHEJ, nämlich Ku70, herangezogen. Dieses Protein ist Teil des KU-Komplexes, der die beiden Bruchenden während des gesamten Reparaturvorganges stabilisiert (Walker, J. R., *et al.*, 2001). Um seine Funktion auszuführen wird es zudem am Bruch phosphoryliert (Douglas, P., *et al.*, 2005). Dieses Reparaturprotein ist in so kleiner Zahl (2 Proteine pro Bruch) vorhanden, dass es mittels der Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden kann. Aus diesem Grund wurde in unserem Labor eine neue Methode mit gesteigerter Auflösungskraft etabliert. Diese Methode kombiniert eine Immunogoldfärbung mit dem Auflösungsvermögen des Transmissions-Elektronen-Mikroskops (TEM). Bei der Immunogoldfärbung wird zur Detektion des gesuchten Antigens der gleiche Primärantikörper wie in der Immunfluoreszenz verwendet. Dieser Antikörper wird dann durch einen sekundären Antikörper detektiert, der an einen Goldpartikel einer definierten Größe gebunden ist. Durch zwei Goldpartikel unterschiedlicher Größe (z.B. 6 und 10 nm) ist somit auch die gleichzeitige Analyse zweier Antigene (z.B. 53BP1 und Ku70) im Kontext des Chromatins möglich. Um eine spätere Beschreibung der Ergebnisse zu erleichtern, werden die einzelnen Goldpartikel als Beads und eine Ansammlung von zwei und mehr Beads auf engem Raum als Cluster bezeichnet. Zudem wurde aus vorherigen Untersuchungen klar, dass durch den Nachweis der nicht-phosphorylierten Form des 53BP1 einzelne 53BP1 Beads auftreten können, die aber nicht am DSB lokalisiert sind (Rübe, *et al.*, 2011). Aus diesem Grund werden nur Cluster als eine



spezifische Anhäufung gewertet. Im Gegensatz zu 53BP1 werden bei pKu70 auch einzeln auftretende Beads dokumentiert und ausgewertet, da es sich hierbei um eine phosphorylierte, „aktivierte“ Form des Proteins handelt, die nur am Bruch lokalisiert ist. Zur Analyse des Auftretens der beiden Reparaturproteine (53BP1 und pKu70) im Kontext des Chromatins nach Bestrahlung werden murine Hautproben 0.5 h nach Bestrahlung mit 2 Gy asserviert (s. Abbildung 4-7). Zur Charakterisierung der endogen und exogen induzierten Schäden wurden Hautproben von 3 und 24 Monate alten Tieren, sowie 72 h nach fraktionierter Bestrahlung (50 x 10 mGy) entnommen und eingebettet. Alle Proben werden nach der Asservierung einer Immunogoldfärbung mit pKu70 (große Goldbeads, 10 nm), H3K9me3 (kleine Goldbeads, 6 nm) und 53BP1 (6 oder 10 nm Goldbeads) unterzogen. Im Anschluss werden die HFSCs im TEM anhand ihrer Lage, sowie charakteristischen Form identifiziert und analysiert. Für die altersabhängige Quantifizierung wurde von jedem Anschnitt die Zahl der Cluster mit zugehöriger Anzahl der Beads, der einzelnen Beads, sowie der vorherrschenden Chromatinumgebung (Euchromatin oder Heterochromatin) einer HFSC (jung und alt) festgehalten. Da die HFSCs, die wie in Abbildung 4-1 zu sehen, eine sehr unregelmäßige Zellkernform aufweisen, wurde zudem der Umfang des Zellkerns dokumentiert. Durch den dokumentierten Umfang und die Dicke der angefertigten Gewebeschnitte kann im Anschluss das Volumen berechnet werden, was eine einheitliche Auswertung unabhängig von der Fläche der untersuchten Zellkerne ermöglicht.

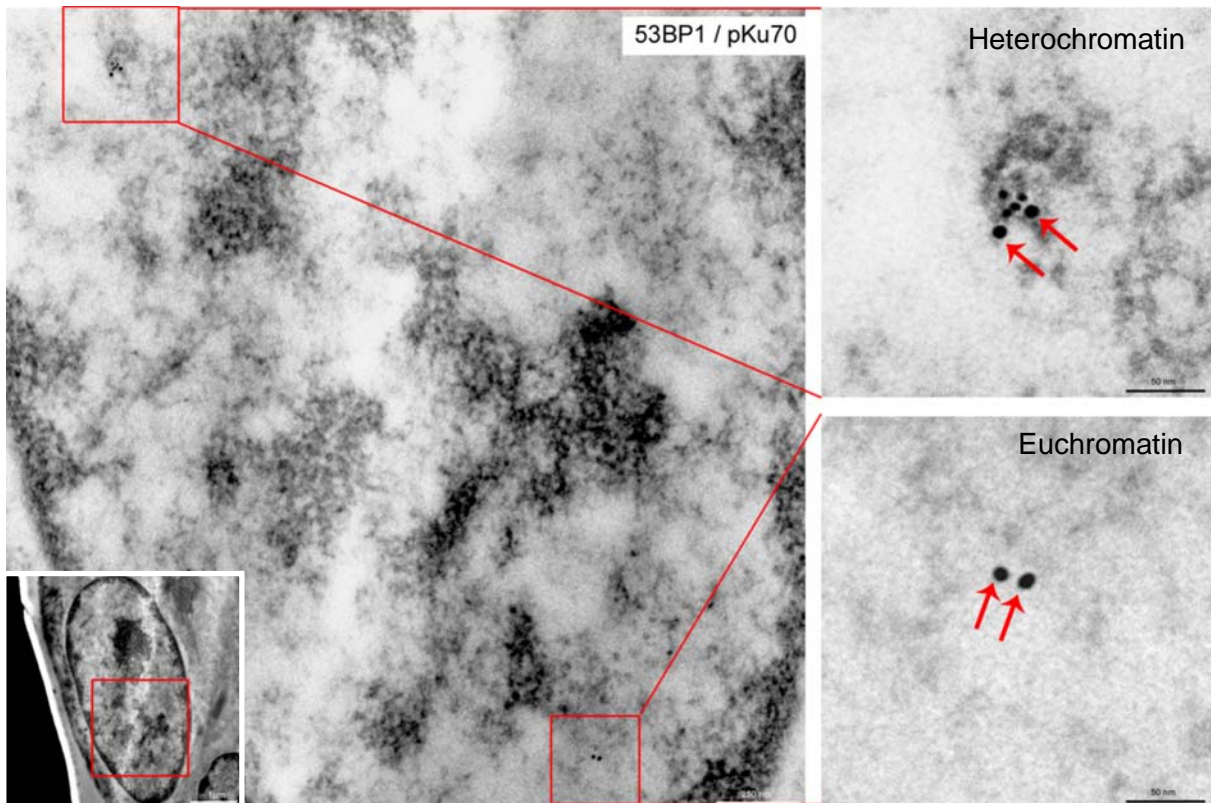
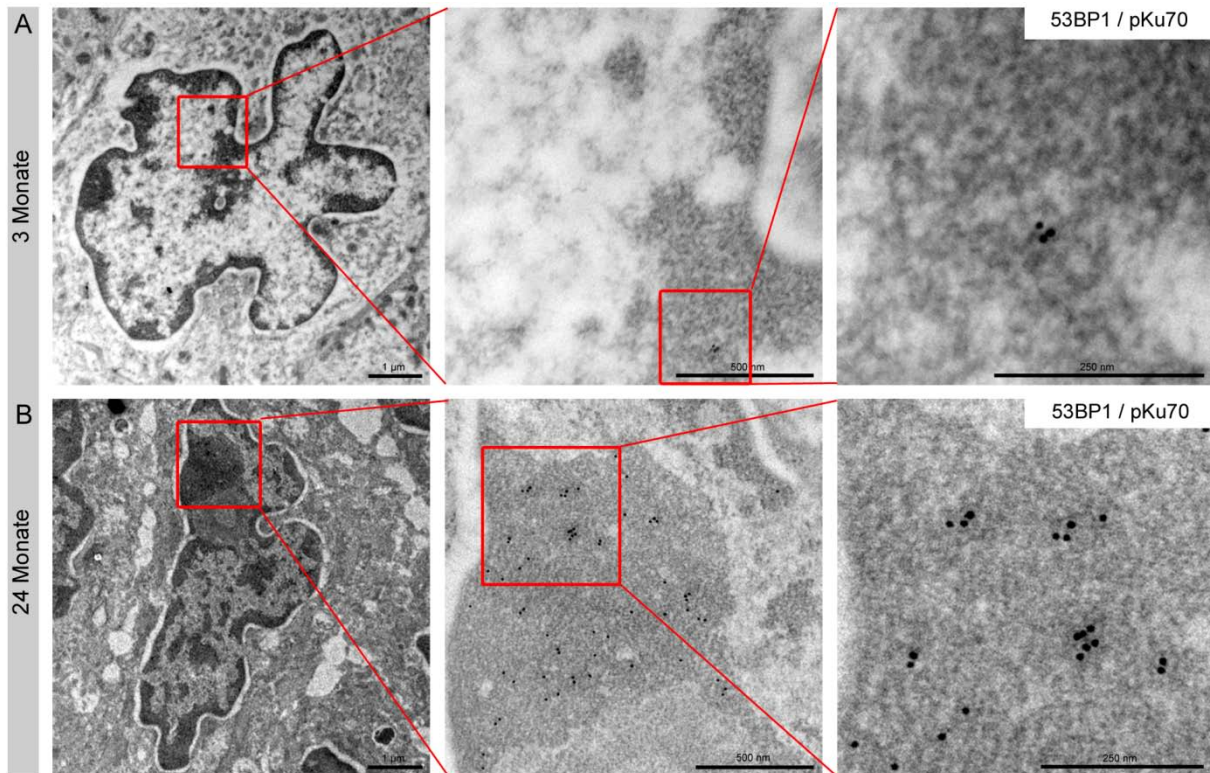


Abbildung 4-7: TEM Aufnahme einer HFSC 30 min nach 2 Gy Bestrahlung: 53BP1 (6 nm) kolokalisiert mit einem pKu70 Dimer (10 nm) (rote Pfeile) in der Übergangsregion des Heterochromatins, während pKu70 ohne jeweilige Bindung von 53BP1 im Euchromatin vorkommt. Die rot umrahmten Bereiche sind im nächsten Bild in höherer Vergrößerung dargestellt.

Zur Analyse des durch Bestrahlung induzierten Auftretens der Reparaturproteine wurden kurze Zeit nach der Bestrahlung in den HFSCs (weißer Rahmen) bei näherer Betrachtung des Chromatins (linkes Bild) mehrere Cluster, die sich anhand ihrer Chromatinumgebung unterscheiden (s. Abbildung 4-7) beobachtet. Cluster im Heterochromatin (rechtes, oberes Bild) weisen dabei eine Kolokalisation eines 53BP1 Clusters – bestehend aus vier Beads – und einem pKu70 Cluster (rote Pfeile) – bestehend aus zwei Beads – auf. Im Gegensatz zum Heterochromatin, sind im Euchromatin (rechtes, unteres Bild) nur pKu70 Cluster, unabhängig von 53BP1, nachweisbar. Somit treten diese pKu70 Cluster im Bereich der durch Bestrahlung induzierter DSBs sowohl in der euchromatischen als auch der heterochromatischen DNA, im Sinne von aktiv prozessierten Brüchen auf. Im Vergleich zur initialen Reparatur nach Bestrahlung weisen Untersuchungen von jungen, unbestrahlten HFSCs, wie in Abbildung 4-8A, nur sehr vereinzelt 53BP1 Cluster – meist in sehr dunklem, kompaktem Heterochromatin (konstitutives Heterochromatin) – ohne pKu70 auf. Nach Betrachtung von 24 Monate alten HFSCs (s. Abbildung 4-8B) zeigt sich zudem eine starke Zunahme von einzelnen kleinen 53BP1 Clustern (2-6 Beads) in konstitutiven Heterochromatindomänen (mittleres Bild). Dabei fällt auf, dass diese 53BP1 Cluster vornehmlich nicht mit pKu70 kolokalisieren (rechtes Bild).

# Ergebnisse



C

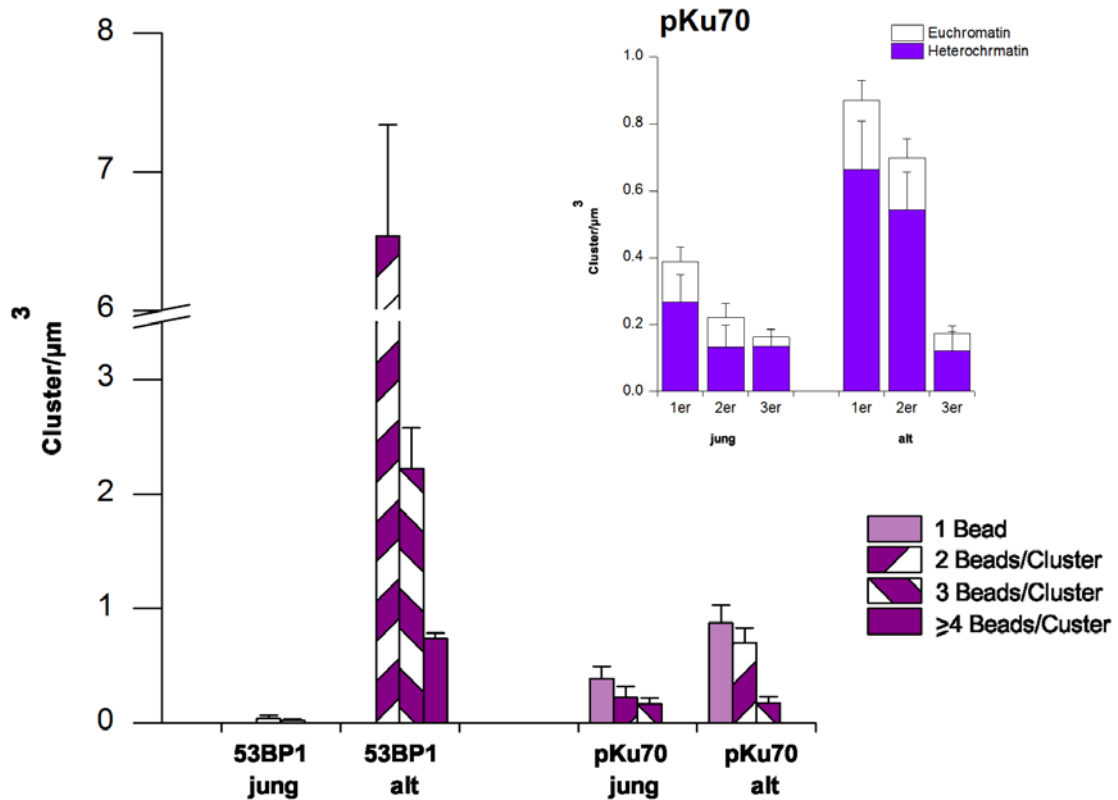


Abbildung 4-8: Altersabhängige Verteilung der 53BP1 Cluster im Chromatin:

A: TEM Aufnahmen von 0.5 (obere Reihe) und 24 Monate (untere Reihe) alten HFSCs. Dabei zeigt sich die altersabhängige Zunahme der 53BP1 Cluster in sehr dunklem, konstitutivem Heterochromatin. Die rot umrahmten Bereiche sind im nächsten Bild in höherer Vergrößerung dargestellt. B: Quantitative Auswertung der 53BP1 und pKu70



Cluster, sowie der einzelnen Beads in jungen und alten HFSCs. Dabei wird zusätzlich die Zahl der Beads in einem Cluster festgehalten und aufgeschlüsselt. Für pKu70 wird zudem noch die Zuordnung zu eu- und heterochromatischen Bereichen vergleichend dargestellt (eingebettetes Diagramm). Dies zeigt, dass die altersabhängige Zunahme von 53BP1, sowie auch von pKu70, auf das Heterochromatin beschränkt ist.

Der visuelle Eindruck der altersabhängigen Zunahme von 53BP1 wird nach der quantitativen Auswertung in jungen und alten HFSCs in Abbildung 4-8C noch verdeutlicht. Dabei ist eine starke Zunahme an 53BP1 mit dem Alter nachweisbar. Insbesondere die Cluster mit zwei Beads (links quergestreift) nehmen um das 6.5-fache im Vergleich zu den jungen Tieren zu (jung:  $0.04 \pm 0.02$ ; alt:  $6.54 \pm 0.80$  Cluster/ $\mu\text{m}^3$ ). Aber auch die Cluster mit drei Beads (rechts quergestreift) und größer gleich vier Beads (lila) steigen von den jungen zu den alten HFSCs an. Neben 53BP1 zeigt sich zudem eine leichte Zunahme von pKu70 mit dem Alter. Dabei ist eine Zunahme der einzelnen pKu70 Beads, sowie der Cluster mit zwei (jung:  $0.22 \pm 0.10$ ; alt:  $0.70 \pm 0.13$  Cluster/ $\mu\text{m}^3$ ), aber nicht der mit drei Beads, nachweisbar. Die altersabhängige Zunahme von pKu70 ist, wie im eingebetteten Diagramm von Abbildung 4-8C zu sehen, vornehmlich auf die heterochromatischen Bereiche beschränkt (jung:  $0.13 \pm 0.07$ ; alt:  $0.54 \pm 0.11$  Cluster/ $\mu\text{m}^3$ ). Unsere Ergebnisse zeigen somit auf, dass es mit dem Alter zu einer starken Zunahme an 53BP1 Clustern im komplexen Heterochromatin kommt, diese aber trotz der leichten Erhöhung von pKu70 im Heterochromatin vornehmlich nicht mit pKu70 koloalisieren. Basierend auf den Immunfluoreszenz Ergebnissen, die eine vergleichbare Akkumulation von 53BP1-Foci mit dem Alter und nach fraktionierter Bestrahlung nachgewiesen haben, soll – vergleichend zu den altersabhängigen 53BP1 Clustern – auch die Natur der 53BP1-Foci nach fraktionierter Bestrahlung im Kontext des Chromatins analysiert werden.

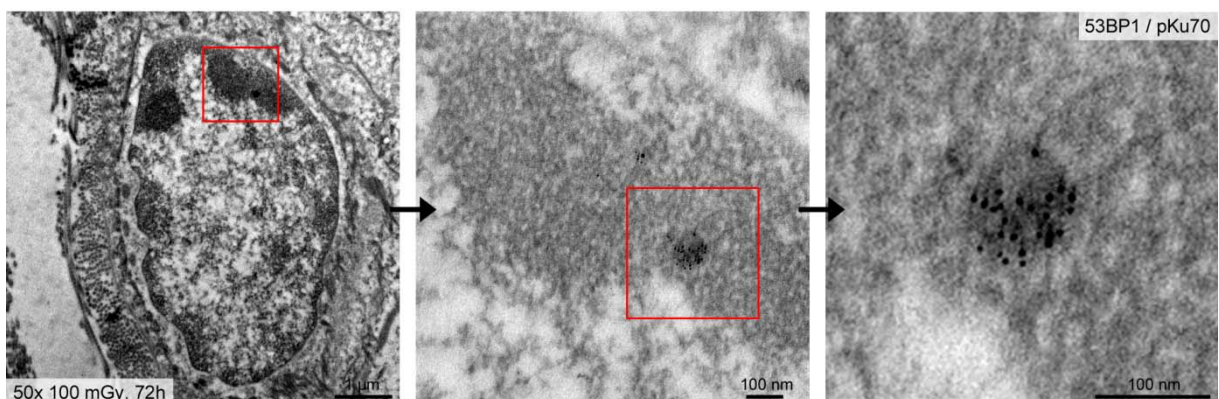


Abbildung 4-9: TEM Aufnahme einer HFSC 72 h nach protrahierter Bestrahlung:

53BP1 (6 nm) akkumuliert dabei in einzelnen, großen Clustern, unabhängig von pKu70 (10 nm), im konstitutiven Heterochromatin. Die rot umrahmten Bereiche sind im nächsten Bild in höherer Vergrößerung dargestellt.

Bei dieser Untersuchung wurde, wie in Abbildung 4-9 zu erkennen, deutlich, dass es zwar auch hier heterochromatisch zu einer Ansammlung an 53BP1 Beads kommt, diese aber

nicht in vielen kleinen Clustern – wie bei der Alterung – organisiert sind, sondern sich hierbei zu einzelnen, großen Clustern zusammenschließen (mittleres Bild). Diese 53BP1 „Großcluster“ nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung weisen zudem – vergleichbar mit den alterungsabhängigen 53BP1 Clustern – keine Kolo­kalisierung mit pKu70 auf (rechtes Bild). Weiterhin weisen 53BP1 Ansammlungen nach endogener und exogener Stimulation eine unterschiedliche Verteilung im kompakten Heterochromatin auf. Aus diesem Grund wurde die Chromatinumgebung, die einen Einfluss auf die Akkumulation der 53BP1-Foci haben kann, im TEM analysiert. Dabei war kein erkennbarer Unterschied zwischen Bestrahlung und Alterung bezüglich der Kolo­kalisierung zwischen 53BP1 und H3K9me3 nachweisbar. Deshalb ist in Abbildung 4-10 exemplarisch der Zustand nach fraktionierter Bestrahlung aufgezeigt.

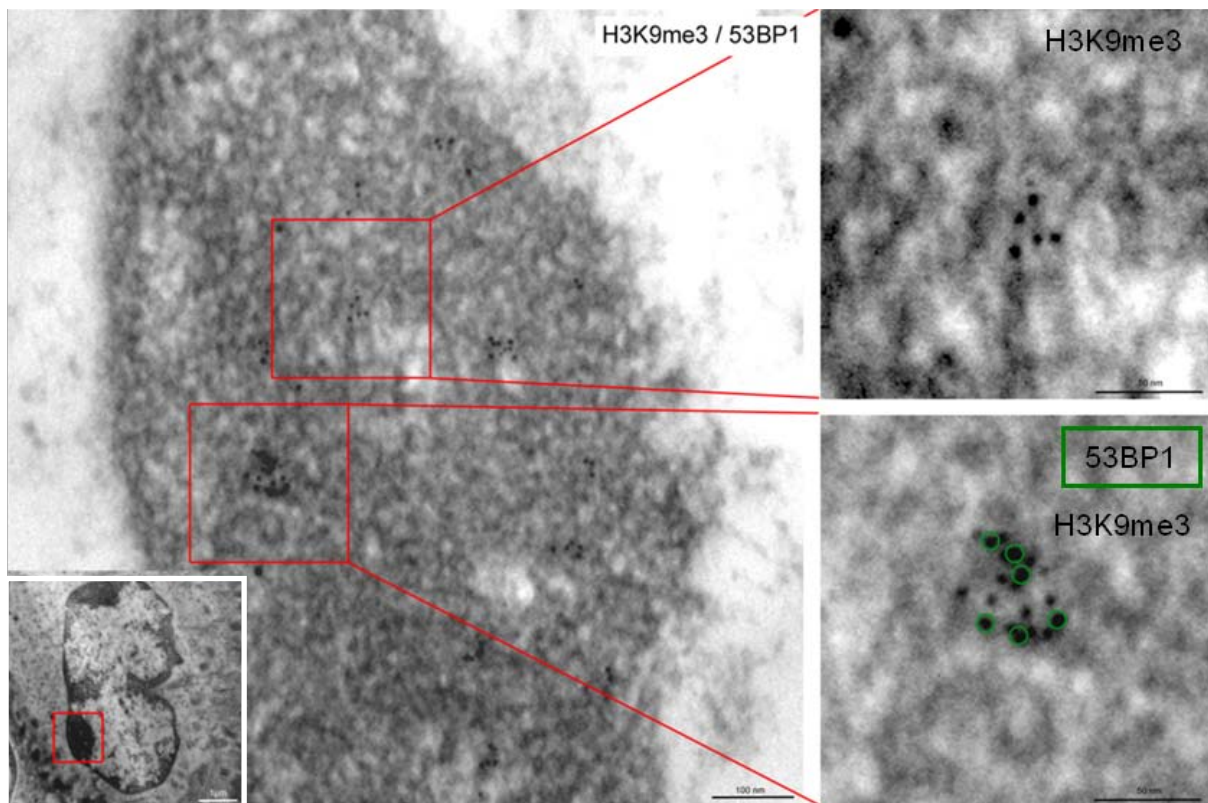


Abbildung 4-10: Chromatinumgebung der 53BP1 Cluster:

TEM Untersuchung von 53BP1 (10 nm) und dem Heterochromatin Marker H3K9me3 (6 nm). 53BP1 Cluster im konstitutiven Heterochromatin weisen Kolo­kalisierung mit H3K9me3 auf (rechtes, unteres Bild), während H3K9me3 Cluster auch unabhängig von 53BP1 zu finden sind (rechtes, oberes Bild). Rot umrahmte Bereiche sind vergrößert dargestellt.

In fraktioniert bestrahlten HFSCs (weißer Rahmen) weisen die großen 53BP1 Cluster (grüne Kreise; rechtes, unteres Bild) im kompakten Heterochromatin in allen Fällen eine Kolo­kalisierung mit H3K9me3 auf. H3K9me3 kommt zudem in großer Zahl – unabhängig von 53BP1 – im kompakten Heterochromatin vor (rechtes, oberes Bild). Altersabhängige, sowie durch Bestrahlung induzierte 53BP1 Cluster sind somit dem kompakten Heterochromatin

zuzuordnen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Chromatinumgebung in Bezug auf die Histonmodifikation H3K9me3 in beiden Fällen gleich ist.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass trotz der geringen Zunahme von pKu70 im Heterochromatin die Mehrheit der altersabhängigen, heterochromatischen 53BP1 Ansammlungen keine Kolo-kalisation mit pKu70 aufweisen. Zudem wird durch den Vergleich von Alterung und fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung deutlich, dass eine exogene Stimulation – trotz der vergleichbaren Akkumulation an 53BP1-Foci – doch ein unterschiedliches Schadensmuster im Kontext des Chromatins induziert, was möglicherweise unterschiedliche biologische Konsequenzen für die Stammzellen zur Folge hat.

## 4.4 FOLGEN DER STAMMZELLALTERUNG

Nach dem bestätigten Zusammenhang zwischen Alterung und DNA-Schäden liegt der Fokus dieser Arbeit auch in der Aufdeckung und Analyse der Folgen, die die Alterung sowie die Bestrahlung für die Stammzellen und die umgebene Stammzellnische mit sich bringt. Dabei ist die Frage zu klären, was mit den Stammzellen passiert, die eine große Anzahl an 53BP1-Foci akkumulieren.

### 4.4.1 KEINE INDUKTION VON APOPTOSE IN ALTERNDEN STAMMZELLEN

Alterung ist mit einer Zunahme von Seneszenz und gesteigerter Apoptose verbunden (Campisi, J., 1998; Zhang, Y. und Herman, B., 2002). Zur Klärung der Frage, ob das auch für die Haut von Mäusen und im Speziellen für die HFSCs gilt, wurde die Haut von jungen und alten Mäusen, sowie von fraktioniert bestrahlten Mäusen durch Immunfluoreszenz und Immunhistochemie analysiert. Zur Untersuchung der Induktion von Apoptose wurde eine Doppelfärbung mit Caspase-3, einem zentralen Protein der Apoptose, und CD34 unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (s. Abbildung 4-11A; Abbildung 4-12A). Der Nachweis von altersabhängiger Seneszenz wurde zum einen durch die Expression einer bestimmten Form der  $\beta$ -Galaktosidase, die nur bei einem definierten pH Wert aktiv ist, der Seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal), und des Weiteren durch einen wichtigen Regulator des Zellzykluses ( $p16^{\text{ink4a}}$ ), erbracht. Der Nachweis von SA- $\beta$ -Gal erfolgt unter der Zugabe von X-Gal, das bei einem pH-Wert von 6 spezifisch in ein blaues Präzipitat umgesetzt wird. Die Untersuchung der Seneszenz in gealterten und bestrahlten Haarfollikeln erfolgte somit durch eine lichtmikroskopische Analyse von SA- $\beta$ -Gal mit CD34 oder  $p16^{\text{ink4a}}$  (s. Abbildung 4-11B; Abbildung 4-12B; Abbildung 4-13). Zur Quantifizierung der Apoptose und Seneszenz wurden in jungen (2 Monate), alten (24 Monate) und fraktioniert bestrahlten Hautproben (50 x 10 mGy, 72 h) 300 CD34-positive HFSCs sowie 500 Keratinozyten auf ihre Caspase-3 und

SA- $\beta$ -Gal-Färbung hin untersucht. Zur Erstellung des Apoptose und Seneszenz Indexes wurde die Zahl der positiven Zellen durch die Gesamtzahl aller untersuchten Zellen geteilt und aus drei biologischen Replikaten der Mittelwert und der Standardfehler berechnet (s. Abbildung 4-12C). Eine weiterführende relative Quantifizierung der Apoptose und Seneszenz erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden Einzelzellsuspensionen aus 24 Monate alten sowie fraktioniert bestrahlten (20 x 10 mGy, 72 h) Hautproben im Vergleich zur jungen, unbestrahlten Kontrolle analysiert. Dabei wurden Caspase-3 und p16<sup>ink4a</sup> in den unterschiedlichen Zellpopulationen quantifiziert (s. Abbildung 4-14).

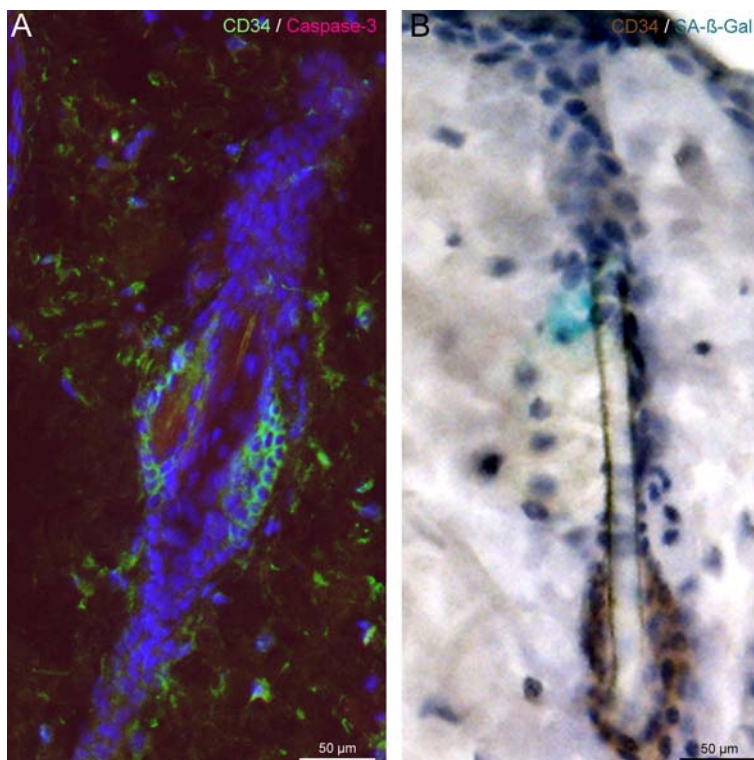


Abbildung 4-11: Aufnahmen von Haarfollikeln einer 2 Monate alten Maus:  
A: Nach CD34/Caspase-3 Doppelfärbung sind innerhalb und außerhalb der CD34-positiven bulge Region (grün) – im oberen Bereich des Haarfollikels – keine Caspase-3-positiven Zellen (rot) nachweisbar. B: Nach CD34/SA- $\beta$ -Gal Doppelfärbung sind innerhalb der CD34-positiven bulge Region (braun) – im oberen Bereich des Haarfollikels – keine SA- $\beta$ -Gal-positiven Zellen nachweisbar. Nur innerhalb der Talgdrüse sind Anfärbungen (türkis) nachweisbar, die unabhängig von Bestrahlung oder Alterung auftreten.

Im Gewebeverband zeigen sich mit steigendem Alter (s. Abbildung 4-12A) einige apoptotische Zellen (Caspase-3-positiv, rot) im Vergleich zu jungen Tieren, die keine positiven Zellen aufweisen (s. Abbildung 4-11A). Es stellte sich des Weiteren heraus, dass es sich hierbei aber in keinem Fall um CD34-positive Stammzellen (grün), sondern vielmehr um CD34-negative Zellen der Bulbusregion handelt.

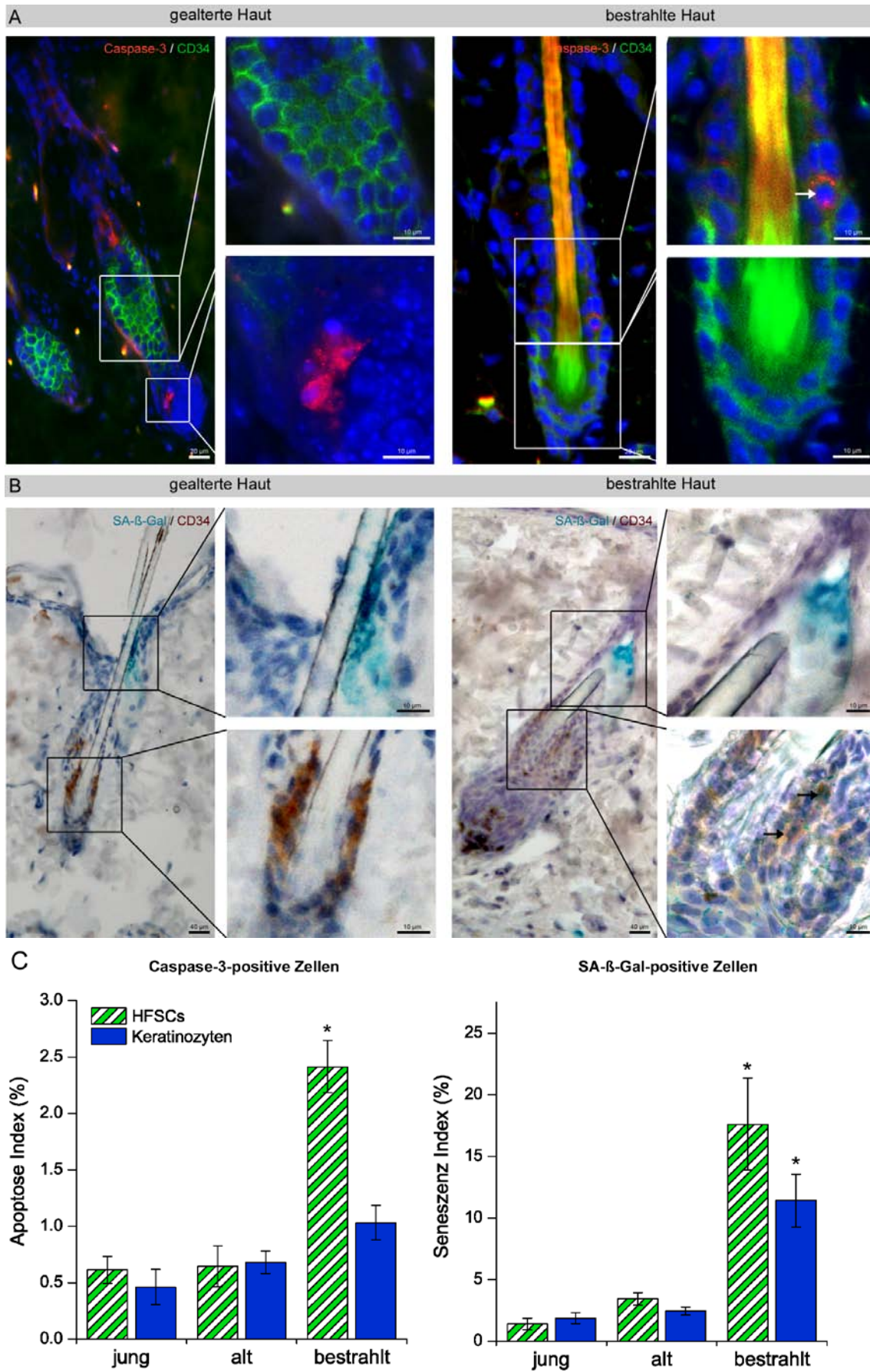


Abbildung 4-12: Untersuchung von Apoptose und Seneszenz im Gewebeverband:

A: Immunfluoreszenz Aufnahme von gealterter (links) und bestrahlter Haut (rechts) nach CD34 (grün) und Caspase-3 (rot) Nachweis. Dabei zeigen sich mit dem Alter wenige Caspase-3-positive Zellen in der Bulbusregion des Haarfollikels, aber keine CD34/Caspase-3 doppelpositiven Zellen (links). Nach Bestrahlung zeigen sich zudem wenige CD34/Caspase-3 doppelpositive Zellen (weißer Pfeil) (rechts). Eingerahmte Bereiche sind in höherer Vergrößerung dargestellt. B: Lichtmikroskopische Aufnahme eines gealterten (links) und bestrahlten Haarfollikels (rechts) nach einer SA- $\beta$ -Gal-Färbung (türkis) in Kombination mit einer immunhistochemischen CD34 Färbung. Mit dem Alter sind wenige positive Zellen außerhalb der Stammzellregion nachweisbar (links), während nach Bestrahlung auch in einzelnen HFSCs SA- $\beta$ -Gal-Präzipitate auftreten (schwarze Pfeile) (rechts). Eingerahmte Bereiche sind in höherer Vergrößerung dargestellt. C: Quantifizierung der Caspase-3 (linkes Bild) und SA- $\beta$ -Gal-positiven HFSCs und Keratinozyten (rechtes Bild) in jungen (2 Monate), alten (24 Monate) und fraktioniert bestrahlten (50 x 10 mGy, 72h) Hautproben. Dabei wird deutlich, dass nur infolge der Bestrahlung vermehrt Apoptose und Seneszenz in den Stammzellen induziert wird\*: signifikant erhöht im Vergleich zur jungen Kontrolle;  $p \leq 0.05$ .

Diese Beobachtung wird durch den nahezu gleichbleibenden Apoptose Index der HFSCs (jung:  $0.61 \pm 0.12$ ; alt:  $0.65 \pm 0.18$  Caspase-3-positive Zellen) und Keratinozyten (jung:  $0.46 \pm 0.16$ ; alt:  $0.68 \pm 0.09$  Caspase-3-positive Zellen) untermauert (s. Abbildung 4-12C). Im Vergleich zur Alterung kann 72 h nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung eine höhere Zahl an Caspase-3-positiven Zellen (HFSCs:  $2.41 \pm 0.23$ ; Keratinozyten:  $1.03 \pm 0.15$  Caspase-3-positive Zellen) sowie das Auftreten von einzelnen Caspase-3/CD34 doppelpositiven Zellen innerhalb der bulge Region (weißer Pfeil) nachgewiesen werden (s. Abbildung 4-12A und C). Somit scheint die Bestrahlung im Gegensatz zur Alterung die Abtötung der HFSCs mittels Apoptose *in vivo* zu induzieren. Basierend auf der nicht nachweisbaren altersabhängigen Apoptose in den Stammzellen bleibt zu untersuchen, ob die Stammzellen durch Seneszenz stillgelegt werden. Durch die SA- $\beta$ -Gal-Färbung wird deutlich, dass in gealterter Haut – im Vergleich zur Kontrolle (s. Abbildung 4-11B) – einzelne seneszente Zellen (türkis) auftreten, wobei auch hier kaum Stammzellen (braun) betroffen sind. Die Quantifizierung zeigt, dass der Seneszenz Index der HFSCs zwar geringfügig ansteigt, dies aber nicht signifikant ist (jung:  $1.40 \pm 0.49$ ; alt:  $3.45 \pm 0.51$  SA- $\beta$ -Gal-positive Zellen) (s. Abbildung 4-12A und C). Im Vergleich dazu wird nach Bestrahlung, wie auch schon bei der Apoptose, eine Anfärbung der Stammzellen mit SA- $\beta$ -Gal-Präzipitat nachgewiesen (schwarze Pfeile), die auch signifikant im Vergleich zur jungen Kontrolle zunimmt (bestrahlt:  $17.61 \pm 3.75$  SA- $\beta$ -Gal-positive Zellen).

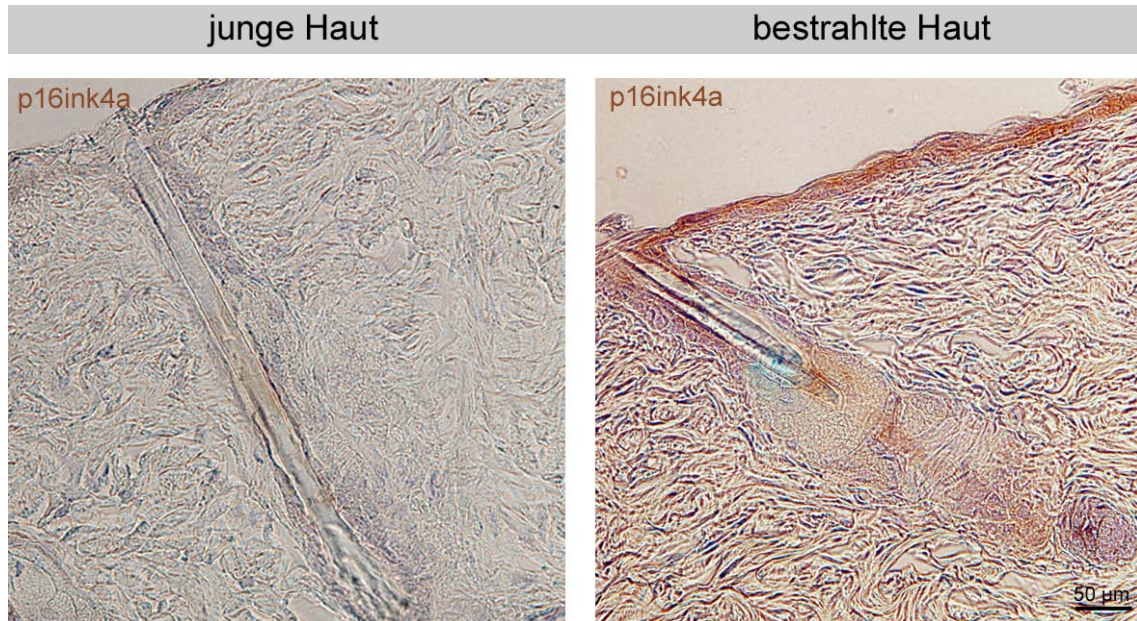


Abbildung 4-13: Lichtmikroskopische Untersuchung der Seneszenz mittels p16<sup>ink4a</sup>:

DAB Färbung des Seneszenzmarkers p16<sup>ink4a</sup> in jungen (2 Monate) und fraktioniert bestrahlten Hutproben (50 x 10 mGy, 72 h). Die Zunahme der p16<sup>ink4a</sup>-positiven Zellen (braun) infolge der Bestrahlung, im Vergleich zur jungen Kontrolle, untermauert die

Die Zunahme der Seneszenz infolge von Bestrahlung kann auch durch einen zweiten Marker der Seneszenz, den Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinase 2A (p16<sup>ink4a</sup>), bestätigt werden. Dabei zeigt sich in bestrahlter Haut, im Vergleich zur jungen Kontrolle, eine starke Anfärbung der Epidermis und auch der Zellen des Haarfollikels (braun) (s. Abbildung 4-13). Somit scheint die Bestrahlung im Gegensatz zur Alterung die Stilllegung der HFSCs in der Stammzellnische infolge von Seneszenz zu induzieren. Die Ergebnisse im Gewebeverband wurden durch die durchflusszytometrische Quantifizierung der Apoptose und der Seneszenz nochmals bestärkt (s. Abbildung 4-14). In gealterter Haut (obere Reihe) ist keine signifikante Erhöhung an Caspase-3, nur eine geringe Erhöhung ( $1.66 \pm 0.32$ ) von p16<sup>ink4a</sup>, normiert auf die Kontrolle in den CD34-positiven Stammzellen nachweisbar. Zudem wird die durch Bestrahlung (untere Reihe) erzeugte Apoptose und Seneszenz in den HFSCs (grün quergestreift) (Caspase-3:  $2.46 \pm 0.64$ ; p16<sup>ink4a</sup>:  $2.86 \pm 0.49$ ) erneut verdeutlicht. Bei näherer Betrachtung der Subpopulationen wird weiterhin aufgezeigt, dass die Zunahme fast vollständig auf die suprabasalen Stammzellen (CD34<sup>+</sup>/α6<sup>low</sup>) zurückzuführen (Caspase-3:  $3.45 \pm 0.55$ ; p16<sup>ink4a</sup>:  $4.03 \pm 2.31$ ) ist.

# Ergebnisse

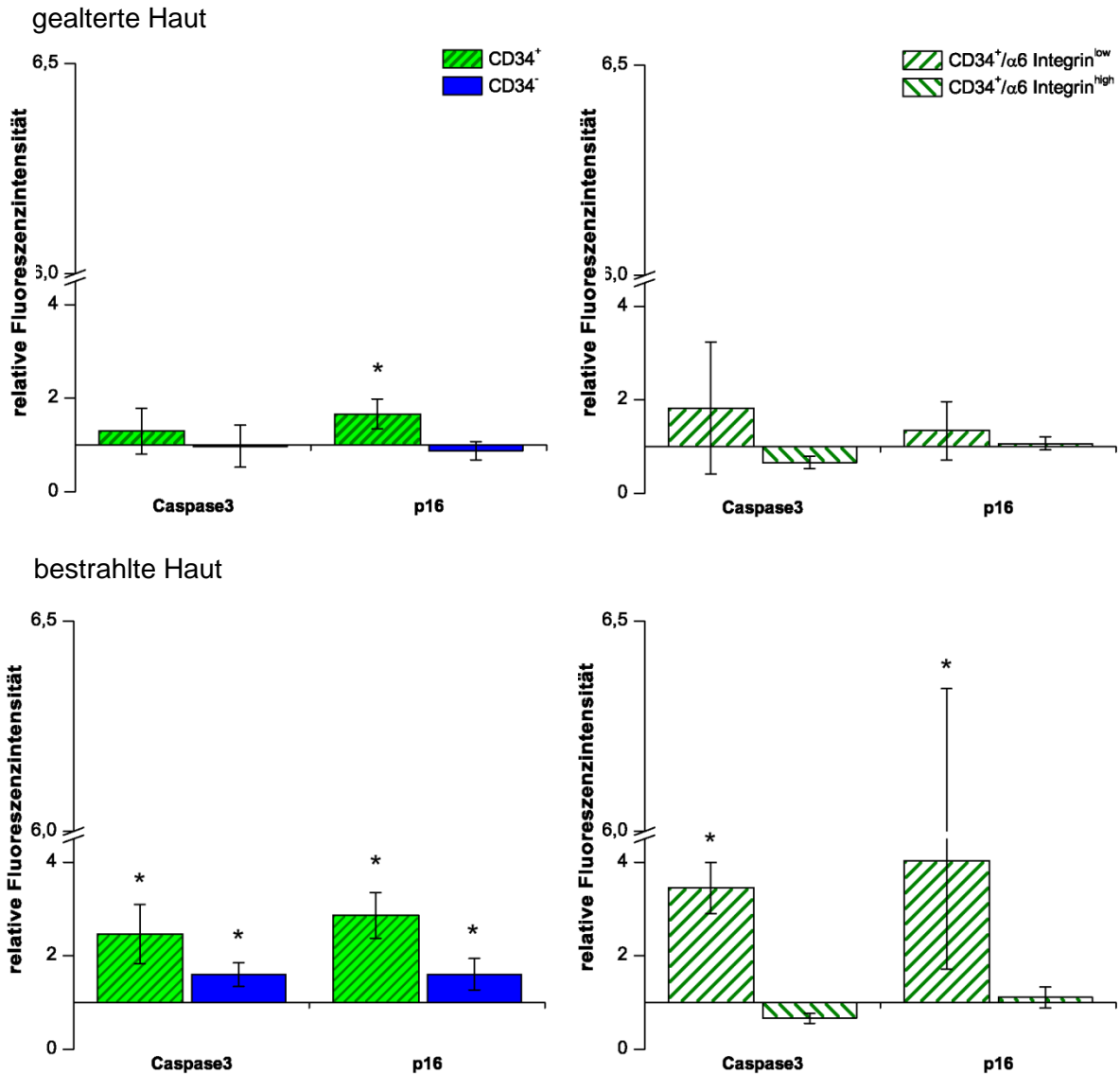


Abbildung 4-14: Durchflusszytometrische Analyse von Caspase-3 und p16<sup>ink4a</sup> in Zellpopulationen der Haut:

Dabei wurde die Fluoreszenzintensität der gealterten Haut (obere Reihe) und der bestrahlten Haut (untere Reihe) auf die der unbestrahlten Kontrollen normiert. Bei der Alterung ist nur eine leichte, aber signifikante Erhöhung des Seneszenz-assoziierten p16<sup>ink4a</sup> in den HFSCs erkennbar. Diese Zunahme kann aber keiner Stammzellpopulation (obere Reihe, rechtes Diagramm) zugeordnet werden. Demgegenüber weisen die CD34-positiven Zellen nach fraktionierter Bestrahlung eine starke Erhöhung der Caspase-3 und p16<sup>ink4a</sup> Fluoreszenzintensität auf. CD34-negative Zellen zeigen nur nach Bestrahlung eine signifikante Erhöhung beider Marker auf. Bei Betrachtung der einzelnen Stammzellpopulationen (untere Reihe, rechtes Diagramm) wird deutlich, dass nach Bestrahlung die suprabasalen HFSCs (CD34<sup>+</sup>/α6Integrin<sup>low</sup>) stimuliert werden. \*: signifikant erhöht im Vergleich zur normierten Kontrolle; p ≤ 0.05.

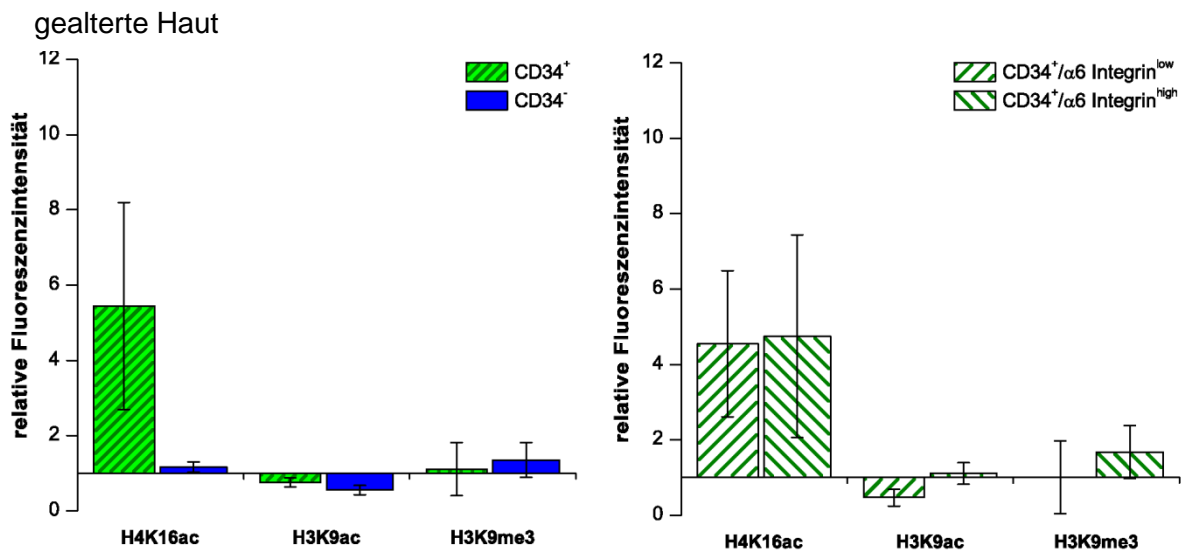
Daraus lässt sich schließen, dass trotz Alterung – im Gegensatz zur stetigen Stimulation mit sehr niedrigen Dosen – die Stammzellen weder in größerer Zahl in Apoptose noch in Seneszenz übergehen. Zudem wird deutlich, dass durch die Bestrahlung nur die suprabasalen HFSCs abgetötet oder stillgelegt werden, die basalen Stammzellen aber keine Veränderungen aufweisen.



## 4.4.2 ALTERUNG ERZEUGT ÖFFNUNG DES CHROMATINS

In Hinblick auf die nachgewiesene altersabhängige Veränderung der DNA-Reparatur, sowie dem Zusammenhang zwischen DNA-Reparatur und der spezifischen Chromatinumgebung (Rübe, C. E., *et al.*, 2011b; van Attikum, H. und Gasser, S. M., 2005), soll untersucht werden, ob es auch in Folge der Alterung zu Veränderungen im Chromatinstatus kommt. Dafür wurden drei verschiedene Histonmodifikationen, die unterschiedliche Chromatinzustände markieren (offenes Chromatin: H4K16ac und H3K9ac; geschlossenes Chromatin: H3K9me3), in den unterschiedlichen Zellpopulationen von gealterter (24 Monate) (s. Abbildung 4-15A) und bestrahlter Haut (20 x 10 mGy) (s. Abbildung 4-15B) mittels Durchflusszytometrie analysiert und auf die Kontrolle normiert.

A



B

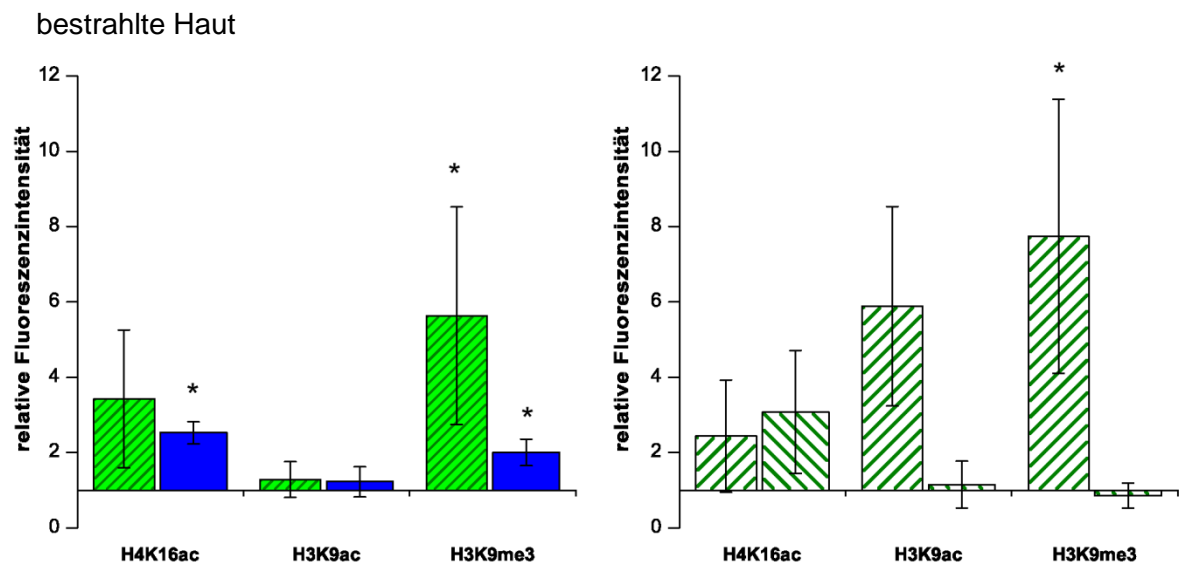


Abbildung 4-15: Chromatinveränderungen:

Durchflusszytometrische Analyse verschiedener Histonmodifikationen in gealterter (A) und bestrahlter Haut (B). Dabei werden die CD34-positiven und -negativen Zellen (linkes Diagramm) sowie die beiden Stammzellpopulationen (rechtes Diagramm) erfasst. A: Mit dem Alter weisen die CD34-positiven Stammzellen sowie beide Stammzellpopulationen

(CD34<sup>+</sup>/α6<sup>low</sup> und CD34<sup>+</sup>/α6<sup>high</sup>) eine Erhöhung an H4K16ac normiert auf die junge Kontrolle auf. B: Nach fraktionierter Bestrahlung weisen alle Populationen eine Erhöhung an H4K16ac auf. Hervor sticht die starke Zunahme an H3K9me3 in CD34<sup>+</sup> Zellen, bedingt durch starke Zunahme in den suprabasalen HFSCs, und den CD34<sup>-</sup> Zellen. \*: signifikant erhöht im Vergleich zur normierten Kontrolle; p ≤ 0.05.

Infolge von Alterung kommt es zu einer Erhöhung der relativen Fluoreszenz von H4K16ac – einem Marker für offenes Chromatin – in den CD34-positiven Zellen (grün, quergestreift) (Abbildung 4-15A, linkes Diagramm). Die Zunahme von H4K16ac in den Stammzellen scheint zudem in beiden Subpopulationen gleich verteilt zu sein (CD34<sup>+</sup>/α6<sup>low</sup>: 4.55 ± 1.94; CD34<sup>+</sup>/α6<sup>high</sup>: 4.74 ± 2.69 relative Fluoreszenzintensität) (rechtes Diagramm). Im Gegensatz dazu ist nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung (Abbildung 4-15B) eine Zunahme an H4K16ac in CD34-positiven und -negativen Zellen nachweisbar (CD34<sup>+</sup>: 3,42 ± 1,83; CD34<sup>-</sup>: 2,53 ± 0,30 relative Fluoreszenzintensität). Zudem zeigt sich eine starke Erhöhung von H3K9me3 in den CD34-positiven und CD34-negativen Zellen (CD34<sup>+</sup>: 5.64 ± 2.89; CD34<sup>-</sup>: 2.01 ± 0.35 relative Fluoreszenzintensität). Der Zuwachs an H4K16ac ist auch nach Bestrahlung in beiden Stammzellpopulationen gleichverteilt, während die Erhöhung von H3K9me3 nur durch die suprabasalen HFSCs (CD34<sup>+</sup>/α6<sup>low</sup>) (7.74 ± 3.64 relative Fluoreszenzintensität) bedingt ist (rechtes Diagramm).

Zusammenfassend kommt es durch exogene und endogene Stimulation zu einem gesteigerten Gehalt an H4K16ac in den Stammzellen, während nur infolge einer exogenen Stimulation vermehrt H3K9me3 detektierbar ist.

#### 4.4.3 ALTERUNG ERZEUGT KEINE VERSTÄRKTE TRANSKRIPTION VON GENEN DER DNA-REPARATUR

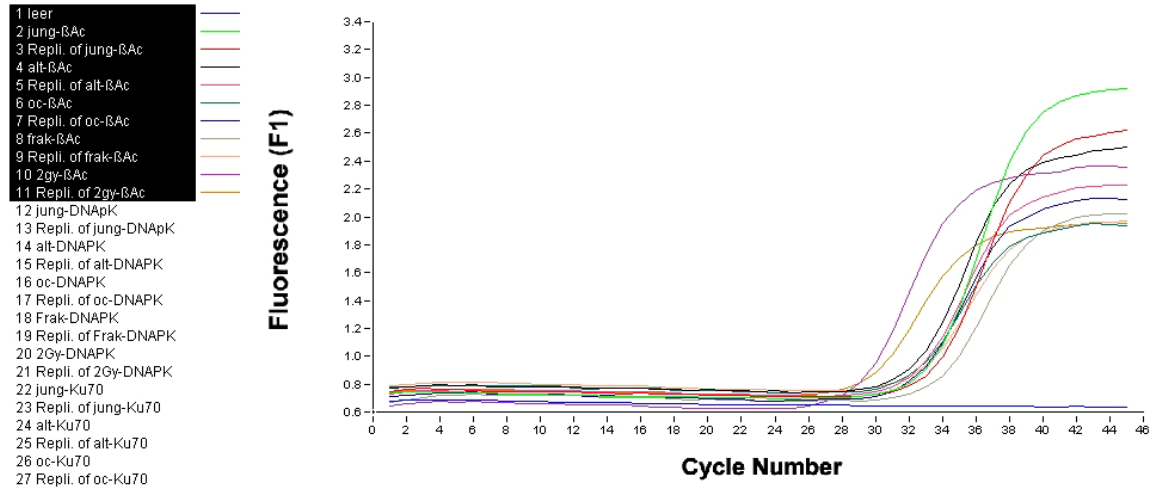
Durch die bisherigen Ergebnisse kommt die Frage auf, ob das gesteigerte Vorkommen der Reparaturproteine 53BP1 und pKu70, das im Gewebeverband wie auch in der Durchflusszytometrie nachgewiesen wurde, auf eine gesteigerte genetische Aktivität zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde Haut von 3 Monate und 24 Monate alten Tieren, sowie nach fraktionierter Bestrahlung (50 x 10 mGy, 72 h) entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus den verschiedenen Proben wurde im Anschluss RNA isoliert und die enthaltene mRNA spezifisch in cDNA konvertiert. Die vorliegende Menge an cDNA von bestimmten Genen der DNA-Reparatur (TP53BP1 (53BP1), XRCC6 (Ku70), PRKDC (DNA-PKcs)), sowie des anti-apoptotischen BCL2 (Bcl-2), wurde mittels qPCR quantifiziert. Dabei wird mit steigendem PCR Zyklus die Menge an spezifischem Produkt anhand des ansteigenden Fluoreszenzsignals gemessen. Da schon geringste Mengenunterschiede an eingesetzter cDNA das spätere Ergebnis verfälschen können, werden zur internen Validierung jeder Probe immer Duplikate verwendet (s. beispielhaft Abbildung 4-16A).



A

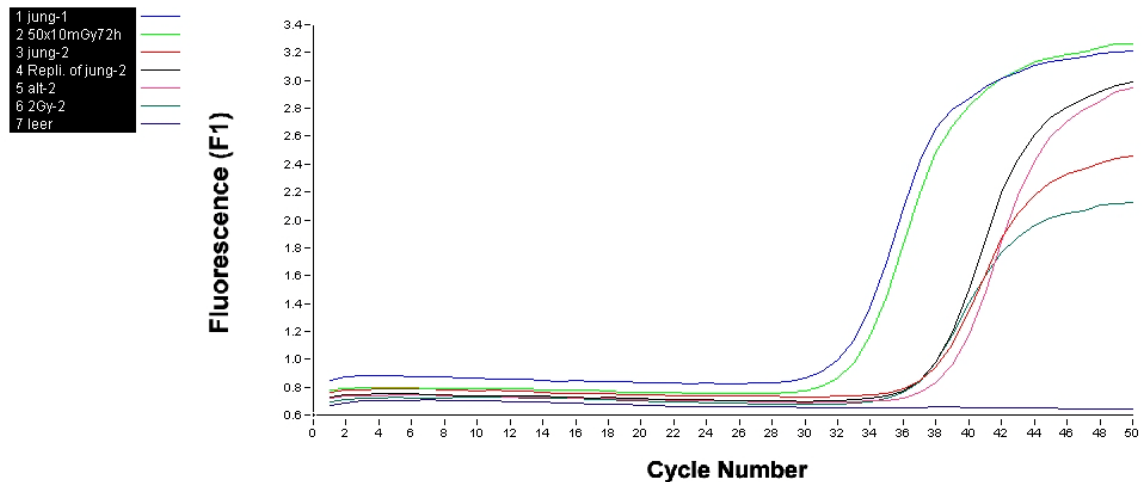
File: C:\LightCycler33\Users\LC\_User\Data\Wadine RT109-08-12\_β-Actin-DNA-PK-Ku70\_30µl.ABT Program: amplification Run By: LC\_User  
Run Date: Aug 09, 2012 11:26 Print Date: September 06, 2012

ACTB



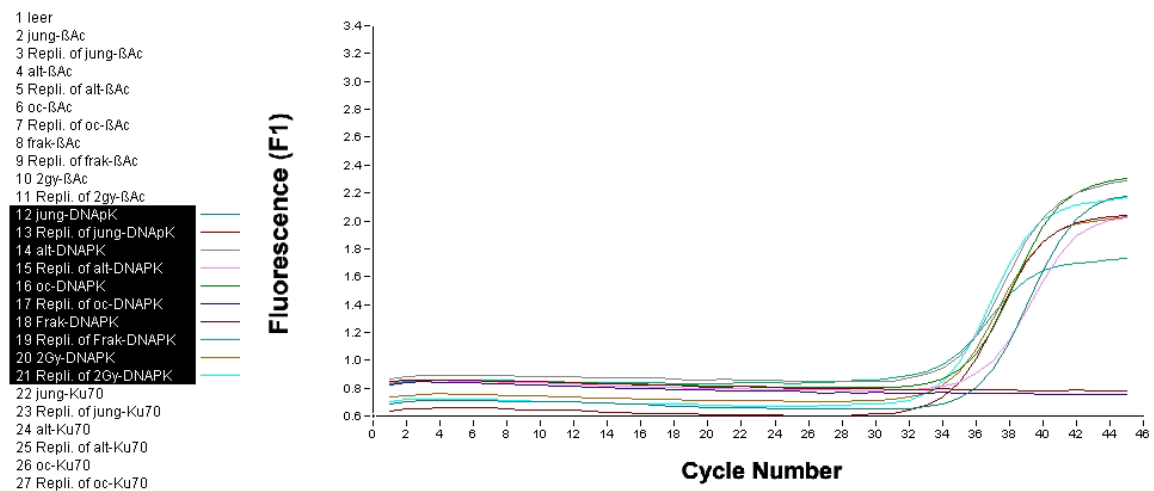
File: C:\LightCycler33\Users\LC\_User\Data\Wadine RT17-8-12-53BP1.ABT Program: amplification Run By: LC\_User  
Run Date: Aug 07, 2012 12:30 Print Date: September 06, 2012

TP53BP1



File: C:\LightCycler33\Users\LC\_User\Data\Wadine RT109-08-12\_β-Actin-DNA-PK-Ku70\_30µl.ABT Program: amplification Run By: LC\_User  
Run Date: Aug 09, 2012 11:26 Print Date: September 06, 2012

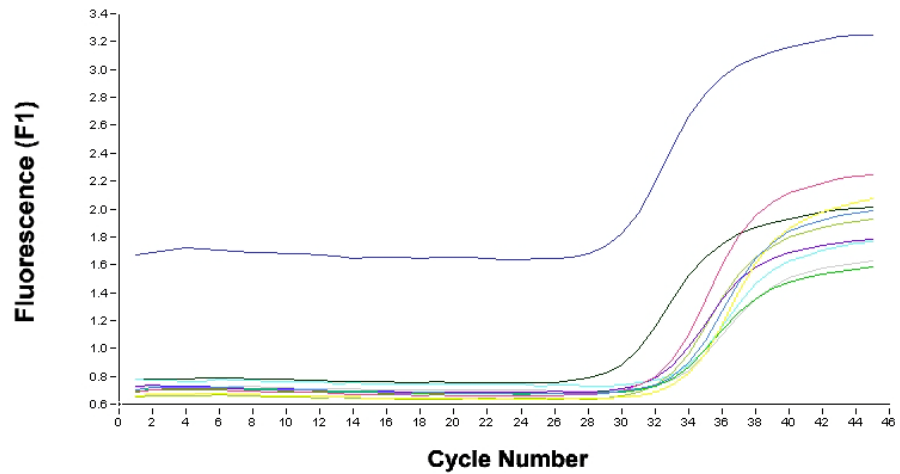
PRKDC



File: C:\LightCycler33\Users\LC\_User\Data\Wadine\_RT09-08-12\_β-Actin-DNA-PK-Ku70\_30µl.ABT Program: amplification Run By: LC\_User  
 Run Date: Aug 09, 2012 11:26 Print Date: September 06, 2012

## XRCC6

- 1 leer
- 2 jung-βAc
- 3 Repli. of jung-βAc
- 4 alt-βAc
- 5 Repli. of alt-βAc
- 6 oc-βAc
- 7 Repli. of oc-βAc
- 8 frak-βAc
- 9 Repli. of frak-βAc
- 10 2gy-βAc
- 11 Repli. of 2gy-βAc
- 12 jung-DNAPK
- 13 Repli. of jung-DNAPK
- 14 alt-DNAPK
- 15 Repli. of alt-DNAPK
- 16 oc-DNAPK
- 17 Repli. of oc-DNAPK
- 18 Frak-DNAPK
- 19 Repli. of Frak-DNAPK
- 20 2Gy-DNAPK
- 21 Repli. of 2Gy-DNAPK
- 22 jung-Ku70
- 23 Repli. of jung-Ku70
- 24 alt-Ku70
- 25 Repli. of alt-Ku70
- 26 oc-Ku70
- 27 Repli. of oc-Ku70
- 28 Frak-Ku70
- 29 Repli. of Frak-Ku70
- 30 2Gy-Ku70
- 31 Repli. of 2Gy-Ku70



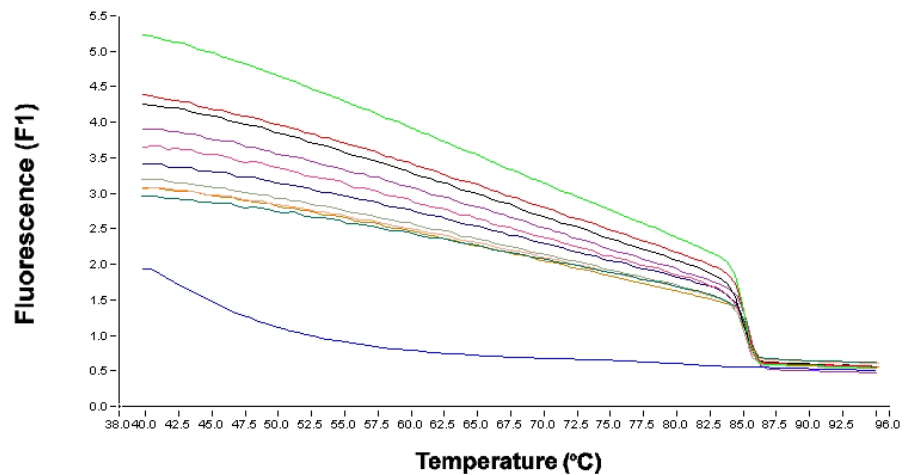
Start cursor: 0:17:32.8 Stop cursor: 2:03:34.6

## B

File: C:\LightCycler33\Users\LC\_User\Data\Wadine\_RT09-08-12\_β-Actin-DNA-PK-Ku70\_30µl.ABT Program: melting curve Run By: LC\_User  
 Run Date: Aug 09, 2012 11:26 Print Date: September 06, 2012

## ACTB

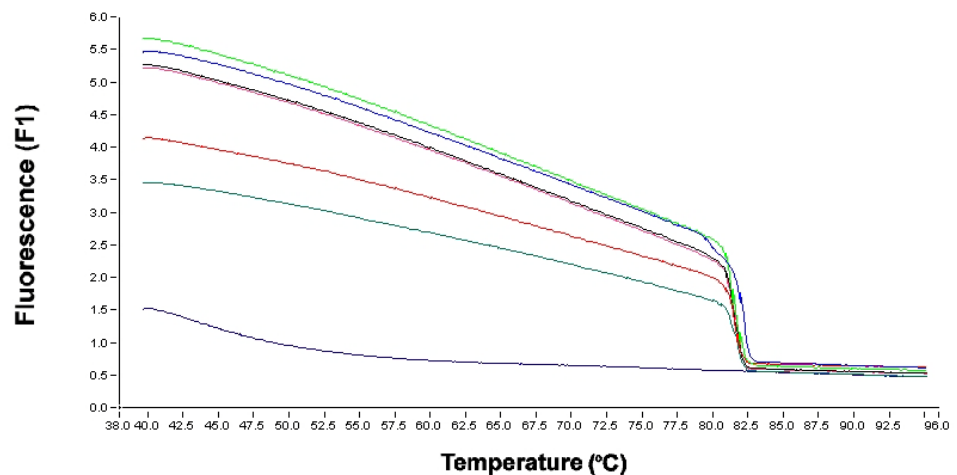
- 1 leer
- 2 jung-βAc
- 3 Repli. of jung-βAc
- 4 alt-βAc
- 5 Repli. of alt-βAc
- 6 oc-βAc
- 7 Repli. of oc-βAc
- 8 frak-βAc
- 9 Repli. of frak-βAc
- 10 2gy-βAc
- 11 Repli. of 2gy-βAc
- 12 jung-DNAPK
- 13 Repli. of jung-DNAPK
- 14 alt-DNAPK
- 15 Repli. of alt-DNAPK
- 16 oc-DNAPK
- 17 Repli. of oc-DNAPK
- 18 Frak-DNAPK
- 19 Repli. of Frak-DNAPK
- 20 2Gy-DNAPK
- 21 Repli. of 2Gy-DNAPK
- 22 jung-Ku70
- 23 Repli. of jung-Ku70
- 24 alt-Ku70
- 25 Repli. of alt-Ku70
- 26 oc-Ku70
- 27 Repli. of oc-Ku70



File: C:\LightCycler33\Users\LC\_User\Data\Wadine\_RT07-8-12-53BP1.ABT Program: melting curve Run By: LC\_User  
 Run Date: Aug 07, 2012 12:30 Print Date: September 06, 2012

## TP53BP1

- 1 jung-1
- 2 50x10mGy72h
- 3 jung-2
- 4 Repli. of jung-2
- 5 alt-2
- 6 2Gy-2
- 7 leer



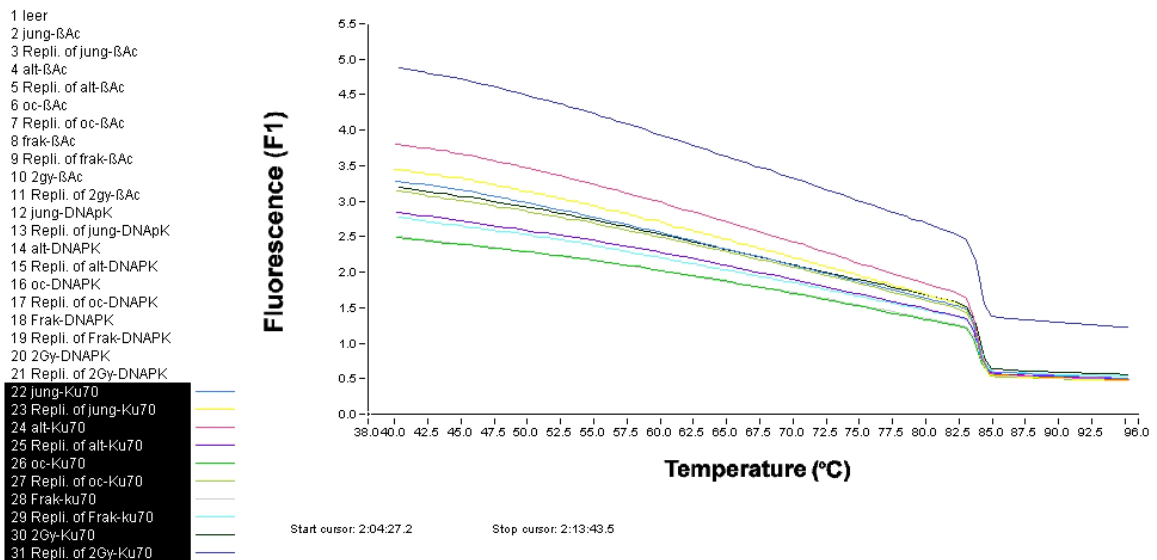
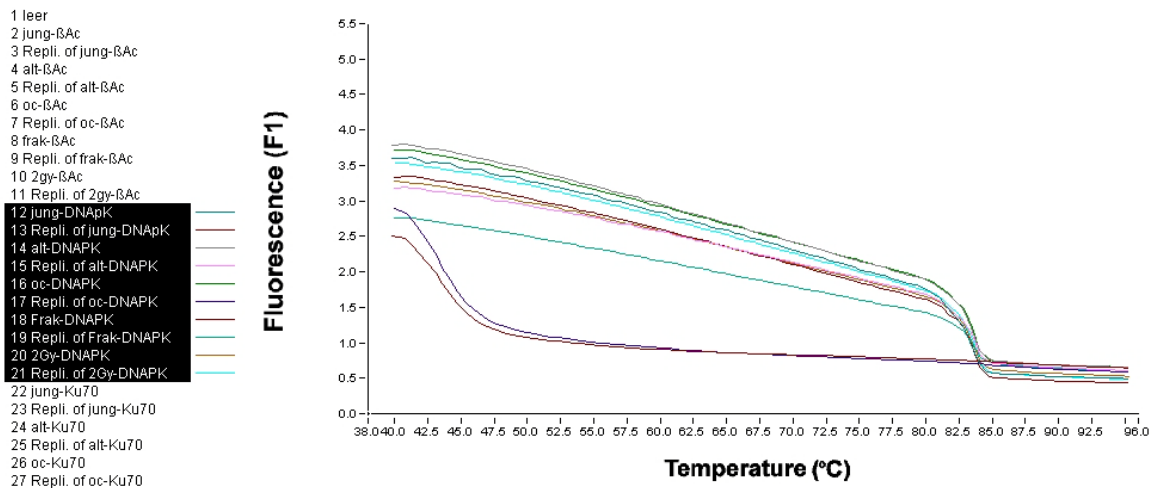


Abbildung 4-16: Beispielhafte Amplifikations- (A) und Schmelzkurven (B) der qPCR:

A: Amplifikationskurven von ACTB (β-Aktin), TP53BP1 (53BP1), PRKDC (DNAPKcs) und XRCC6 (Ku70). Die einzelnen cDNA Proben wurden dabei als Duplikate gefahren. B: Schmelzkurven von ACTB (β-Aktin), TP53BP1 (53BP1), PRKDC (DNAPKcs) und XRCC6 (Ku70). Dabei zeigt sich, dass bei erfolgreich amplifizierten Proben eine diskrete Schmelztemperatur vorliegt, bei der die Fluoreszenz aller spezifischen Proben gleichzeitig abbricht, was die Spezifität des PCR-Produktes widerspiegelt.

Neben der internen Validierung werden die amplifizierten Produkte jeder Probe noch auf ihre Spezifität hin überprüft. Zum Nachweis der Spezifität wurde die Schmelzkurve jedes PCR-Produktes herangezogen (s. beispielhaft Abbildung 4-16B). Dabei wird das PCR-Produkt so lange erhitzt, bis die Fluoreszenz des Produktes abbricht. Diese Temperatur entspricht dem spezifischen Schmelzpunkt. Ein erfolgreicher PCR Lauf wurde somit anhand der nicht amplifizierten Negativkontrolle – die keine cDNA enthält – und der gleichbleibenden Schmelzkurve mit der spezifischen Schmelztemperatur festgestellt.

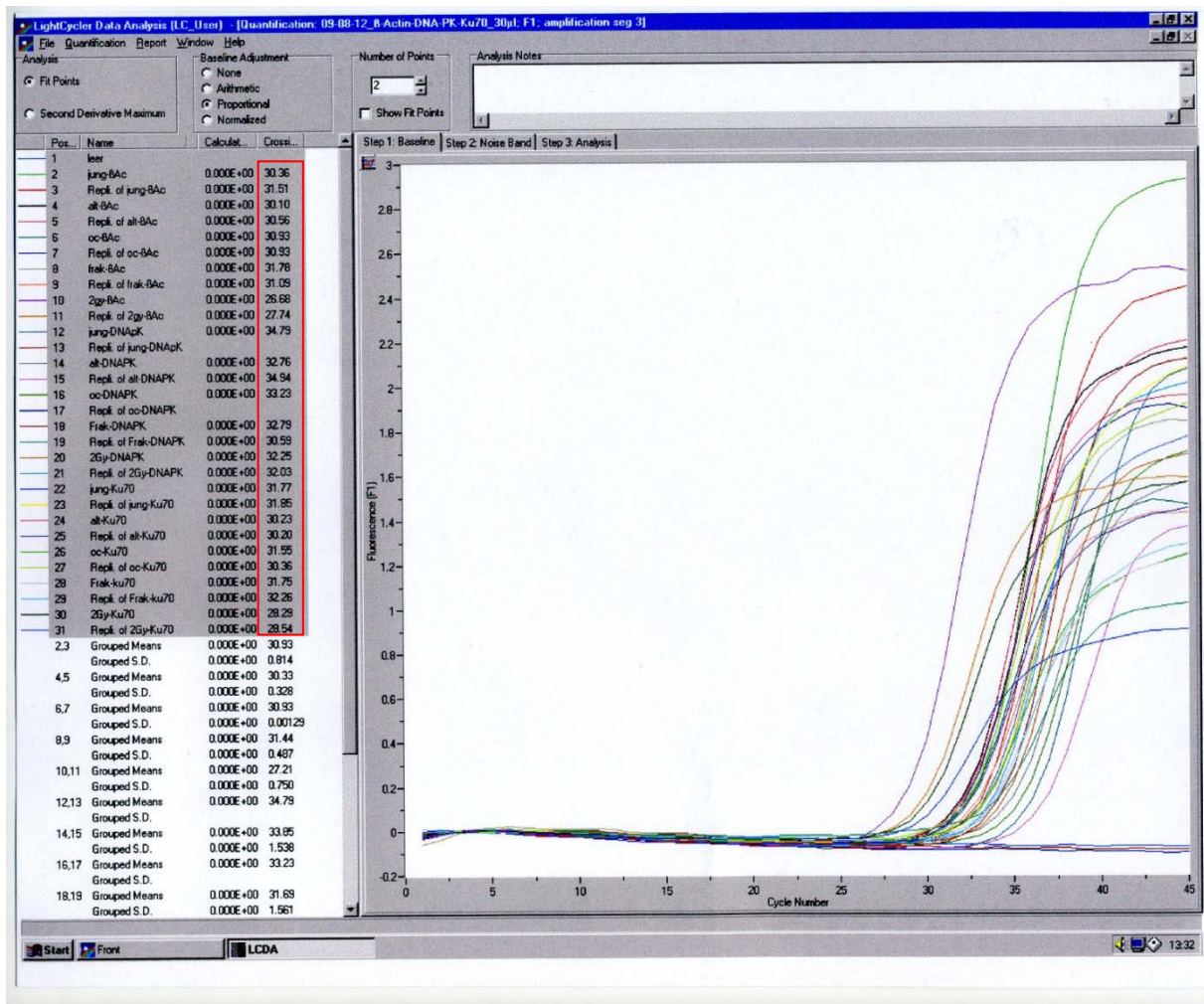


Abbildung 4-17: QPCR Auswertung durch die „real time“ Software:

Bei der Auswertung der amplifizierten cDNA Proben, gibt die „real time“ Software einen entsprechenden Ct-Wert an (roter Rahmen), der danach rechnerisch die relative Quantifizierung der Proben ermöglicht.

Für die nachfolgende Quantifizierung wurden, wie in Abbildung 4-17 beispielhaft zu sehen, die von der „real time“ Software angegebenen Ct-Werte nach jedem erfolgreichen Lauf herangezogen und im Anschluss der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Versuchen relativ zum Haushaltsgen ACTB ( $\beta$ -Aktin) angegeben. Dieses Referenzgen ist notwendig, um zum Beispiel Konzentrationsunterschiede im Untersuchungsmaterial zwischen den Replikaten wieder auszugleichen. Zur nachfolgenden Analyse wurde die Expression in den 24 Monate alten und den fraktioniert bestrahlten Hautproben (50 x 10 mGy, 72 h) relativ zur jungen Kontrolle angegeben. Somit zeigt sich in Abbildung 4-18, die n-fache Expression der einzelnen Gene relativ zur Kontrolle, die bei 1 liegt. Gene, die infolge von Alterung oder auch Bestrahlung einen Wert  $>1$  aufweisen, werden somit stärker exprimiert als in der Kontrolle, während Gene mit einem Wert  $<1$  eine geringere Expression besitzen.

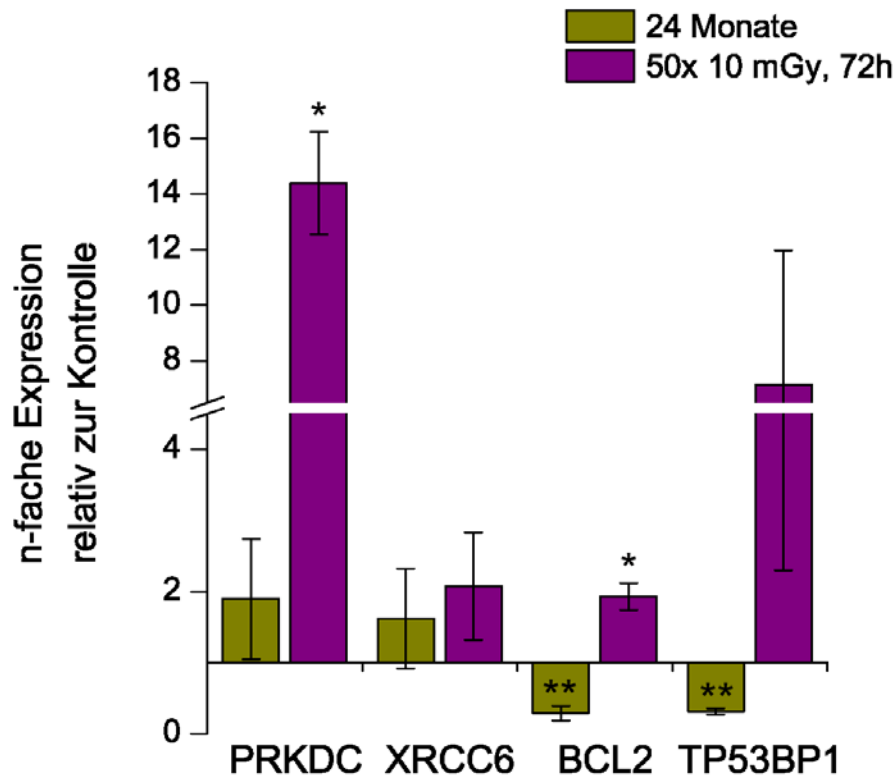


Abbildung 4-18: Expressionsanalyse:

Transkription der Gene TP53BP1 (53BP1), XRCC6 (Ku70), PRKDC (DNA-PKcs) und BCL2 (Bcl-2) in der Haut von 24 Monate alten (lila) und bestrahlten (50 x 10 mGy, 72 h; grün) Tieren relativ zur unbestrahlten jungen Kontrolle. Im Gegensatz zu Alterung stimuliert Bestrahlung die Transkription von Reparaturgenen (z.B. PRKDC) und des antiapoptotischen BCL2. \*: signifikant erhöht im Vergleich zur normierten Kontrolle;  $p \leq 0.05$ . \*\*: signifikant vermindert im Vergleich zur normierten Kontrolle;  $p \leq 0.05$ .

Unter diesem Aspekt zeigt sich in Abbildung 4-18 altersabhängig keine Erhöhung der Expression von PRKDC und XRCC6 (grün). Demgegenüber weisen die Gene BCL2 und TP53BP1 sogar eine signifikante Abnahme (\*\*) der Expression mit dem Alter auf (BCL2:  $0.29 \pm 0.10$ ; TP53BP1:  $0.32 \pm 0.04$ ). Im Gegensatz zur Alterung zeigt sich nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung in allen Genen eine Erhöhung der Transkription relativ zur Kontrolle (lila). Diese Erhöhung ist aber nur in den Fällen von PRKDC und BCL2 signifikant (\*) (PRKDC:  $14.38 \pm 1.84$ ; BCL2:  $1.93 \pm 0.19$ ).

Diese Ergebnisse weisen somit darauf hin, dass die altersabhängige Zunahme an 53BP1 nicht durch eine gesteigerte Transkription des Gens TP53BP1 induziert wird. Im Gegensatz zur Alterung wird die Zunahme der Reparaturproteine nach Bestrahlung aber sehr wohl durch eine gesteigerte Transkription von Reparaturgenen, wie TP53BP1 und PRKDC, erzeugt.

## 4.4.4 NF- $\kappa$ B EXPRESSION MIT ZUNEHMENDEN DNA-SCHÄDEN

Das altersabhängige Verhalten der Stammzellen zeigte bisher weder eine Stilllegung infolge von Apoptose oder Seneszenz, noch einen gesteigerten Schutz infolge der transkriptionellen Stimulation von Bcl-2. Aus diesem Grund wurde ein weiterer altersabhängiger Modulator untersucht, der die Aktivität verschiedener Gene der Apoptose, Seneszenz und Entzündung kontrolliert, nämlich NF- $\kappa$ B. Dabei liegen die Transkriptionsfaktoren des NF- $\kappa$ B-Signalweges als Komplex mit I $\kappa$ B Proteinen inaktiv im Zytoplasma vor. Bei Aktivierung dieses Signalweges infolge von verschiedenen Stressfaktoren wird I $\kappa$ B $\alpha$  am Serin 32 und 36 phosphoryliert, was zur Freisetzung von NF- $\kappa$ B und seinem Transport in den Kern führt. Um die Aktivität des NF- $\kappa$ B-Signalweges mittels Immunfluoreszenz zu analysieren, wurde deshalb ein spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierte Form des I $\kappa$ B $\alpha$  (Ser32/36) verwendet. Dieser Antikörper wurde in Kombination mit CD34 und dem Proliferationsmarker Ki67 zur altersabhängigen Untersuchung von C57BL/6 (24 Monate) und SCID (12 Monate) Mäusen, sowie nach fraktionierter Bestrahlung (50 x 10 mG, 72 h) im Vergleich zur Kontrolle (3 Monate), herangezogen (s. Abbildung 4-19). Altersabhängig zeigt sich in den reparaturprofizienten Mäusen eine gesteigerte Anzahl an NF- $\kappa$ B-positiven Zellen (grün) (B), die in den 3 Monate alten Tieren noch nicht nachzuweisen sind (A). Die NF- $\kappa$ B-positiven Zellen sind aber CD34-negativ und liegen meist im Haarfollikel unterhalb der bulge Region oder auch in der interfollikulären Epidermis. Ein vergleichbares Ergebnis kann auch nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung (E) aufgezeigt werden. Im Gegensatz zu den C57BL/6 Mäusen weisen die reparaturdefizienten SCID Mäuse (C und D) schon in jungen Jahren (C) NF- $\kappa$ B-positiv Zellen außerhalb, und mit steigendem Alter (D) auch innerhalb der bulge Region (weiße Pfeile), auf. Durch die Anhäufung der NF- $\kappa$ B-positiven Zellen in den differenzierten und teilweise proliferierenden Zellpopulationen könnte es einen Zusammenhang zwischen Proliferation und der Induktion des NF- $\kappa$ B Weges geben. Dieser Zusammenhang wird durch die Anfärbung von Ki67-positiven, proliferierenden Funktionszellen (rot) mit NF- $\kappa$ B (grün) (F), aber nicht umgekehrt, bestätigt. Somit scheint die Proliferation bei gesteigertem DNA-Schaden die Aktivität des NF- $\kappa$ B Weges zu benötigen.



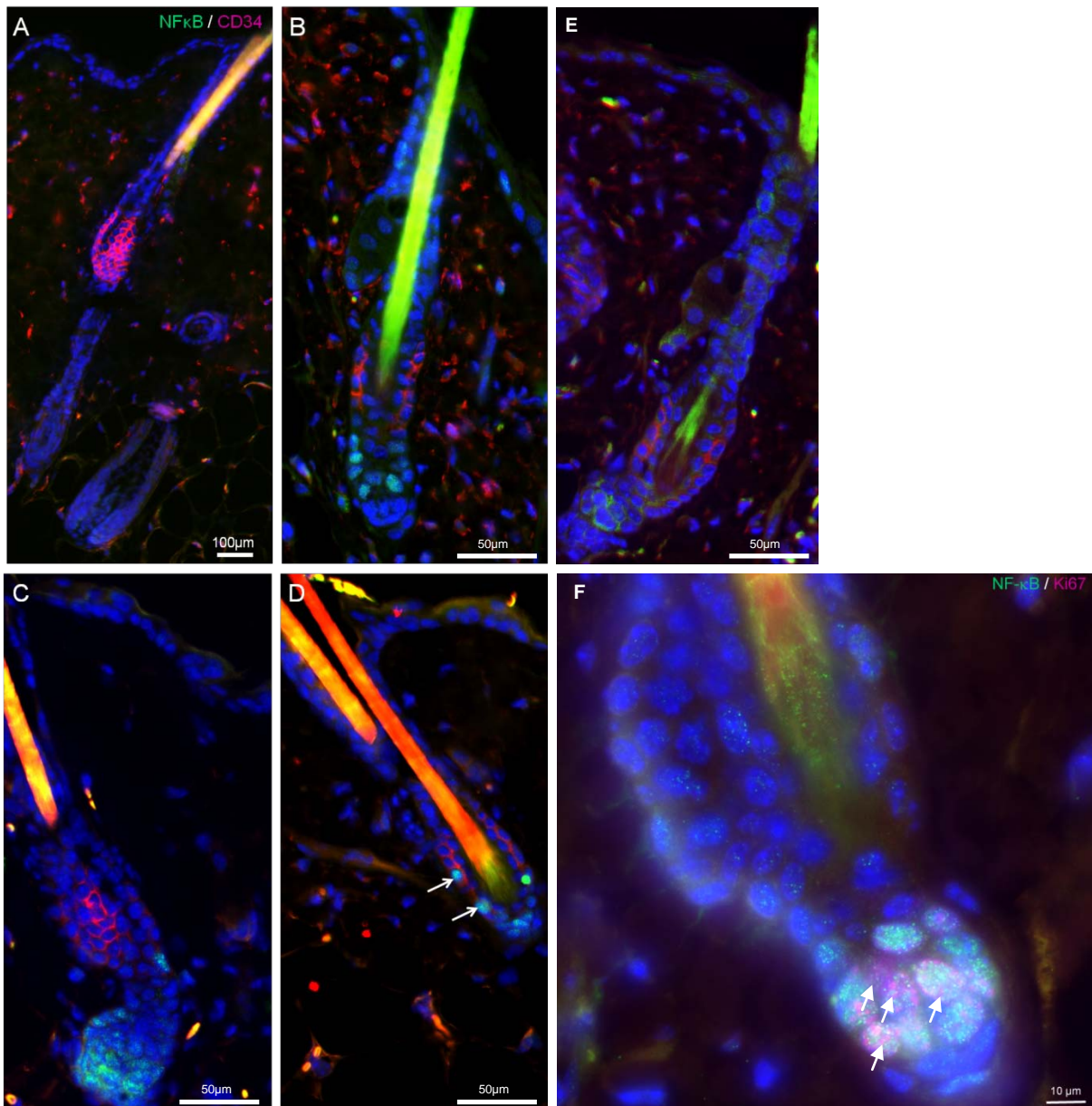


Abbildung 4-19: Aktivierung des NF-κB-Signalweges:

Immunfluoreszenz Doppelfärbung mittels pIκBα (NF-κB) (grün) und CD34 (rot) (A-E), sowie mit Ki67 (rot) (F). Dabei werden 3 Monate (A + E) und 24 Monate (B) alte C57BL/6 Mäuse, sowie 3 Monate (C) und 12 Monate alte (D + F) SCID Mäuse analysiert. Mit steigendem Alter zeigt sich in den C57BL/6 Mäusen (B) eine gesteigerte Zahl an NF-κB-positiven Zellen im Vergleich zur Kontrolle (A), die aber nicht CD34-positiv sind. Ein vergleichbarer Zustand kann auch nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung (E) gefunden werden. In den SCID Tieren sind schon mit 3 Monaten NF-κB-positive Zellen außerhalb der bulge Region zu erkennen (C), die sich mit dem Alter auch in der Stammzellregion nachweisen lassen (weiße Pfeile) (D). Durch eine pIκBα/Ki67 Doppelfärbung in 12 Monate alten SCID Mäusen (F) wird zudem klar, dass ein Teil der NF-κB-positiven Zellen (grün) auch Ki67 (rot) positiv ist (weiße Pfeile).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der NF-κB Signalweg nach Alterung und fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung angeschaltet wird. Eine steigende Schädigung der DNA scheint neben einer vermehrten Aktivierung in differenzierten Zellen auch den Signalweg in den Stammzellen anzuschalten. Durch die simultane Anfärbung von Ki67 und NF-κB wird zudem deutlich, dass Zellen die Aktivierung des NF-κB Signalweges brauchen,

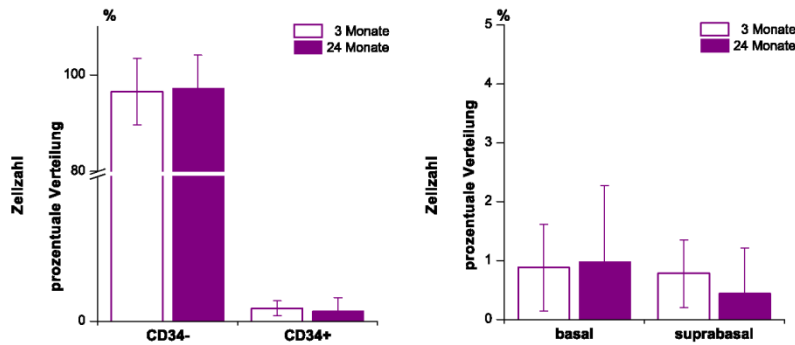


um sich weiter zu teilen. Dies deutet darauf hin, dass der NF- $\kappa$ B Signalweg ein Schutzmechanismus ist, der erst ab einer starken Schädigung der DNA auch in der Stammzellregion zum Tragen kommt.

#### 4.4.5 ALTERUNG ERZEUGT KEINE VERÄNDERUNG IN DER ZAHL DER STAMMZELLEN

Unter Berücksichtigung der exogen und endogen induzierten Akkumulation von DNA-Schäden, sowie der propagierten Veränderungen in der Anzahl der Stammzellen, die für andere Stammzellpopulationen (hämatopoetische Stammzellen) beschrieben wird (Morrison, S. J., *et al.*, 1996b), soll abschließend festgestellt werden, ob sich die Anzahl der HFSCs durch die Ansammlung von 53BP1 verändert. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde im Zuge der durchflusszytometrischen Analysen in gealterter und bestrahlter Haut die Zahl der gemessenen Zellen jeder Population dokumentiert. Im Anschluss wurde die Zahl der Zellen jeder Population auf die Gesamtzahl der gemessenen Epidermiszellen normiert. Dieser Vorgang wurde bei allen untersuchten Markern (jeweils zehn) und in drei unterschiedlichen Tieren durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet. Das Ergebnis der prozentualen Verteilung der Zellzahl ist in Abbildung 4-20 zu sehen. Dadurch ist ersichtlich, dass in gealterter Haut weder in der CD34-positiven noch der CD34-negativen Zellpopulation eine nennenswerte Veränderung der prozentualen Verteilung im Vergleich zu 3 Monate alten Mäusen nachweisbar ist (A).

## A gealterte Haut



## B bestrahlte Haut

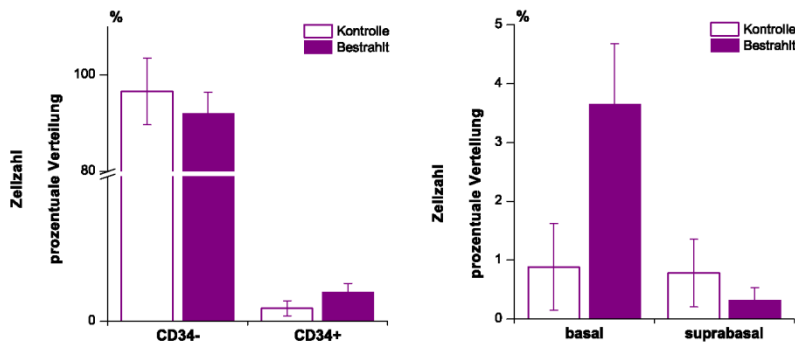


Abbildung 4-20: Veränderungen der Zellzahl:

A: Prozentuale Verteilung der CD34-positiven, basalen und suprabasalen Zellen, sowie der CD34-negativen Zellen in 3 und 24 Monate alten Hautproben. B: Prozentuale Verteilung der CD34-positiven, basalen und suprabasalen Zellen, sowie der CD34-negativen Zellen vor und nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung. Dabei wird eine Zunahme der basalen Stammzellen nach Bestrahlung nachgewiesen.

Wohingegen nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung in der CD34-positiven Fraktion, im Gegensatz zur CD34-negativen, eine leichte Zunahme im Vergleich zur Kontrolle (Kontrolle:  $1.80\% \pm 1.02\%$ ; Bestrahlt:  $4.04\% \pm 1.18\%$ ) zu erahnen ist (B). Bei näherer Betrachtung der Subpopulationen wird klar, dass der prozentuale Anteil der basalen Stammzellen nach Bestrahlung ansteigt (Kontrolle:  $0.88 \pm 0.74\%$ ; Bestrahlt:  $3.65 \pm 1.03\%$ ), wohingegen die Zahl der suprabasalen Stammzellen leicht abnimmt (Kontrolle:  $0.78 \pm 0.57\%$ ; Bestrahlt:  $0.32 \pm 0.22\%$ ) (rechtes Diagramm).

Zusammenfassend unterstützt die gleichbleibende Verteilung der Zellzahlen infolge von Alterung die bisherigen Ergebnisse, bei denen keine Apoptose nachweisbar ist, die als mögliche Ursache für Veränderungen der Zellzahl hätte dienen können. Dementgegen erzeugt die fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung Apoptose in den suprabasalen Stammzellen was die Zahl leicht limitiert und somit die basalen Stammzellen möglicherweise zur Proliferation anregt.



Basierend auf allen Ergebnissen kommt es in den Stammzellen zu einer Akkumulation von 53BP1-Foci in Kombination mit einem Rückgang der Reparaturkapazität mit steigendem Alter. Diese Ansammlung von 53BP1, die auch durch Bestrahlung induziert werden konnte, wird nicht vornehmlich den Telomeren zugeordnet und weist keine Assoziation mit pKu70 auf. Bei genauer Betrachtung zeigt sich abhängig vom verwendeten Reiz eine unterschiedliche Verteilungen von 53BP1 im Kontext des Chromatins. Diese Unterschiede beeinflussen auch die biologischen Folgen für die Stammzellen. Denn infolge von endogen induzierter Alterung, die durch eine starke Ansammlung von 53BP1 in kleinen Clustern charakterisiert ist, sind keine erkennbaren Folgen für die Stammzellen nachweisbar. Im Gegensatz zur Alterung induziert die exogene Stimulation die Anhäufung von 53BP1 in einzelnen Großclustern, was Apoptose und Seneszenz in den Stammzellen, sowie eine Verschiebung der Zellzahl zwischen den Subpopulationen der Stammzellen, nachsichzieht.



## 5 DISKUSSION

Adulte Stammzellen sollten ihre genomische Integrität ein Leben lang aufrechterhalten, da sie als Reserve und Regenerationskraft für das gesamte zugehörige Gewebe dienen. Basierend auf dem postulierten Zusammenhang zwischen akkumulierenden Schäden und Alterung (Herbig, U., *et al.*, 2006) wird aber klar, dass insbesondere die langlebigen Stammzellen als mögliches Angriffsziel in Betracht kommen (Rübe, C. E., *et al.*, 2011a). Die daraus resultierenden Veränderungen könnten die Aktivität oder Zahl der Stammzellen beeinflussen (Chambers, S. M., *et al.*, 2007; Morrison, S. J., *et al.*, 1996b), was wiederum Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben könnte. Desweiteren scheint die Alterung von Stammzellen durch zwei wesentliche Elemente beeinflusst zu werden. Zum einen durch exogene Faktoren, die von den umliegenden Zellen, d.h. der Stammzellnische, produziert werden. Dieser Einfluss wird durch Untersuchungen an Fruchtfliegen (Boyle, M., *et al.*, 2007) bis hin zu Säugetieren untermauert, bei welchen eine Transplantation von bis zu drei Jahre alten spermatogonischen Stammzellen in eine junge Stammzellnische keine verschlechterte Funktion im Vergleich zu jungen Tieren aufwies (Ryu, B. Y., *et al.*, 2006). Zum anderen sind insbesondere endogene Prozesse innerhalb der Stammzelle für die altersabhängigen Veränderungen verantwortlich. Zu den endogenen Prozessen, die den Alterungsprozess zu fördern scheinen, zählen – wie schon im hämatopoetischen System des Menschen nachgewiesen – insbesondere die sich anhäufenden DNA-Schäden (Rübe, C. E., *et al.*, 2011a). Aus diesem Grund ist es das Ziel dieser Arbeit, den Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und Alterung in langlebigen adulten Stammzellen genauer zu charakterisieren und weiter die möglichen Folgen für die Stammzellen zu eruieren. Basierend auf der Tatsache, dass die Stammzellnische auch einen starken Einfluss auf die Alterung hat, war es in dieser Untersuchung besonders wichtig, den Alterungsprozess *in vivo* zu analysieren. Durch diese Versuchsanordnung ist man, im Unterschied zu Untersuchungen in der Zellkultur, in der Lage, ein reelleres Bild der Auswirkungen der Alterung auf den Prozess im Körper zu erstellen. Ein wesentlicher Punkt in den Untersuchungen war die Auswahl eines geeigneten Versuchsmodells, in dem *in vivo* eine definierte Stammzellpopulation und eine differenzierte Population an Funktionszellen identifiziert und untersucht werden kann. Dabei fiel die Wahl auf die Haut der adulten Maus, mit den beiden Populationen HFSCs und Keratinozyten. Ausschlaggebend für die Wahl waren mehrere Punkte. Zum einen können die HFSCs mit einem einzigen Marker, CD34, *in vivo* identifiziert werden (Trempey, C. S., *et al.*, 2003). Zweitens liegen die murinen HFSCs in relativ großer Zahl auf einem kleinen, abgegrenzten Raum – der bulge Region – vor, was eine Quantifizierung von nukleären Markern erleichtert. Drittens sind beide Populationen schon allein anhand ihrer Lage und Zellkernform identifizierbar, was besonders bei den HFSCs im TEM beispielhaft ist (Cotsarelis, G., *et al.*, 1990). Die Haut der adulten Maus ist somit ein gut geeignetes Modell, um Stammzellen in

ihrer spezifischen Stammzellnische, sowie im gleichen Zuge differenzierte Funktionszellen, untersuchen zu können.

## 5.1 53BP1-ZUNAHME IN ALTERNDEN UND BESTRAHLTEN STAMMZELLEN

Der Zusammenhang zwischen akkumulierenden DNA-Schäden und Alterung wurde schon in der DNA-Schadenstheorie der Alterung beschrieben, bei der die akkumulierenden DNA-Schäden als Ursache für die Alterserscheinungen im Vordergrund stehen (Failla, G., 1958; Szilard, L., 1959). Im Zusammenhang damit steht die Theorie der freien Radikale (englisch: free radical theory) (Harman, D., 1956). Bei dieser These wird die Zunahme von freien Radikalen mit dem Alter als mögliche Ursache für die Akkumulation der DNA-Schäden propagiert. Diese altersabhängige Zunahme der DNA-Schäden, die sich insbesondere in adulten Stammzellen manifestiert (Rossi, D. J., *et al.*, 2007), konnte in unseren Untersuchungen unter Verwendung der Immunfluoreszenz Doppelfärbung aus 53BP1 und CD34 auch in den HFSCs *in vivo* bestätigt werden. Basierend auf der Tatsache, dass ein Defekt des zentralen Proteins des NHEJ, DNA-PKcs, der Mitte der 50er Jahre zum ersten Mal nachgewiesen wurde, beim Menschen zu einer starken Lebenszeitverkürzung (Lebenserwartung ca. 2 Jahre) führt [(Glanzmann, E. und Riniker, P., 1950; Hitzig, W., *et al.*, 1958) zitiert nach (Bosma, M. J. und Carroll, A. M., 1991)], wurden die SCID Mäuse als eine Positivkontrolle verwendet. Dabei zeigt sich aber, dass die altersabhängige Zunahme an DNA-Schäden durch eine geminderte Reparaturkapazität stammzellspezifisch begünstigt wird. Dieser gesteigerte Einfluss auf die HFSCs kann durch Untersuchungen von Sotiropoulou und Mitarbeiter untermauert werden. In diesen Versuchen wurde aufgrund von Western Blot Untersuchungen eine sehr hohe Expression an DNA-PKcs in den CD34-positiven Stammzellen nachgewiesen (Sotiropoulou, P. A., *et al.*, 2010). Diese Zunahme konnte in dieser Untersuchung altersabhängig trotz der Ergebnisse in den SCID Mäusen und der Zunahme von pKu70 in der Durchflusszytometrie, das von DNA-PKcs nach seiner Bindung phosphoryliert wird (Chan, D. W., *et al.*, 1999), mittels qPCR nicht bestätigt werden. In Anbetracht der nachgewiesenen Erhöhung nach Bestrahlung, könnte es sich um ein Detektionsproblem aufgrund der Isolierung der RNA aus Gesamthaut handeln. Dadurch würde die Zunahme in einzelnen Zellen, wie den Stammzellen, verdeckt werden. Die Ursache für die nachgewiesene, altersabhängige Akkumulation von DNA-Schäden kann auf zwei Arten erklärt werden. Entweder es kommt durch die stetige Induktion von geringen Schäden langfristig zu einer Summation der Schäden, oder eine altersabhängige Abnahme der Reparaturkapazität fördert die Ansammlung der Schäden. Durch die Immunfluoreszenz Untersuchung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach 2 Gy Bestrahlung von unterschiedlich alten Mäusen konnte die Annahme bestätigt werden, dass die altersabhängige Zunahme an 53BP1-Foci mit einer verminderten Reparaturkapazität einhergeht. Dabei wurde aber auch

deutlich, dass sich in der Haut von Mäusen die Abnahme der Reparaturfähigkeit nicht auf die Stammzellpopulation beschränkt, wie durch die Untersuchung der SCID Mäuse vermutet, sondern in abgeschwächter Form auch in differenzierten Funktionszellen zu finden ist. Die altersabhängige Verschlechterung der DNA-Reparaturkapazität scheint aber nicht nur ein Phänomen der murinen Haut zu sein, denn ein vergleichbares Verhalten konnte auch in CD34-positiven und -negativen Blutzellen des Menschen mittels der Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX-Foci festgestellt werden (Rübe, C. E., *et al.*, 2011a). Trotz des Rückgangs der Reparatureffizienz mit steigendem Alter – in beiden Zelltypen – konnte in den Keratinozyten keine stetige Zunahme an 53BP1 in der Immunfluoreszenz, wie auch in der Durchflusszytometrie, nachgewiesen werden. Grund hierfür könnte die kurze Lebenszeit der Keratinozyten (8-9.5 Tage) [(Potten, C. S., *et al.*, 1987) zitiert nach (Koster, M. I., 2009)] sein, wodurch sich keine Schäden aufsummieren können. Entgegen dieser Ergebnisse zeigt sich im hämatopoetischen System des Menschen unter Verwendung der Immunfluoreszenz, dass sich die in Stammzellen akkumulierenden Schäden auch auf ihre nachfolgenden Tochterzellen übertragen, und sich somit auch in den differenzierten Zellen manifestieren (Rübe, C. E., *et al.*, 2011a). Dieser Unterschied könnte dadurch bedingt sein, dass die in der Immunfluoreszenz untersuchten Keratinozyten nicht die „normalen“ Nachfolgezellen der HFSCs darstellen. Denn die HFSCs dienen in der normalen Homöostase nur zur Aufrechterhaltung des Haarfollikels, weshalb die Keratinozyten der Epidermis durch eigene Stammzellen an der Basalmembran der Epidermis ersetzt werden [(Potten, C. S., 1974) zitiert nach (Kaur, P., 2006)]. Kommt es jedoch zu einer Schädigung der Haut, können Zellen des oberen Haarfollikels in die Epidermis einwandern und somit auch Zellen der Epidermis hervorbringen (Taylor, G., *et al.*, 2000). Basierend auf diesen Untersuchungen wäre eine nachfolgende Analyse von differenzierten Zellen des Haarfollikels von Interesse. Doch diese Zellen können aufgrund des stetigen Auf- und Abbaus bedingt durch den Haarzyklus nicht lückenlos über einen längeren Zeitraum *in vivo* analysiert werden (Lindner, G., *et al.*, 1997). Basierend auf der Theorie der freien Radikale (Harman, D., 1956), die altersbedingt diese DNA-Schäden induzieren sollen, und dem Wissen, dass nicht nur bei der Zellatmung ((Harman, D., 1972) zitiert nach (Harman, D., 2003)), sondern auch infolge von Bestrahlung die meisten DNA-Schäden durch freie Radikale entstehen (Rink, H., 1971), kann durch eine fraktionierte Niedrigdosisbestrahlung der Zusammenhang zwischen Alterung und DNA-Schäden noch genauer analysiert werden. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass es infolge von Alterung und Bestrahlung zur Aktivierung des NHEJ kommt, da neben 53BP1 auch pKu70, als zentrales Protein des NHEJ, das unabhängig von der Sequenz die beiden DSB-Enden während des gesamten Reparaturvorgangs in räumlicher Nähe hält (Schulte-Uentrop, L., *et al.*, 2008; Walker, J. R., *et al.*, 2001), hochreguliert ist. Somit kann durch die Verwendung dieses Modells der Einfluss von akkumulierenden DNA-Schäden auf die Alterung von

HFSCs nochmals verstärkt werden. Daneben erzeugt Bestrahlung, im Gegensatz zur Alterung, auch in den differenzierten Funktionszellen eine stetige Zunahme an Reparaturproteinen des NHEJ. Dieser Unterschied kann darauf zurückgeführt werden, dass es bei der Bestrahlung in einem kürzeren Zeitrahmen (Wochen), im Vergleich zur Alterung (Jahre), zu einer stetigen Induktion von DNA-Schäden kommt, was somit auch eine Akkumulation in den kurzlebigen Funktionszellen ermöglicht. Untermuert wird dies durch Immunfluoreszenz Untersuchungen, die eine Zunahme an DSBs nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung in den Zellen des Thymus nachgewiesen haben (Pogribny, I., *et al.*, 2005). In Anbetracht der Transitzeit von ca. 8-9.5 Tagen [(Potten, C. S., *et al.*, 1987) zitiert nach (Koster, M. I., 2009)] dürfte sich in den Keratinozyten der Epidermis nach der zehnten Fraktion eigentlich keine Erhöhung mehr einstellen. Da sich aber erst danach eine stetige Zunahme zeigt, könnte dies darauf hinweisen, dass langlebigere Zellen – z.B. Vorläuferzellen oder interfollikuläre Stammzellen – Schäden an die Keratinozyten weitergeben. Dieses Verhalten wurde schon *in vitro* durch die Mikroskopie von lebenden Zellen (englisch: life cell imaging) nachgewiesen (Lukas, C., *et al.*, 2011). Des Weiteren stimuliert Alterung die basalen Stammzellen, während es in Folge von Bestrahlung zur Aktivierung der suprabasalen Stammzellen kommt. Die beiden Populationen unterscheiden sich in der Durchflusszytometrie anhand der  $\alpha 6$  Integrin Expression und nach Untersuchungen von Blanpain und Mitautoren auch anhand ihrer Lage in der Stammzellregion. Die  $CD34^{+}/\alpha 6^{\text{high}}$  Zellen liegen dabei basal, direkt an der Basallamina, mit der sie auch verbunden sind, während die  $CD34^{+}/\alpha 6^{\text{low}}$  Zellen suprabasal, losgelöst von der Basalmembran innerhalb der bulge Region, angesiedelt sind (Blanpain, C., *et al.*, 2004). Die allgemeine Vorstellung vom Aufbau einer Stammzellnische, z.B. der interfollikulären Epidermis, bei der die Stammzellen nur solange ihre Stammzellcharakteristiken behalten, wie sie mit der Basalmembran verbunden sind (Zhu, A. J., *et al.*, 1999), brachte die Vorstellung nahe, dass es sich bei den suprabasalen Zellen – die keinen Kontakt zur Basalmembran mehr haben – nicht mehr um wirkliche Stammzellen handelt. Jedoch konnte durch Klonierungs- und Transplantationsuntersuchungen gezeigt werden, dass die suprabasalen und die basalen Zellen trotz ihrer unterschiedlichen Lage innerhalb der bulge Region Stammzellcharakteristiken, wie Stilllegung und Selbsterhaltung, aufweisen (Blanpain, C., *et al.*, 2004). Ungeachtet dessen, dass beide Populationen Stammzellcharakteristiken besitzen, konnte infolge von Untersuchungen mit GFP-markierten Histonen eine erhöhte Teilungsrates in den suprabasalen Stammzellen festgestellt werden (Blanpain, C., *et al.*, 2004). Diese Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die suprabasalen Zellen somit die ersten Nachfolgezellen der basalen Stammzellen sind, die aber immer noch Stammzellcharakteristiken innehaben. Basierend auf diesen Informationen wird klar, dass nur mit steigendem Alter die DNA-Schäden in den ursprünglichen und langlebigsten basalen



Stammzellen induziert werden, während es bei der Bestrahlung insbesondere die suprabasalen Stammzellen sind, die eine Zunahme aufweisen. In Hinblick auf die Erkenntnisse von Blanpain und Fuchs, implizieren die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, dass sich die kaum teilenden basalen Stammzellen – im Gegensatz zu den suprabasalen Zellen und den Funktionszellen – möglicherweise aufgrund ihrer geringen Zellteilung während der Bestrahlung vor der stetigen Induktion von Schäden schützen können. Zudem könnte es auch einen Unterschied in der Reparaturkapazität der beiden Stammzellpopulationen geben. Wobei eine gesteigerte Reparaturkapazität in den basalen Stammzellen eine Anhäufung an DNA-Schäden verhindern könnte, was aber noch zu untersuchen wäre. Die altersabhängigen Unterschiede könnten zudem auf eine unterschiedliche Lebenszeit zurückzuführen sein. Einen Hinweis darauf liefern Immunfluoreszenz Untersuchungen, die die Entstehung der suprabasalen Zellen erst nach dem ersten Haarzyklus, das heißt nach ca. drei Wochen, aufzeigen, wohingegen die basalen Stammzellen, aufgrund der Haarbildung, schon vorher angelegt sein müssen (Blanpain, C., *et al.*, 2004).

Zusammenfassend weisen alternde HFSCs, wie in der zu Grunde liegenden Theorie beschrieben, eine Zunahme an 53BP1 und pKu70 auf, die durch den Rückgang der DNA-Reparaturkapazität mitbegründet sind. Diese Untersuchungen untermauern somit die DNA-Schadenstheorie der Alterung in den HFSCs der murinen Haut. Die stetige Zunahme an 53BP1-Foci, die durch endogene Stimulation beobachtet wurde, kann durch eine stetige exogene Stimulation infolge der fraktionierten Niedrigdosisbestrahlung bestätigt werden. In Anbetracht der Tatsache, dass wohl nur im Zuge von endogenen Reizen die basalen, d.h. ursprünglichsten, Stammzellen beeinträchtigt werden, wohingegen bei exogener Stimulation die suprabasalen Stammzellen sowie die Funktionszellen Auswirkungen aufzeigen, scheint es unterhalb der Foci-Ebene doch zu unterschiedlichen Schäden infolge der divergenten Stimulation zu kommen.

## 5.2 53BP1-ANSAMMLUNGEN SIND CHROMATINVERÄNDERUNGEN

Ein Phänomen, das in engem Zusammenhang mit Alterung steht, ist die Telomerverkürzung. Dieser Prozess wird als die innere Uhr der Zelle bezeichnet und regelt somit die Lebenszeit der Zelle [(Harley, C. B., 1991) zitiert nach (Taylor, R. S., *et al.*, 1996)]. Im Embryo kann die Telomerase die Telomerlänge aufrechterhalten, aber im erwachsenen Organismus kann trotz der Expression der Telomerase in einigen Zellen (z.B. adulte Stammzellen) die Verkürzung mit steigender Teilungszahl, das heißt mit steigendem Alter, nicht aufgehalten werden (Morrison, S. J., *et al.*, 1996a; Rube, C. E., *et al.*, 2011a; Wright, W. E., *et al.*, 1996). Basierend auf dem Umstand, dass Telomere, wie auch Zentromere, im konstitutiven Heterochromatin verpackt sind, ist für die Ligation nach Telomerverkürzung der ATM-

abhängige DSB Reparaturweg mit 53BP1 nötig (Takai, H., *et al.*, 2003). Dieses Phänomen konnten wir durch die Kombination der Telomer-FISH mit der 53BP1 Immunfluoreszenzfärbung auch in den alten HFSCs nachweisen. Dabei zeigte sich im Vergleich von jungen und alten Stammzellen eine Zunahme der Telomer-assoziierten 53BP1-Foci. Jedoch konnten entgegen der bekannten Vorstellung (Hewitt, G., *et al.*, 2012) nicht alle akkumulierenden 53BP1-Foci den Telomeren zugeordnet werden. In unseren Untersuchungen kolokalisiert nur ein geringer Prozentsatz von ca. 17% der Foci mit der telomerischen DNA-Sequenz, wobei eine 70%-ige Kolokalisation auch nur in seneszenten Zellkultur nachgewiesen werden konnte (Herbig, U., *et al.*, 2004). In Zellen der Niere und des Dünndarms konnte – wie in unseren Untersuchungen – eine Zunahme der Kolokalisation mit dem Alter festgestellt werden, die in 24 Monate alten Tieren auch bei ca. 13-25% lag (Hewitt, G., *et al.*, 2012). Basierend auf der Vorstellung, dass Reparaturproteine – insbesondere 53BP1 – erst sehr kurze Telomere markieren, die ihre Schutzfunktion verloren haben (Carneiro, T., *et al.*, 2010), die Mäuse aber ein 8-16 mal längeres Telomer als Menschen besitzen (Kipling, D. und Cooke, H. J., 1990) und die Stammzellregionen dabei nochmal die längsten Telomere aufweisen (Flores, I., *et al.*, 2008), geht die geringe altersabhängige Kolokalisation in murinen Stammzellen mit unseren Erwartungen einher. Ein weiterer Punkt der unsere Ergebnisse unterstützt, ist die geringe Teilungsrate der Stammzellen (LRCs) (Cotsarelis, G., *et al.*, 1990), was eine starke Telomerverkürzung nochmals unwahrscheinlicher macht. Des Weiteren konnte *in vitro* und *in vivo* mittels Pulsfeld-Gelelektrophorese kein altersabhängiger Unterschied in der Telomerlänge detektiert werden (Kipling, D. und Cooke, H. J., 1990). Dem widersprechen Untersuchungen in Telomerase-defizienten Mäusen, die eine Verkürzung der Telomere auch in den HFSCs aufgezeigt haben, was in diesem Fall zu einer verminderten Funktionalität der Stammzellen, aufgrund einer verminderten Mobilität, führte (Flores, I., *et al.*, 2005). Untermauert werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen in zwei Jahre alten C57BL/6 Tieren, die einen Rückgang der HFSCs mit den längsten Telomeren, sowie auch der mittleren Telomerlänge im Vergleich zur jungen Kontrolle nachgewiesen haben (Flores, I., *et al.*, 2008). Entgegen dieser Vorstellung wiesen Hewitt und Mitautoren zwar auch eine Zunahme an Telomer-assoziierten Foci nach, die aber unabhängig von der Telomerlänge zunahm. Des Weiteren wiesen sie alle akkumulierenden DNA-Schäden den Telomeren zu und postulierten entgegen unserer Ergebnisse, dass die nicht telomerischen Schäden nicht persistieren (Hewitt, G., *et al.*, 2012). Jedoch wurden diese Untersuchungen nicht alterungsabhängig, sondern infolge von Bestrahlung in jungen Tieren durchgeführt. Zudem wurde durch weitere Untersuchungen klar, dass Telomer-assoziierte und interchromosomale Schäden die Folgen für die Zelle beeinflussen (Nakamura, A. J., *et al.*, 2008). Somit scheint die Telomerverkürzung zwar die Stammzellen der Haut zu beeinflussen, aber die altersabhängige Akkumulation der 53BP1-

Foci nicht vollständig zu bedingen. Demzufolge kann die von uns nachgewiesene, geringe altersabhängige Zunahme der Telomer-assoziierten 53BP1-Foci zwar durch die Verkürzung der Telomere bedingt sein, die sich trotz der Telomeraseaktivität und der seltenen Teilung der Stammzellen vollzieht. Aber der Großteil der akkumulierenden Schäden wird nicht durch dieses Phänomen beeinflusst. Somit scheinen beide Formen der DNA-Schäden den altersabhängigen Ausgang für die Stammzellen zu beeinflussen. Diese Untersuchungen widerlegen somit die Vorstellung, dass die Telomerverkürzung die Hauptursache für die altersabhängige Akkumulation der DNA-Schäden in den Stammzellen der murinen Haut darstellt. Die Natur der 53BP1-Ansammlungen, die nicht den Telomeren zuzuordnen sind, muss somit im Kontext des Chromatins noch aufgeklärt werden. Auf der Grundlage der Entstehung von DSBs durch exogene Reize wie Bestrahlung sowie durch endogene Stimulation infolge der normalen Zellatmung und der Replikation, wäre zu vermuten, dass sich in beiden Fällen dasselbe Schadensbild in den Stammzellen manifestiert, was auf der Ebene der Lichtmikroskopie auch durch die 53BP1-Foci bestätigt werden konnte. Diese DSBs sollten nach der bekannten Vorstellung des NHEJ die Ansammlung von vielen Reparaturproteinen (wie 53BP1 und Ku70) aufweisen. Dieses Bild konnte in früheren TEM Untersuchungen kurz nach der Bestrahlung, sogar bei niedrigen Strahlendosen, in den HFSCs, wie auch in anderen Funktionszellen und der Zellkultur, nachgewiesen werden (Lorat, Y., *et al.*, 2012; Rube, C. E., *et al.*, 2011b). Da Foci bildende Proteine, wie 53BP1 und  $\gamma$ H2AX, auf die heterochromatischen Bereiche des Zellkerns beschränkt sind, ist mit diesen Proteinen auch nur die heterochromatische Reparatur analysierbar (Rube, C. E., *et al.*, 2011b). Dies unterstützt somit die Beobachtung, dass 0.5 h nach Bestrahlung 53BP1 nur im Heterochromatin der Stammzellen zu finden ist. Im Gegensatz dazu konnten unter Verwendung von pKu70, einem zentralen Protein des NHEJ, das einen DNA-Schaden als Dimer bindet, an diesem phosphoryliert wird, und den Bruch über die gesamte Reparaturzeit hinweg stabilisiert (Cary, R. B., *et al.*, 1997; Suwa, A., *et al.*, 1994), aktiv prozessierte Brüche unabhängig vom Chromatinstatus identifiziert werden. Untermauert wird die Verwendung von pKu70 als Marker für aktiv prozessierte DSBs durch die nachgewiesene Kollokalisierung mit pDNA-PKcs – einem weiteren zentralen Protein des NHEJ – sowohl in der euchromatischen als auch der heterochromatischen DNA nach Bestrahlung (Lorat, Y., *et al.*, 2012). Die nachgewiesene Kollokalisierung von 53BP1 und pKu70 repräsentiert somit einen im Reparaturprozess befindlichen DSB im Heterochromatin, und die 53BP1-unabhängigen pKu70 Cluster, euchromatische DSBs. Demgegenüber zeigt sich in der altersabhängigen Untersuchung eine immense Zunahme an 53BP1 – unabhängig von pKu70 – in hochkondensierten heterochromatischen Bereichen (konstitutives Heterochromatin), die sich in vielen kleinen Clustern organisieren. Diese Zunahme wurde zudem durch die Ergebnisse in der Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie bestätigt. Demgegenüber weist

53BP1 nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung eine Ansammlung im konstitutiven Heterochromatin auf, die aber in einzelnen, großen Clustern organisiert sind. Die Bildung dieser heterochromatischen Cluster wurde auch zu späten Zeitpunkten nach einmaliger Bestrahlung mit hoher Dosis nachgewiesen (Lorat, Y., *et al.*, 2012). Trotzdem sind nach Bestrahlung neben den großen 53BP1 Clustern auch aktiv prozessierte Brüche (pKu70) nachweisbar, was die höhere Zunahme von pKu70 – im Vergleich zur Alterung – in der Durchflusszytometrie erklären würde. Trotzdem konnte die pKu70 Zunahme, die schon mittels Durchflusszytometrie aufgezeigt wurde, altersabhängig fast vollständig aufs Heterochromatin begrenzt werden. In beiden Fällen weisen aber weder die großen 53BP1 Cluster noch die vielen kleinen Cluster eine Kolo-kalisation mit pKu70 auf. Unter Betrachtung der Ergebnisse kurz nach einmaliger Bestrahlung sind somit nur sehr wenige der altersabhängigen und keine der exogen stimulierten, großen 53BP1 Cluster im konstitutiven Heterochromatin in Reparatur befindliche DSBs. Diese Vermutung geht einher mit den Beobachtungen von Lukas und Mitautoren, die in der Immunfluoreszenz festgestellt haben, dass endogen induzierte Schäden durch 53BP1 markiert werden, diese dabei aber vielmehr Chromatinveränderungen sind, die ehemalige Schäden markieren, die auch an die darauffolgende Generation weitergegeben werden können (Lukas, C., *et al.*, 2011). Die Erkenntnis, dass es sich bei den verbleibenden 53BP1-Foci um Chromatinmarkierungen handelt, die im Gegensatz zu aktiv prozessierten Schäden in die nächste Generation übertragen werden können (Lukas, C., *et al.*, 2011), liefert auch eine mögliche Erklärung dafür, dass sich 53BP1-Foci nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung nicht nur in langlebigen Stammzellen, sondern auch in kurzlebigen Funktionszellen, wie Keratinozyten oder Blutzellen (Rübe, C. E., *et al.*, 2011a), akkumulieren. Eine vergleichbare Interpretation liefern auch Sedelnikova und Mitautoren, die die verbleibenden durch Bestrahlung induzierten Foci aber als nicht reparable DNA-Schäden klassifizieren (Sedelnikova, O. A., *et al.*, 2004). Andererseits könnte es sich auch einfach um Markierungen von einer veränderten Chromatinstruktur handeln (Suzuki, M., *et al.*, 2006). Infolge von Bestrahlung (Kalinich, J. F., *et al.*, 1989), wie auch durch den Alterungsprozess (Ono, T., *et al.*, 1993), wird nämlich nicht nur die DNA, sondern auch das Epigenom verändert, was Auswirkungen auf die Genexpression und das Überleben der Zelle haben kann (Orlowski, C., *et al.*, 2011). Unter Berücksichtigung dieser Quellen und unserer Ergebnisse scheinen endogen induzierte, sowie exogen stimulierte persistierende 53BP1-Foci Markierungen des Chromatins zu sein, die keine aktiv prozessierten DSBs, aber möglicherweise ehemalige DNA oder epigenetische Schäden markieren. Diese Schäden könnten in der Zukunft noch als potentiell gefährlich gelten und müssen möglicherweise deshalb stillgelegt werden, was ihren Aufenthalt im stark kompaktierten Heterochromatin erklären würde. Des Weiteren könnten die Schäden durch die Markierung auch in der nächsten Generation wiedergefunden und dann repariert werden.



Neben der Erkenntnis, dass es sich bei den endogen und exogen induzierten 53BP1 Ansammlungen um Chromatinmarkierungen handelt, ist die unterschiedliche Verteilung dieser Markierungen von großem Interesse. Die Verteilung innerhalb des Heterochromatins könnte nämlich ein Indiz für die unterschiedlichen Arten von Schäden mit abweichender Schwere sein. Endogen induzierte Schäden werden meist infolge von ROS, die vornehmlich bei der Zellatmung entstehen, induziert [(Harman, D., 1972) zitiert nach (Harman, D., 2003)]. ROS werden aber auch von ionisierender Strahlung bei der indirekten Strahlenwirkung, infolge der Radiolyse von Wassermolekülen, erzeugt (Rink, H., 1971). Der Unterschied liegt in der Zahl und Dichte der induzierten Schäden. Denn infolge von Strahlung werden durch ein Photon viele Sekundärprozesse in enger Umgebung induziert, die dann alle wiederum Folgeprozesse induzieren. Aus diesem Grund ist die Wahrscheinlichkeit, einen letalen DSB zu erzeugen bei Strahlung auch fünf Mal höher, als bei endogenem Reiz (Prise, K. M., *et al.*, 1989).

Unter Anbetracht aller Informationen und Ergebnisse scheinen die akkumulierenden 53BP1 Ansammlungen im Heterochromatin verbleibender Chromatinmarkierungen zu sein, die – basierend auf ihrer Größe – möglicherweise Informationen bezüglich der Schwere oder der Art des ursprünglichen Schadens, der an dieser Stelle stillgelegt ist oder war, bewahren.

## 5.3 EXOGENE UND ENDOGENE REIZE ERZEUGEN UNTERSCHIEDLICHE BIOLOGISCHE FOLGEN FÜR DIE STAMMZELLEN

Haarverlust, graue Haare oder auch Faltenbildung sind Folgen des Alterungsprozesses. Dieser Alterungsprozess wird durch Veränderungen in der Funktion oder Zahl von Stammzellen beeinflusst (Chambers, S. M., *et al.*, 2007). Diese altersabhängigen Veränderungen werden durch Apoptose bzw. Seneszenz der Stammzellen bedingt. Durch Apoptose werden Zellen abgebaut, was zu ihrem zahlenmäßigen Verlust führt, während Seneszenz die Stilllegung der Stammzellen, also einen funktionellen Verlust induziert. Obwohl es scheinbar einen engen Zusammenhang zwischen Alterung und Apoptose in Melanozyten Stammzellen gibt (Nishimura, E. K., *et al.*, 2005), die in der gleichen Stammzellnische wie die HFSCs angesiedelt sind, konnten wir in unseren Untersuchungen altersbedingt keine apoptotischen HFSCs nachweisen. Die einzelnen Caspase-3-positiven Zellen, die außerhalb der Stammzellnische gefunden wurden, könnten durch den ständigen Auf- und Abbau des Haarfollikels bedingt sein. Somit scheinen sich die Stammzellen, trotz der altersbedingten Zunahme an 53BP1 in den ursprünglichen HFSCs, vor dem Abbau durch Apoptose zu schützen. Dies scheint infolge der Bestrahlung nicht zu passieren, denn dabei konnten wir – im Vergleich zur jungen Kontrolle – vermehrt CD34-positive Zellen nachweisen, die auch positiv für Caspase-3 sind. Dieses Verhalten konnte auch schon 1985

von Potten und Mitautoren in anagenen Haarfollikeln identifiziert werden (Potten, C. S., 1985). Durch die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde jedoch klar, dass es vielmehr suprabasale Stammzellen sind, die die DNA-Schäden (53BP1) akkumulieren und demnach in Apoptose gehen, während die basalen, ursprünglichen Stammzellen geschützt werden. Somit scheinen nur infolge der stetigen exogenen Stimulation suprabasale Stammzellen über Apoptose abgebaut zu werden, während altersbedingt die HFSCs, trotz akkumulierender DNA-Schäden, scheinbar einen Schutzmechanismus gegen ihren Abbau aufgebaut haben. Da altersabhängig die Zellen mit erhöhtem DNA-Schadensniveau nicht durch Apoptose abgebaut werden, wäre eine Stilllegung der Zellen eine andere Möglichkeit. Diese Stilllegung wurde mittels der Expression einer spezifischen Form der  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal), die nur in seneszenten Zellen aktiv ist, sowie dem Zellzyklus-Inhibitor p16<sup>ink4a</sup> nachgewiesen. Altersabhängig konnte in der Untersuchung im Gewebeverband keine Zunahme von SA- $\beta$ -Gal-positiven Keratinozyten und nur eine geringe Zunahme in den Stammzellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis stehen im Kontrast zu den Beobachtungen von Dimri und Mitautoren (Dimri, G. P., *et al.*, 1995), werden aber durch die durchflusszytometrischen Untersuchungen, die auch eine geringe Zunahme des Seneszenzmarkers p16<sup>ink4a</sup> in den Stammzellen aufweisen, unterstützt. Untermauert werden diese Ergebnisse durch Untersuchungen von Krishnamurthy und Mitautoren, die mit steigendem Alter eine erhöhte Expression des Tumorsuppressors p16<sup>ink4a</sup> nachgewiesen haben (Krishnamurthy, J., *et al.*, 2004). Zudem wird postuliert, dass die Erhöhung auch durch das gesteigerte DNA-Schadensniveau mit dem Alter induziert sein kann und p16<sup>ink4a</sup> eine wichtige Funktion in Stammzellen inne hat (Ito, K., *et al.*, 2006). Des Weiteren zeigt sich, im Gegensatz zur Alterung, infolge von Bestrahlung nicht nur in den Stammzellen, sondern auch in den differenzierten Zellen eine signifikante Erhöhung beider Seneszenzmarker. Diese gesteigerte Stilllegung der Zellen infolge eines geringen Stimulus wurde auch in humanen mesenchymalen Stammzellen nachgewiesen, wobei hierdurch die Telomerverkürzung stimuliert wurde, die wiederum eine gesteigerte replikative Seneszenz erzeugte (Harbo, M., *et al.*, 2012). Somit könnte sich auch schon in jungen Stammzellen – bedingt durch die Bestrahlung – eine Telomerverkürzung manifestieren, die wiederum die Zellen stilllegt. Dieser Umstand müsste in weiteren Studien aber noch analysiert werden. Somit scheint es nur infolge von Bestrahlung zu einer starken Zunahme von apoptotischen und seneszenten Stammzellen zu kommen. Zusammenfassend wird klar, dass Apoptose, Seneszenz und sich akkumulierenden Markierungen von ehemaligen Schäden alle zusammenspielen, um geschädigte Zellen möglicherweise vor der Entartung zu schützen und die Krebsbildung zu verhindern. Da aber nur ein geringer Anteil der alternden Zellen auf diese Weise stillgelegt wird, muss es Mechanismen geben die die alternden Stammzellen schützen. Ein möglicher Schutzmechanismus ist der NF- $\kappa$ B-Signalweg. NF- $\kappa$ B regulierte

Gene haben zum einen Einfluss auf Apoptose und Seneszenz (Beg, A. A., *et al.*, 1995; Bernard, D., *et al.*, 2004), und werden zudem altersabhängig infolge von genotoxischem und oxidativem Stress aktiviert (Spencer, N. F., *et al.*, 1997). Untersuchungen in 24 Monate alter Haut haben dabei eine gesteigerte Aktivität des NF- $\kappa$ B-Signalweges aufgezeigt. Bezugnehmend auf die vergleichbare Akkumulation von 53BP1-Foci – unabhängig vom Stimulus – und die Aktivierung des kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweges durch DNA-Schäden (Wu, Z. H., *et al.*, 2006), konnte auch infolge von Bestrahlung eine Aktivierung des Signalweges beobachtet werden. Die altersabhängige Zunahme ist aber nicht nur auf die Aktivität begrenzt (Adler, A. S., *et al.*, 2007), sondern es zeigt sich auch ein erhöhter Proteingehalt, trotz einer unveränderten Expression (Helenius, M., *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Helenius und Mitautoren aber keine altersabhängige Erhöhung des phosphorylierten I $\kappa$ B $\alpha$  Proteingehalts in der Leber von Ratten nachweisen (Helenius, M., *et al.*, 2001). Dabei wurden die Untersuchungen aber auch mittels Western Blot durchgeführt, was die Extraktion von Proteinen aus dem gesamten Organ voraussetzt, und somit – im Gegensatz zur Immunfluoreszenz – die Einzelzell-Komponente verliert. Auf diesem Weg könnten die starken Signale aus einzelnen Zellen verdeckt werden. Aus diesem Grund kann durch die Immunfluoreszenz auch die Lage der NF- $\kappa$ B-positiven Zellen im Gewebeverband analysiert werden. In unseren Untersuchungen sind es alterungsabhängig, sowie nach Bestrahlung, insbesondere CD34-negative Zellen, die eine starke NF- $\kappa$ B Aktivität aufweisen. Im Haarfollikel sind es insbesondere die Nachfolgezellen der HFSCs, die während des Haarzyklus das neue Haar bilden. Des Weiteren zeigt sich bei Mäusen mit eingeschränkter Reparaturkapazität auch eine Aktivität innerhalb der bulge Region. Die Aktivierung dieses Signalweges in Zellen der bulge Region und des Bulbus wird durch die Untersuchungen von Duheron und Mitautoren untermauert. Diese Untersuchungen haben die Expression des Rezeptor Aktivators von NF- $\kappa$ B (RANK) und seines Liganden (RANKL) in der bulge Region und im Bulbus nachgewiesen. In Überexpressions- oder Stilllegungs- (englisch: knock-out) Experimenten konnte zudem die Aktivierung der Proliferation der Zellen, sogar der Stammzellen über RANK und RANKL stimuliert werden (Duheron, V., *et al.*, 2011). Diese Beobachtung geht einher mit unseren Untersuchungen, bei denen viele Ki67-positive Zellen, einem Marker für alle Zellzyklusphasen, außer der G0 Phase (Gerdes, J., *et al.*, 1984), auch NF- $\kappa$ B Aktivität aufweisen. Dementgegen konnte durch „knock-out“ Untersuchungen in gealterter Epidermis eine reprimierende Wirkung auf die Proliferation nachgewiesen werden (Adler, A. S., *et al.*, 2007). Diese Untersuchungen beziehen sich aber nur auf die Epidermis und beachten nicht den Haarfollikel oder die Stammzellen. Somit scheinen die sich differenzierenden Zellen durch die Aktivierung dieses Signalweges der Stilllegung oder Abtötung zu entgehen. Was in der Folge auch ihre weitere Teilung und Vervielfältigung ermöglicht. Da in unseren Untersuchungen ruhende

Stammzellen keine NF- $\kappa$ B Aktivität nachweisen, und sich infolge von Bestrahlung, trotz erhöhter NF- $\kappa$ B Aktivität, eine erhöhte Apoptoserate in den CD34-negativen und suprabasalen Stammzellen detektieren ließ, scheint die Unterdrückung der Apoptose während der Alterung nicht ausschließlich auf der Aktivität von NF- $\kappa$ B zu beruhen. Die Behauptung wird durch Untersuchungen von Sotiropoulou und Mitautoren unterstützt, die in HFSCs nach der Induktion von DNA-Schäden vermehrt Bcl-2 nachgewiesen haben, was p53 reprimiert und somit die Apoptose verhindert (Sotiropoulou, P. A., *et al.*, 2010). Die erhöhte Expression von Bcl-2 konnten wir unter Verwendung von semiquantitativer qPCR altersabhängig nicht nachweisen. Vielmehr konnten wir sogar eine signifikante Abnahme der Expression von Bcl-2 mit dem Alter detektieren. Da Sotiropoulou und Mitautoren ihre Untersuchungen aber auch in jungen, bestrahlten Tieren durchgeführt haben (Sotiropoulou, P. A., *et al.*, 2010), unterstützt dies wiederum unsere signifikante Hochregulation von Bcl-2 infolge der Bestrahlung. Beim Vergleich der Ergebnisse muss zudem beachtet werden, dass die untersuchte RNA in unserem Fall aus der Gesamthaut gewonnen wurde, was Veränderungen in einigen Zellen, wie den Stammzellen, verschleiern kann. Zudem wird eine signifikant Abnahme von TP53BP1 verzeichnet, was durch genomweite Untersuchungen in verschiedenen Geweben der Maus bestätigt wird (Zahn, J. M., *et al.*, 2007). Dieser Rückgang der Expression von Reparaturgenen kann wiederum eine mögliche Ursache für die nachgewiesene, altersabhängige Abnahme der Reparaturkapazität sein. Ein weiteres Indiz für diesen Zusammenhang ist die gesteigerte Transkription der Gene in jungen Mäusen nach Bestrahlung. Diese Untersuchungen legen somit dar, dass es nur infolge der exogenen Stimulation zu einer Hochregulation von Genen der DNA-Reparatur kommt, was die Zunahme auf Proteinebene induziert. Zudem kommt es nur nach Bestrahlung, trotz der vergleichbaren altersabhängigen 53BP1-Foci Akkumulation, zu einer gesteigerten Transkription von Bcl-2, was die basalen Stammzellen möglicherweise vor Apoptose schützt. Ein weiteres Indiz für die unterschiedliche biologische Konsequenz infolge von Bestrahlung und Alterung liefert die Veränderung der Chromatinstruktur. Infolge von Alterung kommt es in den Stammzellen zu einer leichten Erhöhung des Euchromatinmarkers H4K16ac, der eine wichtige Rolle in der Öffnung des Chromatins nach Induktion von DNA-Schäden besitzt (Sharma, G. G., *et al.*, 2010). Diese altersabhängige Erhöhung konnte auch in Hefezellen und anderen adulten Stammzellen nachgewiesen werden (Chambers, S. M., *et al.*, 2007; Dang, W., *et al.*, 2009). Möglicherweise kommt es somit in den alternden Stammzellen zu einer geringen Öffnung des Chromatins, um die sich anhäufenden, ehemaligen DNA-Schäden mittels 53BP1 markieren zu können. Demgegenüber induziert Bestrahlung eine starke Hochregulation der Histonmodifikation H3K9me3 in den HFSCs. Das vermehrte Heterochromatin – markiert durch H3K9me3 – in Kombination mit der gesteigerten Seneszenz, die nachweislich miteinander verbunden sind (Narita, M., *et al.*, 2003), kann





somit ein weiterer Marker für die Stilllegung der Stammzellen sein. Die unterschiedlichen biologischen Konsequenzen nach Alterung und Bestrahlung führen zudem zu einer Verschiebung in der Zahl der Stammzellen. Dabei zeigen sich während der Alterung keine Veränderungen in der Zahl der Stammzellen, auch bestätigt durch Untersuchungen von Stern und Bickenbach, die keine altersabhängigen Veränderungen in epidermalen Stammzellen nachweisen konnten (Stern, M. M. und Bickenbach, J. R., 2007). Demgegenüber ist von anderen Stammzellpopulationen bekannt, dass die Zahl der Stammzellen zwar gleich bleibt, sich ihre funktionelle Aktivität aber verändert (Chambers, S. M., *et al.*, 2007). Dies könnte, trotz der Erkenntnisse von Stern und Bickenbach, auch für die HFSCs in Frage kommen, da mit steigendem Alter auch die Wundheilung schlechter wird (Cohen, B. J., *et al.*, 1987). Im Gegensatz zur Alterung erzeugt die Bestrahlung Abbau und Stilllegung der Stammzellen, was einen leichten Rückgang der suprabasalen Stammzellen nach sich zieht. Dies wiederum scheint eine starke Zunahme der basalen, ursprünglichen Stammzellen zu induzieren. Somit können diese im jungen Alter bei schwindender Zahl der Nachfolgezellen diesen Verlust ausgleichen. Diese Folgen könnten somit Indizien für eine vorzeitige Alterung in den fraktioniert bestrahlten Mäusen darstellen.

Werden alle Erkenntnisse, die durch die Untersuchungen von adulten Stammzellen in ihrer physiologischen Stammzellnische gewonnen wurden, nochmals zusammengefasst, kann der Zusammenhang von endogen und exogen induzierten DNA-Schäden sowie die Folgen für die Stammzellen wie folgt dargestellt werden (s. Abbildung 5-1). Über die Zeit sowie nach Bestrahlung nehmen unterschiedliche Chromatinveränderungen in den Stammzellen zu. Altersabhängig kommt es zur Ansammlung von vielen kleinen Chromatinmarkierungen in den basalen Stammzellen. Die Ursache für die altersabhängige Zunahme der Chromatinveränderungen ist in der verminderten Expression von Reparaturproteinen zu suchen. Dieser führt demnach zu einem Rückgang der Reparaturkapazität der Stammzellen mit dem Alter, was die Zunahme der Chromatinveränderungen induziert. Neben der Öffnung des Chromatins – für die nachfolgende Markierung der Schäden – kommt es, infolge der Chromatinveränderungen, zu einer geringen Arretierung der Stammzellen im Zellzyklus. Trotzdem wird kein Abbau der Zellen infolge von Apoptose induziert. Zum Schutz der Zellen wird alterungsabhängig der NF- $\kappa$ B Signalweg angeschaltet. Dieser schützt, zum Erhalt der Teilungsfähigkeit, die differenzierten Zellen.

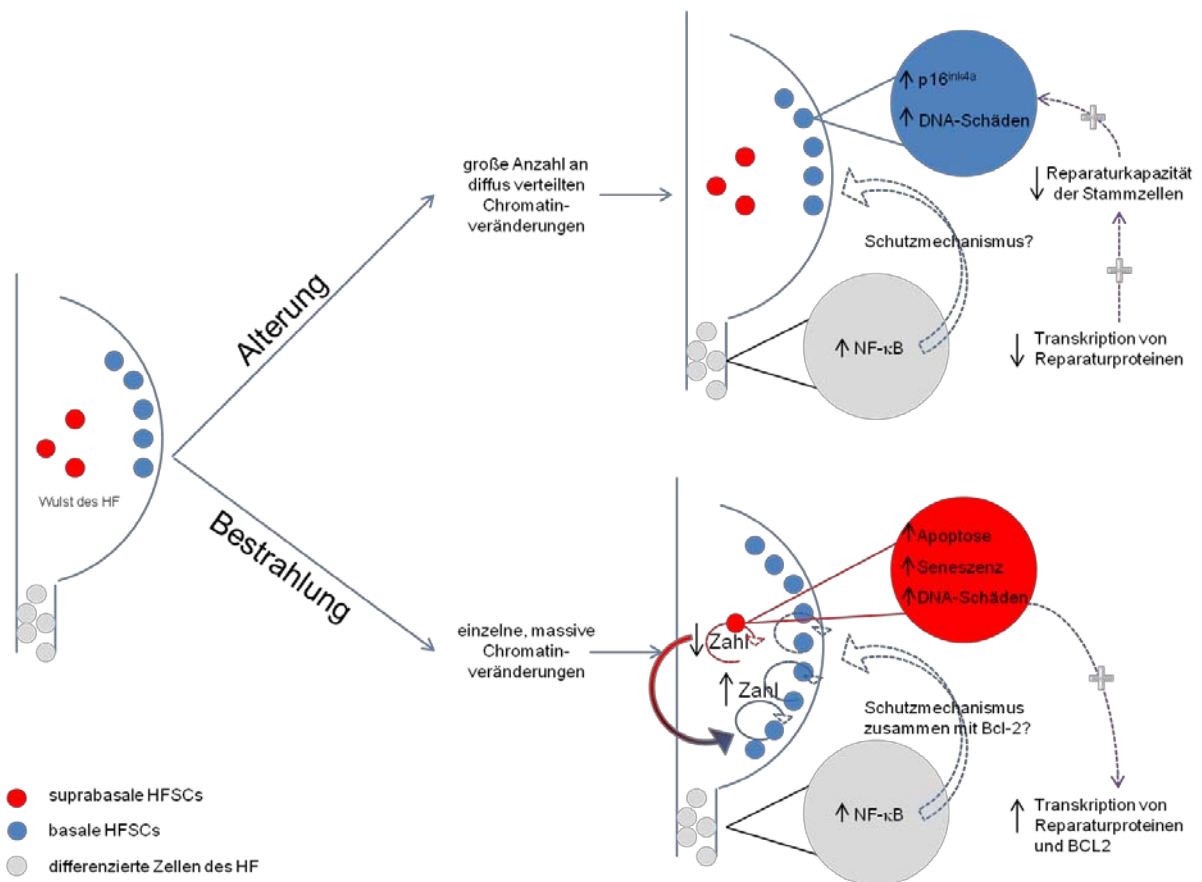


Abbildung 5-1: Postulierte Reaktion der Stammzellen auf endogene und exogene Stimulation:

Altersabhängig werden Chromatinveränderungen in den basalen Stammzellen induziert, die ehemalige DNA-Schäden markieren und eine geringe Arretierung der basalen Stammzellen nach sich ziehen. Die Erhöhung des DNA-Schadensniveaus wird durch den Rückgang der Transkription der Reparaturproteine und der somit induzierten Verschlechterung der DNA-Reparaturkapazität in den Stammzellen hervorgerufen. Zum Schutz der Zellen vor Abbau und Stilllegung wird altersabhängig der NF-κB Mechanismus aktiviert. Nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung werden einzelne aber große Chromatinveränderungen induziert, die ehemalige, schwere DNA-Schäden markieren, die zudem zum apoptotischen Abbau der suprabasalen Stammzellen führen, was die basalen Stammzellen zur vermehrten Teilung aktiviert. Zum Schutz der basalen Stammzellen wird durch die vermehrten DNA-Schäden ein Schutzmechanismus aus dem anti-apoptotischen Bcl-2 und dem NF-κB Signalweg aktiviert.

Bei erhöhtem Schadensniveau wird er aber auch in den ruhenden Stammzellen aktiviert. Demgegenüber werden durch die Bestrahlung wenige, aber scheinbar komplexe Chromatinveränderungen induziert, die in den suprabasalen Stammzellen akkumulieren, und somit zum apoptotischen Abbau oder auch zur Stilllegung der Stammzellen führen. Dieser Rückgang in der Zahl der suprabasalen Zellen stimuliert folglich die Zahl der basalen Stammzellen, die sich möglicherweise durch das anti-apoptotische Bcl-2 und den NF-κB Signalweg vor dem Abbau schützen können. Somit stimulieren komplexere Schäden – die durch Bestrahlung induziert werden – zelluläre Signalwege, die durch Apoptose oder Seneszenz, eine Abnahme beziehungsweise Stilllegung der Stammzellen induzieren, was Auswirkungen für den Organismus nach sich ziehen kann.

## 6 AUSBLICK

Um die weiter bestehende Frage, ob akkumulierende Chromatinveränderungen die treibende Kraft der Alterung sind, noch näher zu beleuchten, sind in der Zukunft noch weitere Projekte diesbezüglich geplant. Zum einen soll *in vivo* untersucht werden, ob durch die unterschiedlichen Reize wirklich die Funktion der Stammzellen beeinträchtigt wird. Um die Funktion der Stammzellen zu testen wird ein Wundheilungsexperiment herangezogen. Dieses Wundheilungsexperiment wird verwendet, da bekannt ist, dass HFSCs infolge der Schädigung der Haut zur Proliferation und Auswanderung aus der Stammzellnische aktiviert werden. Dafür soll alten Mäusen, bestrahlten Mäusen, sowie Kontrollmäusen ein rundes Stück Haut unter Verwendung einer Hautstanze entnommen und der jeweilige Wundheilungsverlauf dokumentiert und verglichen werden. Des Weiteren soll eine stammzellspezifische Transkriptionsuntersuchung, erfolgen. Dieses Vorhaben basiert auf unseren bisherigen Transkriptionsuntersuchungen in denen aber nur die Expression in der Gesamthaut betrachtet werden konnte. Da Stammzellen aber sehr wahrscheinlich eine unterschiedliche Transkription aufweisen als differenzierte Zellen, wird nun eine genomweite stammzellspezifische Transkriptionsuntersuchung angestrebt. Für dieses Vorhaben ist eine vorherige Isolierung und Sortierung der Stammzellen mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern (englisch: fluorescence associated cell sorting; FACS) nötig. Zum andern wird in einem langfristigen Projekt die Natur der 53BP1 Ansammlungen noch näher untersucht. Dazu soll die Chromatin-Immuno-Präzipitation (englisch: chromatin immuno precipitation; ChIP) gegen 53BP1 im Hautgewebe der Maus etabliert werden. Mit Hilfe dieser Methode können im Folgenden Proteine, die mit diesen Clustern assoziiert sind, sowie spezifische DNA-Regionen, an die die Cluster gebunden sind, identifiziert und analysiert werden.





## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Adler, A. S., Sinha, S., Kawahara, T. L., Zhang, J. Y., Segal, E. und Chang, H. Y. (2007); Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF-kappaB activity; *Genes & development*; 21:3244-3257

Amoh, Y., Li, L., Campillo, R., Kawahara, K., Katsuoka, K., Penman, S. und Hoffman, R. M. (2005a); Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 102:17734-17738

Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., Penman, S. und Hoffman, R. M. (2005b); Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 102:5530-5534

Amoh, Y., Li, L., Yang, M., Moossa, A. R., Katsuoka, K., Penman, S. und Hoffman, R. M. (2004); Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 101:13291-13295

Babior, B. M., Kipnes, R. S. und Curnutte, J. T. (1973); Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent; *The Journal of clinical investigation*; 52:741-744

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C. W., Chessa, L., Smorodinsky, N. I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. und Ziv, Y. (1998); Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage; *Science, N.Y.*; 281:1674-1677

Bannister, A. J., Zegerman, P., Partridge, J. F., Miska, E. A., Thomas, J. O., Allshire, R. C. und Kouzarides, T. (2001); Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain; *Nature*; 410:120-124

Barrandon, Y. und Green, H. (1987); Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 84:2302-2306

Becton Dickinson and Company;

[http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum\\_viewer/index.jsp](http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp)

Beg, A. A., Sha, W. C., Bronson, R. T., Ghosh, S. und Baltimore, D. (1995); Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NF-kappa B; *Nature*; 376:167-170

Bernard, D., Gosselin, K., Monte, D., Vercamer, C., Bouali, F., Poutier, A., Vandenbunder, B. und Abbadie, C. (2004); Involvement of Rel/nuclear factor-kappaB transcription factors in keratinocyte senescence; *Cancer research*; 64:472-481

Best, B. P. (2009); Nuclear DNA damage as a direct cause of aging; *Rejuvenation research*; 12:199-208

Bickenbach, J. R. (1981); Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin; *Journal of dental research*; 60 Spec No C:1611-1620

Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L. und Fuchs, E. (2004); Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche; *Cell*; 118:635-648

Bosma, G. C., Custer, R. P. und Bosma, M. J. (1983); A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse; *Nature*; 301:527-530

Bosma, M. J. und Carroll, A. M. (1991); The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses; *Annual review of immunology*; 9:323-350



Bothmer, A., Robbiani, D. F., Di Virgilio, M., Bunting, S. F., Klein, I. A., Feldhahn, N., Barlow, J., Chen, H. T., Bosque, D., Callen, E., Nussenzweig, A. und Nussenzweig, M. C. (2011); Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1; *Molecular cell*; 42:319-329

Botuyan, M. V., Lee, J., Ward, I. M., Kim, J. E., Thompson, J. R., Chen, J. und Mer, G. (2006); Structural basis for the methylation state-specific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair; *Cell*; 127:1361-1373

Boyle, M., Wong, C., Rocha, M. und Jones, D. L. (2007); Decline in self-renewal factors contributes to aging of the stem cell niche in the *Drosophila* testis; *Cell stem cell*; 1:470-478

Bundesamt für Strahlenschutz; <http://www.umweltbundesamt-daten-zur-umwelt.de/umweltdaten/public/theme.do?nodeId=2459>

Cambridge Research Biochemicals; <http://www.crbdiscovery.com/home/>

Campisi, J. (1998); The role of cellular senescence in skin aging; *The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc*; 3:1-5

Carneiro, T., Khair, L., Reis, C. C., Borges, V., Moser, B. A., Nakamura, T. M. und Ferreira, M. G. (2010); Telomeres avoid end detection by severing the checkpoint signal transduction pathway; *Nature*; 467:228-232

Cary, R. B., Peterson, S. R., Wang, J., Bear, D. G., Bradbury, E. M. und Chen, D. J. (1997); DNA looping by Ku and the DNA-dependent protein kinase; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 94:4267-4272

Chambers, S. M., Shaw, C. A., Gatz, C., Fisk, C. J., Donehower, L. A. und Goodell, M. A. (2007); Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation; *PLoS biology*; 5:e201

Chan, D. W., Ye, R., Veillette, C. J. und Lees-Miller, S. P. (1999); DNA-dependent protein kinase phosphorylation sites in Ku 70/80 heterodimer; *Biochemistry*; 38:1819-1828

Chang, C., Biedermann, K. A., Mezzina, M. und Brown, J. M. (1993); Characterization of the DNA double strand break repair defect in scid mice; *Cancer research*; 53:1244-1248

Chaturvedi, P., Eng, W. K., Zhu, Y., Mattern, M. R., Mishra, R., Hurle, M. R., Zhang, X., Annan, R. S., Lu, Q., Faucette, L. F., Scott, G. F., Li, X., Carr, S. A., Johnson, R. K., Winkler, J. D. und Zhou, B. B. (1999); Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway; *Oncogene*; 18:4047-4054

Clark, W. (1999); *A means to an end: the biological basis of aging and death*; oxford University Press USA; 0195153758

Cohen, B. J., Danon, D. und Roth, G. S. (1987); Wound repair in mice as influenced by age and antimacrophage serum; *Journal of gerontology*; 42:295-301

Comings, D. E. (1972); The structure and function of chromatin; *Advances in human genetics*; 3:237-431

Cotsarelis, G. (2006); Epithelial stem cells: a folliculocentric view; *The Journal of investigative dermatology*; 126:1459-1468

Cotsarelis, G., Sun, T. T. und Lavker, R. M. (1990); Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis; *Cell*; 61:1329-1337

Dang, W., Steffen, K. K., Perry, R., Dorsey, J. A., Johnson, F. B., Shilatifard, A., Kaeberlein, M., Kennedy, B. K. und Berger, S. L. (2009); Histone H4 lysine 16 acetylation regulates cellular lifespan; *Nature*; 459:802-807



de Vries, E. G., Gietema, J. A. und de Jong, S. (2006); Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications; *Clin Cancer Res*; 12:2390-2393

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J. D., Campisi, J. und Toussaint, O. (2009); Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo; *Nature protocols*; 4:1798-1806

Difilippantonio, S., Gapud, E., Wong, N., Huang, C. Y., Mahowald, G., Chen, H. T., Kruhlak, M. J., Callen, E., Livak, F., Nussenzweig, M. C., Sleckman, B. P. und Nussenzweig, A. (2008); 53BP1 facilitates long-range DNA end-joining during V(D)J recombination; *Nature*; 456:529-533

Dimitrova, N., Chen, Y. C., Spector, D. L. und de Lange, T. (2008); 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility; *Nature*; 456:524-528

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. und et al. (1995); A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 92:9363-9367

Douglas, P., Gupta, S., Morrice, N., Meek, K. und Lees-Miller, S. P. (2005); DNA-PK-dependent phosphorylation of Ku70/80 is not required for non-homologous end joining; *DNA repair*; 4:1006-1018

Duheron, V., Hess, E., Duval, M., Decossas, M., Castaneda, B., Kloppner, J. E., Amoasii, L., Barbaroux, J. B., Williams, I. R., Yagita, H., Penninger, J., Choi, Y., Lezot, F., Groves, R., Paus, R. und Mueller, C. G. (2011); Receptor activator of NF-kappaB (RANK) stimulates the proliferation of epithelial cells of the epidermo-pilosebaceous unit; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108:5342-5347

Failla, G. (1958); The aging process and cancerogenesis; *Annals of the New York Academy of Sciences*; 71:1124-1140

Feiertag, I.(1875); Über die Bildung der Haare: Inaugural-Dissertation; C. Mattiesen; 61048827

Fellin, W.(2006); Das richtige Wasser für Ihre Gesundheit: Welches Wasser ist wirklich rein? So beugen Sie Krankheiten vor und steigern Ihr Wohlbefinden Trias; 3830422377

Flores, I., Canela, A., Vera, E., Tejera, A., Cotsarelis, G. und Blasco, M. A. (2008); The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments; *Genes & development*; 22:654-667

Flores, I., Cayuela, M. L. und Blasco, M. A. (2005); Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior; *Science, N.Y*; 309:1253-1256

Freifelder, D. (1965); Mechanism of inactivation of coliphage T7 by x-rays; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 54:128-134

Freitas, A. A. und de Magalhaes, J. P. (2011); A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing; *Mutation research*; 728:12-22

Fuchs, E. (2008); Skin stem cells: rising to the surface; *The Journal of cell biology*; 180:273-284

Fuchs, E. und Segre, J. A. (2000); Stem cells: a new lease on life; *Cell*; 100:143-155

Gannon, H. S., Donehower, L. A., Lyle, S. und Jones, S. N. (2011); Mdm2-p53 signaling regulates epidermal stem cell senescence and premature aging phenotypes in mouse skin; *Developmental biology*; 353:1-9

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. und Stein, H. (1984); Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67; *J Immunol*; 133:1710-1715



- Glanzmann, E. und Riniker, P. (1950); [Essential lymphocytophthisis; new clinical aspect of infant pathology]; *Annales paediatrici*; 175:1-32
- Goodarzi, A. A. und Jeggo, P. A. (2009); 'A mover and a shaker': 53BP1 allows DNA doublestrand breaks a chance to dance and unite; *F1000 biology reports*; 1:21
- Goodhead, D. T. (1994); Initial events in the cellular effects of ionizing radiations: clustered damage in DNA; *International journal of radiation biology*; 65:7-17
- Gronemeyer, H.; <http://www.epitron.eu/index.php>
- Hall, E. und Giaccia, A.(2006); *Radiobiology for the Radiologist* Lippincott Williams & Wilkins; 1608311937
- Harbo, M., Koelvræa, S., Serakinci, N. und Bendix, L. (2012); Telomere dynamics in human mesenchymal stem cells after exposure to acute oxidative stress; DNA repair; 11:774-779
- Hardy, M. H. (1989); The use of retinoids as probes for analyzing morphogenesis of glands from epithelial tissues; *In Vitro Cell Dev Biol*; 25:454-459
- Harley, C. B. (1991); Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?; *Mutation research*; 256:271-282
- Harman, D. (1956); Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry; *Journal of gerontology*; 11:298-300
- Harman, D. (1972); The biologic clock: the mitochondria?; *Journal of the American Geriatrics Society*; 20:145-147
- Harman, D. (2003); The free radical theory of aging; *Antioxidants & redox signaling*; 5:557-561
- Hastie, N. D., Dempster, M., Dunlop, M. G., Thompson, A. M., Green, D. K. und Allshire, R. C. (1990); Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing; *Nature*; 346:866-868
- Hayflick, L. und Moorhead, P. S. (1961); The serial cultivation of human diploid cell strains; *Experimental cell research*; 25:585-621
- Hebbes, T. R., Thorne, A. W. und Crane-Robinson, C. (1988); A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin; *The EMBO journal*; 7:1395-1402
- Helenius, M., Kyrylenko, S., Vehvilainen, P. und Salminen, A. (2001); Characterization of aging-associated up-regulation of constitutive nuclear factor-kappa B binding activity; *Antioxidants & redox signaling*; 3:147-156
- Herbig, U., Ferreira, M., Condell, L., Carey, D. und Sedivy, J. M. (2006); Cellular senescence in aging primates; *Science, N.Y.*; 311:1257
- Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P., Chen, D. J. und Sedivy, J. M. (2004); Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a); *Molecular cell*; 14:501-513
- Hewitt, G., Jurk, D., Marques, F. D., Correia-Melo, C., Hardy, T., Gackowska, A., Anderson, R., Taschuk, M., Mann, J. und Passos, J. F. (2012); Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence; *Nature communications*; 3:708
- Hitzig, W., Biro, Z., Bosch, H. und Huser, H. (1958); Agammaglobulinämie und P lymphozytose mit Schwund des lymphatischen Gewebes; *Helv Paediatr Acta*; 13:551-585
- Ho, A. D., Wagner, W. und Mahlknecht, U. (2005); Stem cells and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine; *EMBO reports*; 6 Spec No:35-38





- Hoeijmakers, J. H. (2001); Genome maintenance mechanisms for preventing cancer; *Nature*; 411:366-374
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y. und Suda, T. (2006); Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells; *Nature medicine*; 12:446-451
- Iwabuchi, K., Bartel, P. L., Li, B., Marraccino, R. und Fields, S. (1994); Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 91:6098-6102
- Jackson, A. L. und Loeb, L. A. (2001); The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer; *Mutation research*; 477:7-21
- Jenuwein, T. und Allis, C. D. (2001); Translating the histone code; *Science, N.Y.*; 293:1074-1080
- Jones, D. L. und Wagers, A. J. (2008); No place like home: anatomy and function of the stem cell niche; *Nature reviews*; 9:11-21
- Kalinich, J. F., Catravas, G. N. und Snyder, S. L. (1989); The effect of gamma radiation on DNA methylation; *Radiation research*; 117:185-197
- Kaplan, H. S. (1966); DNA-strand scission and loss of viability after x irradiation of normal and sensitized bacterial cells; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 55:1442-1446
- Kaur, P. (2006); Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential; *The Journal of investigative dermatology*; 126:1450-1458
- Kipling, D. und Cooke, H. J. (1990); Hypervariable ultra-long telomeres in mice; *Nature*; 347:400-402
- Koster, M. I. (2009); Making an epidermis; *Annals of the New York Academy of Sciences*; 1170:7-10
- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L. und Sharpless, N. E. (2004); Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging; *The Journal of clinical investigation*; 114:1299-1307
- Kronic, D., Moshir, S., Greulich-Bode, K. M., Figueroa, R., Cerezo, A., Stammer, H., Stark, H. J., Gray, S. G., Nielsen, K. V., Hartschuh, W. und Boukamp, P. (2009); Tissue context-activated telomerase in human epidermis correlates with little age-dependent telomere loss; *Biochimica et biophysica acta*; 1792:297-308
- Li, L. und Clevers, H. (2010); Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals; *Science, N.Y.*; 327:542-545
- Lin, H. und Spradling, A. C. (1997); A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary; *Development (Cambridge, England)*; 124:2463-2476
- Lindner, G., Botchkarev, V. A., Botchkareva, N. V., Ling, G., van der Veen, C. und Paus, R. (1997); Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen); *The American journal of pathology*; 151:1601-1617
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001); Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method; *Methods, Calif.*; 25:402-408
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, L. und Darnell, J. (2004); *Molecular biology of the cell*; WH Freeman; 0716743663
- Lorat, Y. (2012); Elektronenmikroskopischer Nachweis von DNA-Reparaturfaktoren des Nicht-Homologen End-Joining im Kontext des Chromatins; Thesis; Universität des Saarlandes



Lorat, Y., Schanz, S., Schuler, N., Wennemuth, G., Rube, C. und Rube, C. E. (2012); Beyond repair foci: DNA double-strand break repair in euchromatic and heterochromatic compartments analyzed by transmission electron microscopy; *PLoS one*; 7:e38165

Lottspeich, F. und Engels, J.(2006); *Bioanalytik*; Elsevier Spektrum Akademischer Verlag; 3827415209

Lukas, C., Savic, V., Bekker-Jensen, S., Doil, C., Neumann, B., Pedersen, R. S., Grofte, M., Chan, K. L., Hickson, I. D., Bartek, J. und Lukas, J. (2011); 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress; *Nature cell biology*; 13:243-253

Mackenzie, I. C. (1997); Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure; *The Journal of investigative dermatology*; 109:377-383

Marchenko, N. D., Zaika, A. und Moll, U. M. (2000); Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling; *The Journal of biological chemistry*; 275:16202-16212

Mello, M. L. (1983); Cytochemical properties of euchromatin and heterochromatin; *The Histochemical journal*; 15:739-751

Meves, A.(2006); *Intensivkurs Dermatologie*; Fischer Verlag / Elsevier GmbH; 3437411624

Mochan, T. A., Venere, M., DiTullio, R. A., Jr. und Halazonetis, T. D. (2004); 53BP1, an activator of ATM in response to DNA damage; *DNA repair*; 3:945-952

Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. A. und Cotsarelis, G. (2004); Capturing and profiling adult hair follicle stem cells; *Nat Biotechnol*; 22:411-417

Morris, R. J. und Potten, C. S. (1999); Highly persistent label-retaining cells in the hair follicles of mice and their fate following induction of anagen; *The Journal of investigative dermatology*; 112:470-475

Morrison, S. J., Prowse, K. R., Ho, P. und Weissman, I. L. (1996a); Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential; *Immunity*; 5:207-216

Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Akashi, K., Globerson, A. und Weissman, I. L. (1996b); The aging of hematopoietic stem cells; *Nature medicine*; 2:1011-1016

Morrison, S. J., Wright, D. E., Cheshier, S. H. und Weissman, I. L. (1997); Hematopoietic stem cells: challenges to expectations; *Current opinion in immunology*; 9:216-221

Murr, R., Loizou, J. I., Yang, Y. G., Cuenin, C., Li, H., Wang, Z. Q. und Herceg, Z. (2006); Histone acetylation by Trrap-Tip60 modulates loading of repair proteins and repair of DNA double-strand breaks; *Nature cell biology*; 8:91-99

Myung, P. und Ito, M. (2012); Dissecting the bulge in hair regeneration; *The Journal of clinical investigation*; 122:448-454

Nakamura, A. J., Chiang, Y. J., Hathcock, K. S., Horikawa, I., Sedelnikova, O. A., Hodes, R. J. und Bonner, W. M. (2008); Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence; *Epigenetics & chromatin*; 1:6

Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A. W., Hearn, S. A., Spector, D. L., Hannon, G. J. und Lowe, S. W. (2003); Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence; *Cell*; 113:703-716

Nikjoo, H., O'Neill, P., Goodhead, D. T. und Terrissol, M. (1997); Computational modelling of low-energy electron-induced DNA damage by early physical and chemical events; *International journal of radiation biology*; 71:467-483

Nishimura, E. K., Granter, S. R. und Fisher, D. E. (2005); Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche; *Science*, N.Y.; 307:720-724



Noon, A. T. und Goodarzi, A. A. (2011); 53BP1-mediated DNA double strand break repair: Insert bad pun here; DNA repair;

Nowak, J. A. und Fuchs, E. (2009); Isolation and culture of epithelial stem cells; Methods in molecular biology, N.J; 482:215-232

Ohyama, M., Terunuma, A., Tock, C. L., Radonovich, M. F., Pise-Masison, C. A., Hopping, S. B., Brady, J. N., Udey, M. C. und Vogel, J. C. (2006); Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells; The Journal of clinical investigation; 116:249-260

Ono, T., Uehara, Y., Kurishita, A., Tawa, R. und Sakurai, H. (1993); Biological significance of DNA methylation in the ageing process; Age and ageing; 22:S34-43

Orlowski, C., Mah, L. J., Vasireddy, R. S., El-Osta, A. und Karagiannis, T. C. (2011); Double-strand breaks and the concept of short- and long-term epigenetic memory; Chromosoma; 120:129-149

Oshima, H., Rochat, A., Kedzia, C., Kobayashi, K. und Barrandon, Y. (2001); Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells; Cell; 104:233-245

Paus, R., van der Veen, C., Eichmuller, S., Kopp, T., Hagen, E., Muller-Rover, S. und Hofmann, U. (1998); Generation and cyclic remodeling of the hair follicle immune system in mice; The Journal of investigative dermatology; 111:7-18

Pogribny, I., Koturbash, I., Tryndyak, V., Hudson, D., Stevenson, S. M., Sedelnikova, O., Bonner, W. und Kovalchuk, O. (2005); Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus; Mol Cancer Res; 3:553-561

Pompei, F., Polkanov, M. und Wilson, R. (2001); Age distribution of cancer in mice: the incidence turnover at old age; Toxicology and industrial health; 17:7-16

Potten, C. S. (1974); The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell; Cell and tissue kinetics; 7:77-88

Potten, C. S. (1985); Cell death (apoptosis) in hair follicles and consequent changes in the width of hairs after irradiation of growing follicles; International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine; 48:349-360

Potten, C. S., Saffhill, R. und Maibach, H. I. (1987); Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig; Cell and tissue kinetics; 20:461-472

Prise, K. M., Davies, S. und Michael, B. D. (1989); Cell killing and DNA damage in Chinese hamster V79 cells treated with hydrogen peroxide; International journal of radiation biology; 55:583-592

Rando, T. A. (2006); Stem cells, ageing and the quest for immortality; Nature; 441:1080-1086

Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B. D., Sun, Z. W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C. P., Allis, C. D. und Jenuwein, T. (2000); Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases; Nature; 406:593-599

Rink, H. (1971); Die Radiolyse des Wassers; Chemie in unserer Zeit; 5:90-95

Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. und Bonner, W. M. (1998); DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139; The Journal of biological chemistry; 273:5858-5868

Rossi, D. J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J. und Weissman, I. L. (2007); Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age; Nature; 447:725-729



- Rothkamm, K. und Löbrich, M. (2003); Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 100:5057-5062
- Rübe, C. E., Fricke, A., Widmann, T. A., Furst, T., Madry, H., Pfreundschuh, M. und Rübe, C. (2011a); Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging; PloS one; 6:e17487
- Rübe, C. E., Lorat, Y., Schuler, N., Schanz, S., Wennemuth, G. und Rübe, C. (2011b); DNA repair in the context of chromatin: new molecular insights by the nanoscale detection of DNA repair complexes using transmission electron microscopy; DNA repair; 10:427-437
- Ryu, B. Y., Orwig, K. E., Oatley, J. M., Avarbock, M. R. und Brinster, R. L. (2006); Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal; Stem cells (Dayton, Ohio); 24:1505-1511
- Schaaper, R. M. (1993); Base selection, proofreading, and mismatch repair during DNA replication in Escherichia coli; The Journal of biological chemistry; 268:23762-23765
- Schofield, R. (1978); The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell Blood Cells; 4:7-25
- Schulte-Uentrop, L., El-Awady, R. A., Schliecker, L., Willers, H. und Dahm-Daphi, J. (2008); Distinct roles of XRCC4 and Ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease- and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks; Nucleic acids research; 36:2561-2569
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M. und Barrett, J. C. (2004); Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks; Nature cell biology; 6:168-170
- Seyffert, W., Ballig, R., Bunse, A., Gert de Couet, H., Fischbach, K., Glätzer, K., Hagemann, R., Hess, O., Hollenberg, C., Jäckle, H., Jürgens, G., Kück, U., Melchers, I., Nickelsen, J., Nordheim, A., Nowrousian, M., Pieler, T., Piotrowski, M., Pöggeler, S., Scharthl, M., Sommer, R., Speit, G., Steinbach, P. und Tautz, D. (2003); Lehrbuch der Genetik; Spektrum akademischer Verlag; 3827410223
- Sharma, G. G., So, S., Gupta, A., Kumar, R., Cayrou, C., Avvakumov, N., Bhadra, U., Pandita, R. K., Porteus, M. H., Chen, D. J., Cote, J. und Pandita, T. K. (2010); MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair; Molecular and cellular biology; 30:3582-3595
- Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Christianson, S. W., Gott, B., Schweitzer, I. B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T. V., Greiner, D. L. und et al. (1995); Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice; J Immunol; 154:180-191
- Sotiropoulou, P. A., Candi, A., Mascré, G., De Clercq, S., Youssef, K. K., Lapouge, G., Dahl, E., Semeraro, C., Denecker, G., Marine, J. C. und Blanpain, C. (2010); Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death; Nature cell biology; 12:572-582
- Spagnolo, L., Rivera-Calzada, A., Pearl, L. H. und Llorca, O. (2006); Three-dimensional structure of the human DNA-PKcs/Ku70/Ku80 complex assembled on DNA and its implications for DNA DSB repair; Molecular cell; 22:511-519
- Spencer, N. F., Poynter, M. E., Im, S. Y. und Daynes, R. A. (1997); Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging; International immunology; 9:1581-1588
- Stephan, J. L., Vlekova, V., Le Deist, F., Blanche, S., Donadieu, J., De Saint-Basile, G., Durandy, A., Griscelli, C. und Fischer, A. (1993); Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients; The Journal of pediatrics; 123:564-572
- Stern, M. M. und Bickenbach, J. R. (2007); Epidermal stem cells are resistant to cellular aging; Aging cell; 6:439-452



- Stöhr, P. H. (1903); Entwicklungsgeschichte des menschlichen Wollhaares; *Anatomy and Embryology* 23:2-66
- Strahl, B. D. und Allis, C. D. (2000); The language of covalent histone modifications; *Nature*; 403:41-45
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G. und Thomson, J. N. (1983); The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*; *Developmental biology*; 100:64-119
- Suwa, A., Hirakata, M., Takeda, Y., Jesch, S. A., Mimori, T. und Hardin, J. A. (1994); DNA-dependent protein kinase (Ku protein-p350 complex) assembles on double-stranded DNA; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 91:6904-6908
- Suzuki, M., Suzuki, K., Kodama, S. und Watanabe, M. (2006); Phosphorylated histone H2AX foci persist on rejoined mitotic chromosomes in normal human diploid cells exposed to ionizing radiation; *Radiation research*; 165:269-276
- Swarts, S. G., Sevilla, M. D., Becker, D., Tokar, C. J. und Wheeler, K. T. (1992); Radiation-induced DNA damage as a function of hydration. I. Release of unaltered bases; *Radiation research*; 129:333-344
- Szilard, L. (1959); On the Nature of the Aging Process; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 45:30-45
- Takai, H., Smogorzewska, A. und de Lange, T. (2003); DNA damage foci at dysfunctional telomeres; *Curr Biol*; 13:1549-1556
- Taylor, G., Lehrer, M. S., Jensen, P. J., Sun, T. T. und Lavker, R. M. (2000); Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis; *Cell*; 102:451-461
- Taylor, R. S., Ramirez, R. D., Ogoshi, M., Chaffins, M., Piatyszek, M. A. und Shay, J. W. (1996); Detection of telomerase activity in malignant and nonmalignant skin conditions; *The Journal of investigative dermatology*; 106:759-765
- Trempus, C. S., Morris, R. J., Bortner, C. D., Cotsarelis, G., Faircloth, R. S., Reece, J. M. und Tennant, R. W. (2003); Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34; *The Journal of investigative dermatology*; 120:501-511
- van Attikum, H. und Gasser, S. M. (2005); The histone code at DNA breaks: a guide to repair?; *Nature reviews*; 6:757-765
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Ladhoff, J., d'Adda di Fagagna, F. und Jackson, S. P. (2005); Human cell senescence as a DNA damage response; *Mechanisms of ageing and development*; 126:111-117
- Walker, J. R., Corpina, R. A. und Goldberg, J. (2001); Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair; *Nature*; 412:607-614
- Ward, J. F. (1988); DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability; *Progress in nucleic acid research and molecular biology*; 35:95-125
- Ward, J. F., Blakely, W. F. und Joner, E. I. (1985); Mammalian cells are not killed by DNA single-strand breaks caused by hydroxyl radicals from hydrogen peroxide; *Radiation research*; 103:383-392
- Woo, M., Hakem, R., Soengas, M. S., Duncan, G. S., Shahinian, A., Kagi, D., Hakem, A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, S. A., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, S. W. und Mak, T. W. (1998); Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes; *Genes & development*; 12:806-819
- Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. und Shay, J. W. (1996); Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells; *Developmental genetics*; 18:173-179



- Wu, Z. H., Shi, Y., Tibbetts, R. S. und Miyamoto, S. (2006); Molecular linkage between the kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli; Science (New York, N.Y.; 311:1141-1146
- Yarbrough, W. G., Buckmire, R. A., Bessho, M. und Liu, E. T. (1999); Biologic and biochemical analyses of p16(INK4a) mutations from primary tumors; Journal of the National Cancer Institute; 91:1569-1574
- Yaron, A., Hatzubai, A., Davis, M., Lavon, I., Amit, S., Manning, A. M., Andersen, J. S., Mann, M., Mercurio, F. und Ben-Neriah, Y. (1998); Identification of the receptor component of the I kappa B alpha-ubiquitin ligase; Nature; 396:590-594
- Zahn, J. M., Poosala, S., Owen, A. B., Ingram, D. K., Lustig, A., Carter, A., Weeraratna, A. T., Taub, D. D., Gorospe, M., Mazan-Mamczarz, K., Lakatta, E. G., Boheler, K. R., Xu, X., Mattson, M. P., Falco, G., Ko, M. S., Schlessinger, D., Firman, J., Kummerfeld, S. K., Wood, W. H., 3rd, Zonderman, A. B., Kim, S. K. und Becker, K. G. (2007); AGEMAP: a gene expression database for aging in mice; PLoS genetics; 3:e201
- Zhang, Y. und Herman, B. (2002); Ageing and apoptosis; Mechanisms of ageing and development; 123:245-260
- Zhu, A. J., Haase, I. und Watt, F. M. (1999); Signaling via beta1 integrins and mitogen-activated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 96:6728-6733

## 8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1: Reize, DNA-Schäden und die Folgen:.....	2
Abbildung 1-2: Chromatinaufbau: .....	5
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des Öffnungsprozesses des Chromatins:.....	7
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der beiden DSB-Reparaturwege: .....	8
Abbildung 1-5: 53BP1 und seine Funktionen: .....	10
Abbildung 1-6: Die beiden Wege der Apoptose:.....	13
Abbildung 1-7: Schematischer Aufbau des Haarfollikels: .....	15
Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus:.....	26
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz: .....	29
Abbildung 3-3: Schematischer Aufbau des Transmissions-Elektronen-Mikroskops:.....	33
Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Immunogoldfärbung: .....	34
Abbildung 3-5: Emissionsspektren der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe:.....	39
Abbildung 3-6: Beispielhafte durchflusszytometrische Analyse: .....	39
Abbildung 4-1: Identifizierung und Analyse von CD34-positiven Stammzellen: .....	45
Abbildung 4-2: Kolokalisation von 53BP1 und $\gamma$ H2AX: .....	46
Abbildung 4-3: Altersabhängige Veränderungen in der Anzahl der Reparaturproteine:.....	48
Abbildung 4-4: Induktion und Reparatur von DSBs: .....	51
Abbildung 4-5: Analyse von Reparaturproteinen nach fraktionierter Niedrigdosisbestrahlung: .....	53



Abbildung 4-6: Telomer-assoziierte 53BP1-Foci: .....	56
Abbildung 4-7: TEM Aufnahme einer HFSC 30 min nach 2 Gy Bestrahlung: .....	59
Abbildung 4-8: Altersabhängige Verteilung der 53BP1 Cluster im Chromatin: .....	60
Abbildung 4-9: TEM Aufnahme einer HFSC 72 h nach protrahierter Bestrahlung: .....	61
Abbildung 4-10: Chromatiumgebung der 53BP1 Cluster: .....	62
Abbildung 4-11: Aufnahmen von Haarfollikeln einer 2 Monate alten Maus: .....	64
Abbildung 4-12: Untersuchung von Apoptose und Seneszenz im Gewebeverband: .....	65
Abbildung 4-13: Lichtmikroskopische Untersuchung der Seneszenz mittels p16 <sup>ink4a</sup> : .....	67
Abbildung 4-14: Durchflusszytometrische Analyse von Caspase-3 und p16 <sup>ink4a</sup> in Zellpopulationen der Haut: .....	68
Abbildung 4-15: Chromatinveränderungen: .....	69
Abbildung 4-16: Beispielhafte Amplifikations- (A) und Schmelzkurven (B) der qPCR: .....	73
Abbildung 4-17: QPCR Auswertung durch die „real time“ Software: .....	74
Abbildung 4-18: Expressionsanalyse: .....	75
Abbildung 4-19: Aktivierung des NF-κB-Signalweges: .....	77
Abbildung 4-20: Veränderungen der Zellzahl: .....	79
Abbildung 5-1: Postulierte Reaktion der Stammzellen auf endogene und exogene Stimulation: .....	94

## 9 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: DNA-Schäden nach 1 Gy ionisierender Strahlung: .....	4
Tabelle 2: Materialliste unter Angabe des Herstellers: .....	18
Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper: .....	21
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper: .....	23
Tabelle 5: Auflistung aller verwendeten Gerätschaften unter Angabe des Herstellers: .....	23
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Computersoftware unter Angabe des Herstellers: .....	25
Tabelle 7: Statistische Auswertung: .....	40
Tabelle 8: Untersuchte Gene: .....	42



## 10 DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Professorin Dr. med. Claudia Rube für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und der ständigen Förderung dieses Projektes durch ihre stetige Unterstützung und konstruktive Kritik. Weiter gilt mein Dank Professor Christian Rube für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie Professor Dr. rer. nat. Montenarh für die Übernahme der wichtigen Position des Doktorvaters.

Bei meinen lieben Kolleginnen, insbesondere Frau Lorat, die mich ins TEM eingearbeitet hat und mir auch stets mit neuen Schnitten das Leben erleichtert hat, sowie Frau Brunner, die meine gesamte Arbeit mit Adleraugen korrigiert hat, möchte ich mich hiermit recht herzlich bedanken. Diese beiden Kolleginnen haben mich auf dem langen und manchmal auch steinigen Weg der Dissertation stets unterstützt, und ich hoffe, dass diese Kooperation auch darüber hinaus noch bestehen wird.

Zum Schluss – aber immer an vorderster Front – geht mein wichtigster Dank an meinen Mann und meine lieben Eltern, die mich durch mein ganzes Studium bis hin zur Fertigstellung meiner Doktorarbeit begleitet und stets seelisch und moralisch oben gehalten haben, wenn die Zeiten mal schwer waren.

**DANKE!!!!**