

Die Rolle von Proteinaggregation und Proteinhomeostase im seneszenten Zellkern

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Anja Lena Singer
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Oktober 2011

**Aus dem Leibniz-Institut für umweltmedizinische Forschung
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

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

Referent: Prof. Dr. Anna von Mikecz

Koreferent: Prof. Dr. Rolf Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2011

„Jeder, der sich
die Fähigkeit erhält,
Schönes zu erkennen,
wird nie alt werden“.

Franz Kafka, 1883-1924, Schriftsteller

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	IV
Summary	V
1 Einleitung	1
1.1 Der Zellkern	1
1.2 Der Zellzyklus	1
1.2.1 Zellzykluskontrollpunkte und p16 ^{INK4a} -pRb- abhängiger Zellzyklusarrest	3
1.2.2 DNA-Schäden, DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur	5
1.2.3 p53-p21-abhängiger Zellzyklusarrest	6
1.3 Zelluläre Seneszenz	8
1.3.1 Theorien über das organismische Altern	9
1.3.2 Marker für replikative Seneszenz	10
1.4 Seneszenz, Tumorsuppression und Tumorprogression	13
1.5 Neurodegenerative Erkrankungen	15
1.6 Das Ubiquitin-Proteasomen-System	17
2 Fragestellung	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Reagenzien und Chemikalien	22
3.2 Puffer und Lösungen	24
3.3 Antikörper	28
3.3.1 Primäre Antikörper	28
3.3.2 Sekundäre Antikörper	29
3.4 Verbrauchsmaterialien	30
3.5 Technische Geräte	31
3.6 Zellkultur	32
3.6.1 Kultivierung	32
3.6.2 Verwendete Zelltypen	33
3.6.3 Kulturmedien	34
3.7 Behandlung von Zellen	34
3.8 β -Galaktosidaseassay	34
3.9 Indirekte Immunfluoreszenz	35
3.10 Gelelektrophorese und Western Blot	35
3.10.1 Coomassiefärbung von SDS-Gelen	36
3.11 Filterbindungsassay	37
3.12 <i>In vivo</i> complex of enzyme(ICE)-Bioassay	37
3.13 Zellfraktionierung und Proteasomaler Aktivitätsassay (PAA)	38
3.14 Mikroskopie und Bildbearbeitung	39

4 Ergebnisse	41
4.1 Analyse von Seneszenzmarkern in WI-38 Zellen und HDFs	41
4.2 HDFs bilden Seneszenz-assoziierte Proteinaggregate (SAPAs)	42
4.2.1 Lokalisation der SAPAs in Bezug auf Heterochromatin	42
4.3 Analyse der in SAPAs enthaltenen Proteine	46
4.3.1 Die Expression von Topol	46
4.3.2 SAPAs kolokalisieren mit endogenem Huntingtin	47
4.3.3 SAPAs enthalten SDS-unlösliche Proteine	49
4.3.4 Topol-SAPAs kolokalisieren mit nucleären Proteinen	50
4.4 Analyse von NuMA in seneszenten WI-38 und HDFs	54
4.4.1 NuMA wird in seneszenten WI-38 und HDFs modifiziert	54
4.4.2 NuMA wird während der replikativen Seneszenz phosphoryliert	55
4.4.3 Phospho-NuMA kolokalisiert mit γ H2AX	57
4.5 SAPAs sind mit DNA-Schadensorten assoziiert	59
4.5.1 SAPAs sind mit p-NuMA- und γ H2AX-Foci benachbart	59
4.5.2 Kovalente Topol-DNA-Komplexe nehmen in seneszenten HDFs zu	61
4.6 Die Rolle des UPS in der replikativen Seneszenz	62
4.6.1 Die Lokalisation der 20S Proteasomen in seneszenten WI-38 und HDFs	62
4.6.2 Die nucleäre proteasomale Aktivität in WI-38 und HDFs	64
4.6.3 Die cytoplasmatische proteasomale Aktivität in WI-38 und HDFs	66
4.6.4 Die Expression proteasomaler Untereinheiten in WI-38 und HDFs	67
4.7 Analyse des UPS in Zellen ohne SAHFs und SAPAs	69
4.7.1 Expression von Seneszenzmarkern in HFFs	69
4.7.2 Die Proteasomale Aktivität und Expression proteasomaler Untereinheiten in HFFs	70
5 Diskussion	74
5.1 WI-38 und HDFs exprimieren die selben Seneszenzmarker	74
5.2 SAPAs bilden sich nur in HDFs	74
5.2.1 SAPAs sind nicht Chromatinassoziiert	74
5.2.2 Die Expression von Topol ist in WI-38 und HDFs verschieden	76
5.3 SAPAs teilen Eigenschaften mit krankheitsbedingten Proteinaggregaten	77
5.3.1 In SAPAs segregiert das aggregationsanfällige Protein Huntingtin	77
5.3.2 SAPAs enthalten SDS-unlösliche Proteine	78
5.3.3 In SAPAs segregieren essentielle nucleäre Proteine	79
5.4 NuMA ist ein Marker für replikative Seneszenz	83
5.4.1 NuMA wird in seneszenten Fibroblasten phosphoryliert	83
5.4.2 SAPAs lokalisieren an DNA-Schadensorten	84
5.4.3 In seneszenten HDFs akkumulieren kovalente Topol-DNA-Komplexe	85
5.5 Die proteasomale Aktivität verändert sich während der replikativen Seneszenz	86
5.5.1 Die Lokalisation der 20S Proteasomen ist in WI-38 und HDFs verschieden	86
5.5.2 Die nucleäre proteasomale Aktivität ist in seneszenten WI-38 und HDFs erhöht	86
5.5.3 Die Zunahme der nucleären proteasomalen Aktivität ist unabhängig von SAHFs oder SAPAs	87
5.6 Hypothese	90

6 Literaturverzeichnis	92
7 Abkürzungsverzeichnis	103
8 Danksagung	107
9 Erklärung	108

Zusammenfassung

Proteinaggregation ist das Kennzeichen neurodegenerativer Erkrankungen. Bis jetzt ist wenig darüber bekannt, ob Proteinaggregation auch unabhängig von Krankheiten altersbedingt auftritt. Diese Frage sollte mit dem Modell der replikativen Seneszenz beantwortet werden. Replikative Seneszenz bezeichnet den irreversiblen Zellzyklusarrest, den Zellen durch regelmäßiges Kultivieren *in vitro* erreichen. In dieser Arbeit wurden fötale Fibroblasten aus der Lunge (WI-38), humane dermale Fibroblasten (HDFs) und humane Vorhautfibroblasten (*engl. human foreskin fibroblasts, HFF*) auf Proteinaggregation untersucht. Während alle drei Fibroblastentypen mit β -Galaktosidase und den Cyclin-Kinase Inhibitoren p21 und p16 dieselben Seneszenzmarker exprimierten, formierten sich nur in HDFs *Seneszenz assoziierte Proteinaggregate* (SAPAs) im Zellkern. In seneszenten WI-38 Zellen bildeten sich durch Veränderungen des Chromatins sogenannte *Seneszenz assoziierte Heterochromatin Foci* (SAHF). In HFF konnten weder SAHFs noch SAPAs beobachtet werden. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Analyse der SAPAs. Es konnte gezeigt werden, dass SAPAs aus Proteinen zusammengesetzt sind, die wichtig für die DNA-Replikation, Transkription, Proteolyse, Zellzykluskontrolle und die Antwort auf DNA-Schäden sind. Mit Filterbindungsassays wurden zwei Komponenten der SAPAs identifiziert, die SDS-unlöslich wurden; eine Eigenschaft, die sie mit Proteinaggregaten neurodegenerativer Erkrankungen teilen. Mittels *In vivo* complex of enzyme-bioassays konnte gezeigt werden, dass in seneszenten HDFs die Anzahl toxischer Topoisomerasel-DNA-Komplexe ansteigt. Zudem konnten SAPAs durch Kolokalisationsstudien mit den DNA-Schadensmarkern γ H2AX und Phospho-NuMA eindeutig mit DNA-Schäden assoziiert, und NuMA als neuer Seneszenzmarker etabliert werden. Die Analyse des Ubiquitin-Proteasomen Systems ergab einen Anstieg der nucleären proteasomalen Aktivität in seneszenten HDFs, der jedoch auch in WI-38 und HFFs beobachtet wurde. SAPAs konnten demnach als alleinige Ursache für die erhöhte proteasomale Aktivität in HDFs ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit wurde ein neuer Seneszenzphänotyp etabliert, bei dem sich SAPAs altersbedingt und unabhängig von Krankheiten bilden. Die Vermutung liegt nahe, dass in SAPAs wichtige nucleäre Proteine segregieren und dadurch der Zustand der replikativen Seneszenz in HDFs manifestiert wird.

Summary

Protein aggregation is a hallmark of neurodegenerative diseases, but little is known about age-related aggregation in the non-disease condition. The model of replicative senescence was used, to answer this question. Replicative senescence is a state of irreversible cell cycle arrest of cells after serial cultivation *in vitro*. In these study fetal lung fibroblasts (WI-38), human dermal fibroblasts (HDF) and human foreskin fibroblasts (HFFs) were analysed for protein aggregation. While they all share markers such as increased β -galactosidase activity, and upregulation of cyclin-kinase inhibitors p16 and p21, only human dermal fibroblasts showed *senescence associated protein aggregates* (SAPAs) in the nucleus. In the nucleus of senescent WI-38 cells, the chromatin undergoes changes through the formation of facultative heterochromatin called *senescence associated heterochromatin foci* (SAHFs). However, HFF neither showed SAPA nor heterochromatin formation. Here, major emphasis was laid on analysis of SAPAs.

SAPAs are composed of proteins important for DNA replication, transcription, proteolysis, cell cycle control and DNA damage response. At least, two SAPA components become SDS-insoluble as shown with filter retardation assays. SDS-insolubility is a hallmark of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *In vivo* complex of enzyme-bioassays showed an increase in toxic covalent topoisomerase-DNA-complexes in senescent HDFs. Additionally, colocalisation studies with DNA damage markers γ H2AX and phospho-NuMA revealed an association of SAPAs with DNA damage sites. Here, NuMA was established as new marker for replicative senescence.

Analysis of the ubiquitin-proteasome system reveals an increase of global proteasomal activity in senescent HDFs. This increase was also observed for aged WI-38 and HFFs; therefore SAPAs are not the only reason for increased proteolytic activity.

Here, a new senescence phenotype was established, forming aggregates in an age-related, non-disease condition. Supposable, essential nuclear proteins are segregated in SAPAs, which in turn manifest the status of replicative senescence in HDFs.

1 Einleitung

1.1 Der Zellkern

Der Zellkern (Nucleus) ist das Merkmal aller Eukaryonten (*griech. Karyon*, der Kern). Er ist die Schaltzentrale der Zelle, da er die Erbinformation in Form von DNA (*engl. Desoxyribonucleinacid*) enthält. In ihm finden die DNA-Replikation, die Genexpression, die DNA-Reparatur und die Ribosomenbiogenese statt.

Die DNA liegt im Zellkern in Form von Chromatin vor. Als Chromatin wird der Komplex aus DNA, Histonen und nicht Histonproteinen bezeichnet. Je zwei Moleküle der Histone H2A, H2B, H3 und H4 lagern sich zu einem Oktamer zusammen und bilden mit der DNA, die um das Oktamer gewunden ist, Nucleosomen. Die Chromatinstruktur kann durch Modifikationen der N-terminalen Histonschwänze, die aus den Nucleosomen herausragen, verändert werden. Es gibt viele Möglichkeiten der Modifikation. Acetylierungen der Histonschwänze führen zu einer offenen Chromatinstruktur, die Euchromatin genannt wird, wohingegen Methylierungen zu einer dicht gepackten Chromatinstruktur, dem Heterochromatin führen. Die verschiedenen Modifikationsmöglichkeiten werden zum sogenannten Histon-Code zusammengefasst (Jenuwein, 2001). Euchromatin wird meist mit transkriptionell aktiven Regionen in Verbindung gebracht. Es finden sich jedoch auch aktive Gene in kompaktem Chromatin und stillgelegte Gene im Euchromatin (Gilbert et al. 2004).

Der Zellkern besteht wie das Cytoplasma aus Subkompartimenten, die jedoch nicht, wie im Cytoplasma, durch ein Membransystem voneinander getrennt sind. Chromosomen besetzen zum Beispiel bestimmte Bereiche im Zellkern, die Chromosomenterritorien genannt werden (Cremer et al. 2006).

Andere Beispiele für nucleäre Kompartimente sind der Nucleolus als Ort der Ribosomenbiogenese (Shaw, and E. G. Jordan 1995) und PML-Kernkörperchen (Zhong et al. 2000), die eine Rolle in der Antwort auf zellulären Stress spielen (Bernardi, Pandolfi 2007; Varadaraj et al. 2007; Carbone et al. 2002; Xu et al. 2003). PML-Kernkörperchen enthalten unter anderem die Proteine PML (Promyelozytische Leukämie) und SUMO1 (*engl. small ubiquitin-like modifier 1*).

1.2 Der Zellzyklus

Für eine Zellteilung muss das gesamte Genom der Zelle repliziert und auf die Tochterzellen verteilt werden. Dafür muss die Zelle einen gesamten Zellzyklus durchlaufen.

Der Zellzyklus von Eukaryonten wird in zwei Phasen eingeteilt, in die Interphase und die M-Phase. Die M-Phase beinhaltet die Mitose (Kernteilung) und die Cytokinese (Zellteilung).

Die Interphase besteht aus drei Wachstumsphasen, der G1-Phase, der S-Phase und der G2-Phase. Die G-Phasen bezeichnen die Phasen zwischen M- und S-Phase, wobei G für „gap“ steht, was Lücke bedeutet. In diesen Phasen wächst die Zelle und synthetisiert Proteine, die für die anschließende DNA-Synthese (DNA-Replikation) bzw. Mitose benötigt werden. Die G1-Phase ist eine wichtige regulatorische Phase. Wenn nicht sichergestellt ist, dass die Umweltbedingungen oder die Bedingungen innerhalb der Zelle für eine Zellteilung erfüllt sind, kann die Zelle sehr lange in der G1-Phase verweilen oder in die G0-Phase eintreten. Die G0-Phase ist ein Ruhestadium, in der die Zelle verbleibt, bis mitogene Signale sie wieder zum Wachstum anregen. Die meisten Vertebratenzellen befinden sich in der G0-Phase (Pajalunga et al. 2007).

S steht für Synthese, da in dieser Phase die DNA synthetisiert wird. In Abbildung 1.1 ist der Zellzyklus schematisch dargestellt.

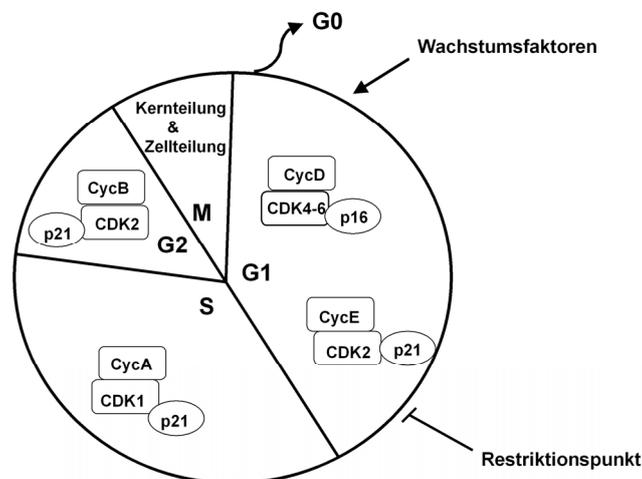


Abbildung 1.1 Der Zellzyklus: Der Zellzyklus wird in zwei Phasen eingeteilt. Die M-Phase, in der die Kernteilung und die Zellteilung stattfindet, und die Interphase, die sich aus der G1-Phase, der S-Phase und der G2-Phase zusammensetzt. In der G1-Phase wird die Zelle durch Wachstumsfaktoren von außen zum Wachstum angeregt. Der CDK4-6/CyclinD-Komplex sorgt für die Progression der G1-Phase; dieser kann von p16 inhibiert werden. Der CDK2-CyclinE-Komplex ist essentiell für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase; dieser kann von p21 inhibiert werden. Der Restriktionspunkt liegt kurz vor der S-Phase. Ab diesem Punkt ist der Zellzyklus unabhängig von weiteren Wachstumsfaktoren. In der S-Phase und der G2-Phase sind die Komplexe CDK1-CyclinA und CDK2-CyclinB für die Progression des Zellzyklus wichtig. Diese können auch von p21 inhibiert werden. Sind die Wachstumsbedingungen nach der M-Phase für eine weitere Zellteilung nicht erfüllt, kann die Zelle in eine Ruhephase übergehen, die G0-Phase genannt wird.

Der Ablauf des Zellzyklus wird in jeder Phase durch das Zusammenspiel von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (*engl. cyclin-dependent kinases*, CDK) gesteuert. In Wirbeltieren gibt es unterschiedliche Cycline und mehrere CDKs. Interagieren die CDKs jeweils mit den richtigen Cyclinen, können sie Proteine phosphorylieren und dadurch aktivieren oder inaktivieren und tragen so zur Progression des Zellzyklus bei.

Für das Fortschreiten der G1-Phase ist der Komplex aus CDK4 und CDK6 mit Cyclin D (CDK4-6/CyclinD) entscheidend. Dieser Komplex ist für die Phosphorylierung des Retinoblastom Protein (Rb) verantwortlich. Wird RB phosphoryliert, wird es inaktiv und kann nicht mehr an Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie binden. E2F-Transkriptionsfaktoren werden daraufhin freigesetzt und initiieren die Transkription von Genen, die Proteine für die DNA-Synthese, wie zum Beispiel Cyclin E, kodieren. Cyclin E bildet daraufhin einen Komplex mit CDK2 (CDK2/Cyclin E), der für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase benötigt wird.

Kurz vor dem Eintritt in die S-Phase liegt der Restriktionspunkt. Ab diesem Punkt ist der Zellzyklus von Wachstumsfaktoren unabhängig und die Progression des Zellzyklus wird weitgehend durch endogene Proteine bestimmt (Lukas et al. 2004). Da es nach Überschreiten dieses Punktes kein zurück mehr gibt, wird dieser Punkt im Englischen auch „*point of no return*“ genannt.

1.2.1 Zellzykluskontrollpunkte und p16^{INK4a}-pRb- abhängiger Zellzyklusarrest

Viele Faktoren sorgen für den einwandfreien Ablauf des Zellzyklus. In jeder Phase des Zellzyklus gibt es sogenannte Zellzykluskontrollpunkte. Diese Kontrollpunkte sind „Mechanismen, durch die die Zelle aktiv die Progression durch den Zellzyklus anhält, bis sie sicherstellen kann, dass vorangegangene Prozesse, wie DNA-Replikation oder Mitose vollständig abgelaufen sind“ (Hartwell, Weinert 1989; Kastan, Bartek 2004). Bei den Kontrollpunkten handelt es sich nicht um definierte Zeitpunkte innerhalb der einzelnen Phasen, der Zellzyklus unterliegt einer ständigen Kontrolle (Nasmyth 1996).

Durch die Zellzykluskontrollen wird sichergestellt, dass die Integrität des Genoms aufrecht erhalten bleibt, indem DNA-Schäden oder ungleiche Anzahl an Chromosomen nicht auf die Tochterzellen übergehen. Können die Fehler behoben werden, kann der Zellzyklus weiterlaufen und die Zelle teilt sich. Können die Fehler nicht behoben werden, greifen mehrere Mechanismen, die entweder zum

programmierten Zelltod (Apoptose) oder zum permanenten Zellzyklusarrest führen. Fehler in diesen Mechanismen können unkontrolliertes Zellwachstum und damit Krebs zur Folge haben (Malmanche et al. 2006).

Um die weitere Progression des Zellzyklus bei fehlerhaften Prozessen zu verhindern, gibt es Proteine, die die CDKs inhibieren, die sogenannten CDK Inhibitoren (CKIs). Man unterscheidet zwischen zwei CKI-Familien, die INK4 (*engl. Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*)-Familie und die CIP/KIP (*engl. CDK-interacting protein/Kinase inhibitory protein*)-Familie. Binden die CKIs ihre jeweiligen CDKs, führt dies zum Zellzyklusstopp, der so lange anhält, bis die Fehler, die zum Zellzyklusstopp geführt haben, behoben sind.

Zu der INK4-Familie gehören die Proteine p15^{INK4b}, p16^{INK4a}, p18^{INK4c} und p19^{INK4d}. Sie assoziieren und inhibieren CDK4 und CDK6 Kinasen, was dazu führt, dass Rb unphosphoryliert und damit an E2F gebunden bleibt. Dadurch wird die Transkription von Cyclin E - das essentielle Cyclin für den Eintritt in die S-Phase – verhindert, und die Zelle verbleibt in der G1-Phase (Bringold, Serrano 2000; Sherr, Roberts 1999).

In einigen Zellen ist die Expression von p16 aufgrund wiederholter Zellteilungen permanent erhöht (Campisi 2005; Itahana et al. 2003; Bringold, Serrano 2000; Alcorta et al. 1996; Hara et al. 1996). Der dazugehörige Mechanismus ist unbekannt. Aber er führt dazu, dass Zellen irreversibel aufhören, sich zu teilen (Lanigan et al. 2011). Dieses Phänomen wird zelluläre Seneszenz genannt. In Abbildung 1.2. ist der p16^{INK4a}-pRb-Signalweg dargestellt, der zum Zellzyklusarrest führt.

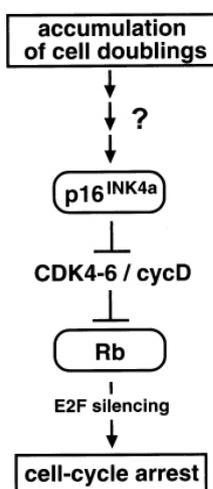


Abbildung 1.2 p16^{INK4a}-pRb-Signalweg (modifiziert aus Bringold, Serrano 2000) Wiederholte Zellteilungen (accumulation of cell doublings) führen zu einer erhöhten Expression von p16^{INK4a}, dem CDK Inhibitor, der den CDK4-6/CyclinD-Komplex inhibiert. Das Retinoblastom Protein (Rb) bleibt unphosphoryliert, was zu einer Stilllegung (silencing) E2F-responsiver Gene führt, die für einen weiteren Verlauf des Zellzyklus notwendig sind. Es kommt zum Zellzyklusarrest (cell-cycle arrest).

1.2.2 DNA-Schäden, DNA-Schadensantwort und DNA-Reparatur

Werden während der G1-Phase DNA-Schäden von der Zelle erkannt, kommt es zur Expression von Proteinen der CIP/KIP-Familie, die für die Inhibition von CDK1 und CDK2 verantwortlich sind. Proteine, die zu dieser Familie gehören, sind p21^{Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}.

DNA-Schäden lösen zunächst eine DNA-Schadensantwort (*engl. DNA damage response, DDR*) in der Zelle aus. Die DDR ist ein komplexer Signalweg, der die Fähigkeit hat, DNA-Schäden zu erkennen und so weiterzuleiten, dass die Zelle darauf antworten kann (Ciccia, Elledge 2010). Die Kernkomponenten der DDR sind das initiale Signal (DNA-Schaden), die Sensoren, die das Signal erkennen und Transduktoren, die das Signal an die Effektoren weiterleiten. Des Weiteren können Mediatoren oder Adaptoren zur Erleichterung des Signalweges beitragen, indem sie die physikalische Interaktion zwischen Proteinen erleichtern; sie haben jedoch keine katalytische Aktivität (Su 2006). In Abbildung 1.3. ist die Kaskade der DNA-Schadensantwort schematisch dargestellt (aus Khanna, Jackson 2001).

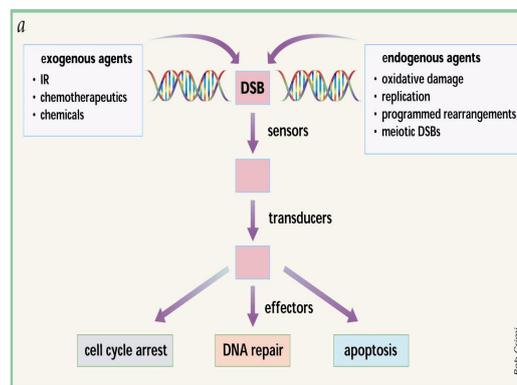


Abbildung 1.3 Kaskade der DNA-Schadensantwort (Khanna, Jackson 2001) Sowohl exogene als auch endogene Faktoren können zu Doppelstrangbrüchen (DSB) in der DNA führen. Diese werden von Sensoren (sensors) erkannt und über Transduktoren (transducers) an Effektoren (effectors) weitergeleitet. Diese sorgen dafür, dass die DNA entweder repariert wird (DNA repair), die Zellen in ihrem Wachstum gestoppt werden (cell cycle arrest) oder den programmierten Zelltot (Apoptose) eingehen, wenn die DNA-Schäden irreparabel sind.

Es können zwei Arten von DNA-Schäden in der Zelle auftreten, zum einen Einzelstrangbrüche (*engl. single-strand breaks, SSBs*) und zum anderen Doppelstrangbrüche (*engl. double-strand breaks, DSBs*). Aus SSBs können jedoch auch DSBs werden (Desai et al. 2003). Die Entstehung von SSBs oder DSBs können intrinsische oder extrinsische Ursachen haben. Intrinsische Faktoren können

beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies oder auch die DNA-Replikation sein. Extrinsische Faktoren können unter anderem ionisierende Strahlung, UV-Strahlung oder Chemikalien sein (Katyal, McKinnon 2008). SSBs und DSBs werden durch unterschiedliche Reparaturmechanismen repariert. SSBs können in der Regel leichter repariert werden, da der intakte Komplementärstrang als Matrize dient. DSBs sind toxischer für die Zelle, sie können zu einem Verlust der Genomintegrität führen. Dadurch, dass kein Komplementärstrang als Matrize genutzt werden kann, sind die Reparaturmechanismen sehr viel komplexer als bei SSBs. Die Reparatur von DSBs kann auch die Ursache für die Entstehung von Deletionen sein, da zum Teil ganze DNA-Abschnitte entfernt werden müssen (Kjølhede Jeppesen 2011; Katyal, McKinnon 2008; Wood et al. 2005).

1.2.3 p53-p21-abhängiger Zellzyklusarrest

Im Folgenden soll die DDR, die durch DSBs induziert wird und über die Expression von p21 zu einem permanenten Zellzyklusarrest führen kann, genauer beschrieben werden.

Nach der Entstehung von DSBs wird zunächst der sogenannte MRN-Komplex zum DNA-Schaden rekrutiert. Der MRN-Komplex besteht aus den Proteinen MRE11 (*engl. meiotic recombination 11*), RAD50 und NBS (*engl. Nijmegen-breakage syndrome*). Der MRN-Komplex bindet über MRE11 an die Enden der DNA, die über RAD50 miteinander verbunden werden. NBS sorgt für die Rekrutierung der Proteinkinase ATM (*engl. ataxia telangiectasia mutated*), die normalerweise als Dimer vorliegt und inaktiv ist. ATM gehört zur Familie der Phosphatidylinositol-3 Kinase-ähnlichen Kinasen und gilt als die zentrale Kinase der DNA-Schadensantwort (Shiloh 2003). Durch die Bindung an NBS autophosphoryliert, monomerisiert und aktiviert ATM sich selbst (Kjølhede Jeppesen 2011; d'Adda Di Fagagna et al. 2004). Zusammen mit anderen Kinasen phosphoryliert ATM das Histon H2A an Serin 139 (γ H2AX) (Burma 2001), welches die Chromatinregion als DNA-Schadensort markiert und für eine aufgelockerte Chromatinstruktur sorgt (Bassing, Alt 2004). Durch die aufgelockerte Chromatinstruktur gelangen Faktoren der DDR leichter an den DNA-Schadensort, wo sie von γ H2AX stabilisiert werden (Haince et al. 2007). Als Transduktoren werden die Kontrollpunktkinasen CHK1 und CHK2 (*engl. checkpoint kinase*) an den DNA-Schaden rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert (d'Adda Di Fagagna et al. 2004).

Die Aktivierung der CHK1 und CHK2 wiederum führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors p53 (Effektor) an Serin 15 und von MDM2 (*engl. murine double minute-2*) an Serin 395. MDM2 ist eine E3-Ubiquitin Ligase, die p53 ubiquitinyliert und so für dessen Abbau durch das Proteasom sorgt. Sind p53 und MDM2 phosphoryliert, können sie nicht mehr miteinander interagieren, und p53 wird nicht ubiquitinyliert und abgebaut, sondern stabilisiert (Maya et al. 2001). MDM2 ubiquitinyliert sich daraufhin selbst und sorgt für seine eigene Degradation durch das Proteasom (Meek, Hupp 2010).

Zusätzlich kommt es aufgrund wiederholter Zellteilungen durch einen bislang ungeklärten Mechanismus zu der Transkription des Gens *ARF* (*engl. alternate open reading frame*), das für das Protein p19^{ARF} (human: p14^{ARF}) kodiert (Lanigan et al. 2011). Das Gen *ARF* überlappt mit dem Locus des Gens, das für p16^{INK4a} kodiert, sie haben jedoch separate Promotoren und weisen keinerlei Sequenzhomologien auf. p19^{ARF} sorgt zusätzlich für die Stabilisierung von p53, indem es MDM2 bindet und inaktiviert. p53 leitet nun entweder den programmierten Zelltod ein oder initiiert die Transkription des Gens, das für die CKI p21 kodiert. p21 sorgt, durch Inhibition des CyclinE-CDK2-Komplexes für den Zellzyklusarrest (Bringold, Serrano 2000).

In Abbildung 1.4. ist der p53/p21-Signalweg dargestellt.

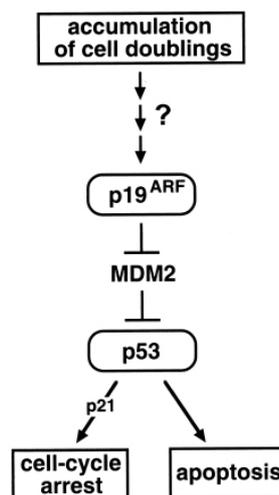


Abbildung 1.4 p53/p21-Signalweg (aus Bringold, Serrano 2000)

Als Folge wiederholter Zellteilungen (accumulation of cell doublings) kommt es zur Expression von p19^{ARF}, das MDM2 bindet und inaktiviert. Dadurch wird p53 stabilisiert, wodurch es entweder über die Expression von p21 zum Zellzyklusarrest (cell-cycle arrest) oder zum programmierten Zelltod (apoptosis) kommt.

Sowohl der p16^{INK4a}-pRb-Signalweg, als auch der p53-p21-Signalweg spielen eine wichtige Rolle für die zelluläre Seneszenz, Apoptose, terminale Differenzierung und DNA-Reparatur. Da durch diese Mechanismen die Entstehung von Tumoren verhindert werden kann, werden sie Tumorsuppressor-Signalwege genannt.

1.3 Zelluläre Seneszenz

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei der zellulären Seneszenz um den irreversiblen Zellzyklusarrest von Zellen. Dieser lässt sich auch durch mitogene Stimuli von außen nicht rückgängig machen (Hayflick, Moorhead 1961). Es wird zwischen der Stress induzierten Seneszenz und der replikativen Seneszenz unterschieden.

Die Stress induzierte Seneszenz ist Telomer-unabhängig und kann in jungen Zellen vorzeitig (prä-mature Seneszenz) durch Onkogene, chemotherapeutische Medikamente und oxidativen Stress ausgelöst werden (Campisi 2005; Drayton, Peters 2002).

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass sich auch mit Silica-Nanopartikeln, die in die Zellkerne humaner Krebszellen (HEp-2) gelangten, zelluläre Seneszenz in diesen induzieren lässt. So zeigten die behandelten HEp-2-Zellen Eigenschaften zellulärer Seneszenz, wie die Abnahme der Zellproliferation, DNA-Replikation und Transkription bei gleichbleibender Viabilität (Chen et al. 2008; Chen, von Mikecz 2005).

Replikative Seneszenz tritt als Folge wiederholter Zellteilungen ein. Da dieses Phänomen zum ersten Mal von Hayflick beobachtet wurde, spricht man vom sogenannten Hayflick Limit. Als Grund für die replikative Seneszenz werden die Telomere an den Enden linearer Chromosomen angesehen. Sie bestehen aus repetitiver, nicht kodierender, einzelsträngiger DNA am 3'-Ende (Sequenz bei Vertebraten: TTAGG) und schützen die Chromosomen vor Angriffen durch Nucleasen. Bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Telomere, da die DNA-Polymerase das 3'-Ende linearer DNA nicht komplett synthetisieren kann (Olovnikov 1973). Durch dieses Problem, das End-Replikationsproblem genannt wird, kommt es bei jeder Zellteilung zu einem Verlust von etwa 50 Basenpaaren (Huffman et al. 2000). Da die meisten somatischen Zellen das Enzym Telomerase, das die Telomerenden erneuern kann, nicht exprimieren, kommt es nach mehreren Zellteilungen zu einer kritischen Länge der Telomere, die die Teilungsfähigkeit der

Zelle begrenzt (Campisi 1997; Harley et al. 1990). Die genaue Struktur dysfunktionaler Telomere ist nicht bekannt (Francia et al. 2007). Man weiß jedoch, dass von den dysfunktionalen Telomeren und anderen DNA-Schadensarten ein persistentes DSB-Schadenssignal ausgeht, dass zu der unter 1.2.2. beschriebenen Antwort auf DNA-Schäden und zum irreversiblen Zellzyklusarrest (Abschnitt 1.2.3) führt (Campisi, d'Adda Di Fagagna 2007; Rodier et al. 2005; Herbig et al. 2004; d'Adda Di Fagagna 2003; Takai et al. 2003).

In vielen Spezies konnte ein Zusammenhang zwischen verkürzten Telomeren und replikativer Seneszenz hergestellt werden (Lanza et al. 2000; Shiels et al. 1999; Chiu 1997).

Bereits 1985 stellte Hayflick die Hypothese auf, dass zelluläre Seneszenz Aspekte des organismischen Alterns *in vivo* widerspiegelt (Hayflick 1985).

Dass die Anzahl der Zellteilungen, die eine Zelle in Kultur durchlaufen kann, umgekehrt proportional zum Alter des Donors ist, konnte jedoch nicht bestätigt werden (Cristofalo et al. 1998).

1.3.1 Theorien über das organismische Altern

Aus Sicht der Evolution wird Altern als fortschreitender Verlust der Fitness definiert. Das heißt, die Fähigkeit zu Überleben und sich zu Reproduzieren nimmt mit zunehmendem Alter ab (Partridge 2001). Warum Organismen altern ist bis heute nicht verstanden. Eine Schwierigkeit ist es zu unterscheiden, was Ursachen und was Folgen des Alterns sind.

Es gibt über 300 Theorien über das Altern (Medvedev 1981), die grundsätzlich in zwei Kategorien eingeteilt werden können. Zum einen die Schadenstheorien, die klären wollen, wie ein Organismus altert, und zum anderen die Evolutionstheorien, die nach dem Warum fragen.

Die Schadenstheorie nach Alexander (1967) geht davon aus, dass es zu einer Akkumulation von DNA-Schadensarten im Alter bei gleichzeitiger Abnahme der Effizienz der DNA-Reparaturmechanismen kommt. Als Folge persistenter DNA-Schadenssignale kommt es zur zellulären Seneszenz. Das Modell der replikativen Seneszenz untermauert diese Theorie.

Weitere Theorien besagen, dass es auch auf Proteinebene zu Veränderungen kommt. So wurde beobachtet, dass Proteine durch Alterungsprozesse ihre Konformation und dadurch ihre Enzymaktivität ändern. Auch posttranslationale

Modifikationen können den biologischen Alterungsprozess begleiten (Schoneich 2006).

Faktoren, die diese Veränderungen bewirken, können entweder intrinsischer oder extrinsischer Natur sein.

Eine der bekanntesten Evolutionstheorien ist die Disposable-Soma-Theorie von Kirkwood (1977). Diese besagt, dass jeder Organismus nur begrenzte Energieressourcen hat, die er für den Stoffwechsel, die Reproduktion und die Instandhaltung des Körpers (Soma) verwenden kann. Investiert der Organismus in eine hohe Reproduktionsrate, steht weniger Energie für die Instandhaltung des Körpers zur Verfügung und umgekehrt. Deshalb investiert ein Organismus nur so lange in die Aufrechterhaltung des Somas, bis Überleben und Fortpflanzung gesichert sind (Kirkwood, Austad 2000).

Eine andere evolutionsbiologische Theorie ist die der antagonistischen Pleiotropie. Diese besagt, dass Mechanismen, die in der reproduktiven Phase eines Organismus von Vorteil sein können, im Alter von Nachteil sein und sogar den Alterungsprozess beschleunigen können. Grund dafür ist, dass die meisten Organismen in einer Umgebung aufwachsen, in der sie aufgrund äußerer Umstände wie Infektionen oder Mangel an Nährstoffen kein hohes Alter erreichen. Das heißt, dass der Selektionsdruck auf Alterungsprozesse gering ist. So sind biologische Prozesse darauf ausgerichtet, in jungen Organismen die Fitness zu fördern und aufrecht zu erhalten. In gealterten Organismen können diese dann schädigende Auswirkungen haben (Rauser et al. 2006; Williams 1957).

Allein die Anzahl der verschiedenen Theorien spiegelt wider, wie facettenreich der Alterungsprozess ist und lässt erkennen, warum trotz intensiver Forschung noch kein „Jungbrunnen“ gefunden wurde.

1.3.2 Marker für replikative Seneszenz

Es gibt sehr viele unterschiedliche Marker für replikative Seneszenz, die Biomarker genannt werden. Bis jetzt gibt es keinen Marker oder kein charakteristisches Merkmal, das ein Alleinstellungsmerkmal für seneszente Zellen darstellt.

Und nicht alle seneszente Zellen exprimieren alle Seneszenzmarker (Campisi 2011).

Der wichtigste Marker ist, dass seneszente Zellen aufhören sich zu teilen, sie sind in der G1-Phase arretiert (Pignolo et al. 1998). Dieser Arrest ist irreversibel und unterscheidet seneszente Zellen von quieszenten und differenzierten Zellen.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal ist die Morphologie seneszenter Zellen. Wie in Abbildung 1.5 dargestellt (Bayreuther et al. 1988), werden die Zellen größer und amorph in ihrer Form. Allein die Fläche des Zellkerns nimmt im Durchschnitt von $255 \mu\text{m}^2$ in jungen Zellen auf $293 \mu\text{m}^2$ in seneszenten Zellen zu (Mitsui, Schneider 1976).

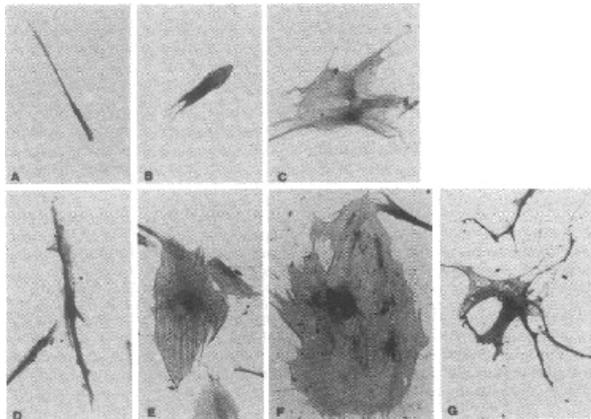


Abbildung 1.5 Fibroblasten auf dem Weg zur Seneszenz: (A-C) junge bis präseneszente Fibroblasten; (D-F) postmitotische Fibroblasten und (G) postmitotischer, degenerierter Fibroblast (Bayreuther et al. 1988).

1995 wurde entdeckt, dass β -Galaktosidase in jungen Zellen ein anderes Verhalten aufweist als in seneszenten Zellen. β -Galaktosidase ist ein lysosomales Enzym, das den Zucker β -Galaktose spaltet. Normalerweise ist es bei einem pH-Wert von 4, in seneszenten Zellen jedoch zusätzlich bei einem pH-Wert von 6, aktiv. Insgesamt steigt die zelluläre β -Galaktosidaseaktivität in seneszenten Zellen an. Dieser Marker wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gefunden. (Lee et al. 2006; Dimri et al. 1995).

Ein weiteres Merkmal ist die Expression der CKIs p21 und p16. Wie unter 1.2. beschrieben, inhibieren diese die Cyclin-CDK-Komplexe, die für den Eintritt in die S-Phase nötig sind und tragen somit zum permanenten Zellzyklusarrest bei (Pajalunga et al. 2007; Sherr, Roberts 1999). p16 wird nicht von allen seneszenten Fibroblasten exprimiert (Beauséjour et al. 2003). In anderen Zellen wiederum wird im Verlauf der Seneszenz sowohl p21 als auch p16 hochreguliert (Herbig et al. 2004). In diesem Fall ist die Expression von p21 unabhängig und liegt zeitlich vor der Expression von

p16 (Stein et al. 1999; Alcorta et al. 1996). Werden sowohl p21 als auch p16 exprimiert, trägt dies zur Manifestation der Seneszenz bei (Guarente et al. 2008; Ben-Porath, Weinberg 2004).

Die Induktion des p53-p21-Signalwegs als Antwort auf dysfunktionale Telomere ist bereits etabliert. Was zur Expression von p16 führt, ist noch nicht genau geklärt. Es sind Telomer-abhängige (Le et al. 2010; Jacobs, de Lange 2004; te Poele et al. 2002; Brenner et al. 1998) und Telomer-unabhängige (Herbig et al. 2004; d'Adda Di Fagagna 2003; Itahana et al. 2003) Mechanismen beschrieben worden.

In einigen seneszenten Fibroblasten können Seneszenz assoziierte Heterochromatin Foci (*engl. senescence associated heterochromatin foci*), kurz SAHFs, beobachtet werden. Es wird vermutet, dass die Expression von p16 zu der Ausbildung der SAHFs führt und dort Gene stillgelegt werden, die Proteine für den Zellzyklus kodieren, zum Beispiel E2F-responsive Gene (Di Micco et al. 2011; Narita et al. 2003).

Proteine, die in SAHFs lokalisieren, sind unter anderem das Heterochromatin Protein 1 gamma (HP1 γ), Histon H3, das an Lysin (K) 9 dreifach methyliert ist (H3K9m3) (Narita et al. 2003) und DNA-Topoisomerasel (TopoI, Humbert et al. 2009). Die Rekrutierung des Proteins HP1 γ hängt von der Modifikation des Histons H3 ab (H3K9m3), ohne die es nicht an SAHFs binden kann (Zhang et al. 2007).

Ein weiteres, bereits erwähntes Merkmal der replikativen Seneszenz sind verkürzte, dysfunktionale Telomere. Färbt man diese in der Immunfluoreszenz an, erscheinen sie als Foci im Nucleoplasma, weswegen sie Telomerdysfunktions-induzierte Foci (*engl. telomere dysfunction-induced foci*), kurz TIFs genannt werden. Proteine, die unter anderem an dysfunktionalen Telomeren lokalisieren, sind ATM, die Proteine des MRN-Komplexes, γ H2AX als Marker für DSBs (Rodier et al. 2010; Herbig et al. 2004; Takai et al. 2003; d'Adda Di Fagagna 2003) und PML-Kernkörperchen (Nabetani 2004).

γ H2AX-Foci gelten unabhängig von TIFs auch als Marker, weil sie allgemein an Orten von DNA-Schäden auftreten, die in seneszenten Zellen vermehrt vorkommen (Passos et al. 2010; Wang et al. 2009; Nakamura et al. 2008).

In seneszenten Zellen aus Hautbiopsien von Pavianen konnten dysfunktionale Telomere, die Bildung von Heterochromatin Foci und eine Aufregulierung von p16

beobachtet werden, weswegen man davon ausgeht, dass es sich bei diesen Biomarkern auch um Marker für organismisches Altern handelt (Herbig, Sedivy 2006).

Des Weiteren zeigen seneszente Zellen einen Seneszenz assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP). Seneszente Zellen können Matrix-Metalloproteinasen, Epidermale Wachstumsfaktoren, Interferon gamma ($INF\gamma$) und inflammatorische Cytokine ausschütten, die das umgebende Gewebe verändern und lokale Entzündungen hervorrufen können (Campisi 2011; Crescenzi et al. 2011; Campisi 2005; Krtolica 2002).

1.4 Seneszenz, Tumorsuppression und Tumorprogression

1991 stellte Sager die Hypothese auf, dass Seneszenz einen Mechanismus der Tumorsuppression darstellt (Sager 1991). Mittlerweile konnte diese Hypothese durch mehrere Untersuchungen bestätigt werden.

Zunächst sind die $p16^{INK4a}$ -pRB- und p53-p21-Signalwege, von denen die Induktion zellulärer Seneszenz abhängt, Tumorsuppressor-Signalwege (Campisi, d'Adda Di Fagagna 2007; Herbig et al. 2004; Beauséjour et al. 2003; Bond et al. 1994; Hara et al. 1991). Die meisten, wenn nicht sogar alle Krebsarten, die beim Menschen und auch in Mäusen auftreten können, weisen Mutationen in einem oder in beiden dieser Signalwege auf. Defekte in den Signalwegen führen dazu, dass Zellen ihre Fähigkeit zur Seneszenz verlieren und die Anfälligkeit der Organismen für Krebs steigt.

Seneszente Zellen werden häufig in prämaligen (maligne= bösartig) oder frühen Krebsstadien gefunden, die Seneszenzmarker wie Seneszenz assoziierte β -Galaktosidase und DDR Signalwege exprimieren. In malignen, aggressiven Tumoren findet man dagegen merklich weniger seneszente Zellen (Bartkova et al. 2005; Collado et al. 2005; Michaloglou et al. 2005). Das heißt, dass seneszente Zellen dazu beitragen können, das Wachstum von Tumoren aufzuhalten. Dafür spricht auch, dass durch genotoxische Chemotherapie eine Seneszenzantwort ausgelöst werden kann, die zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums oder sogar zur Regression des Tumors führt (Coppé et al. 2010; Schmitt 2007; Shay, Roninson 2004).

Der irreversible Zellzyklusarrest ist der Hauptgrund für die Suppression malignen Tumorwachstums (Campisi, d'Adda Di Fagagna 2007; Rodier et al. 2007; Ohtani et

al. 2004). Ein anderer Grund scheint der unter 1.3.2. beschriebene SASP zu sein. Die Faktoren, die seneszente Zellen sezernieren, und die zu einer Repression des Tumorwachstums führen können, sind unter anderem die pro-inflammatorischen Cytokine IL (Interleukin)-6 und IL-8 und das pro-apoptotische Protein IGFBP (*engl. insulinlike growth factor binding protein-7*) (Acosta et al. 2008; Kuilman et al. 2008; Wajapeyee et al. 2008). Die Sekretion von IGFBP kann beispielsweise bei benachbarten Zellen Seneszenz oder Apoptose induzieren (Wajapeyee et al. 2008). Seneszente Zellen sind demnach in der Lage, mit ihrer Umgebung zu kommunizieren und eine Reparatur des umgebenden Gewebes zu initiieren.

Diese Fähigkeit seneszenten Zellen kann vermutlich jedoch auch das genaue Gegenteil bewirken, nämlich Tumorprogression (Campisi 2011).

Pro-inflammatorische Cytokine können Entzündungsreaktionen hervorrufen, die die Ursache für altersassoziierte Erkrankungen sein können, darunter sowohl degenerative Erkrankungen als auch Krebs (Grivennikov et al. 2010; Chung et al. 2009; Franceschi et al. 2007). Es ist noch nicht bekannt, ob seneszente Zellen die Tumorprogression auch *in vivo* beschleunigen (Campisi 2011). Aber es konnte gezeigt werden, dass nach Koinjektion seneszenten und nicht-seneszenten Fibroblasten in Mäuse nur die seneszenten Zellen prä-maligne Epithelialzellen stimulierten, maligne Tumore zu bilden (Krtolica et al. 2001). Auch die Koinjektion von seneszenten Zellen mit Krebszellen beschleunigte die Bildung von Tumoren in Mäusen (Coppé et al. 2010; Liu, Hornsby 2007; Krtolica et al. 2001).

Beim Menschen steigt das Risiko an Krebs zu erkranken nach dem 50. Lebensjahr exponentiell an. Ein Grund dafür könnte sein, dass der Anteil seneszenten Zellen in mitotisch kompetenten, und daher krebsanfälligen Geweben mit dem Alter ansteigt (Jeyapalan et al. 2007; Dimri et al. 1995).

Dieses Paradoxon, dass seneszente Zellen zum einen das Tumorwachstum hemmen und zum anderen fördern können, kann mit der unter 1.3.1. beschriebenen antagonistischen Pleiotropie erklärt werden. In jungen Jahren tragen seneszente Zellen durch Tumorsuppression zur Erhaltung der Fitness bei. In alternden Organismen steigt die Anzahl seneszenten Zellen so stark an, dass sie zur Entstehung altersassoziiierter Krankheiten, darunter Krebs, beitragen (Campisi 2011; Rodier, Campisi 2011).

Ein Verständnis der Zusammenhänge und Mechanismen zellulärer Seneszenz könnte die Basis für neue präventive und medizinische Strategien bilden, die die Entstehung von Krebs beeinflussen könnten.

1.5 Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind Krankheiten, bei denen es zu einem fortschreitenden Verlust der Struktur und der Funktion von Neuronen kommt. Der größte Risikofaktor, an neurodegenerativen Erkrankungen zu erkranken, ist, genau wie bei Krebs, das Alter.

Beispiele für neurodegenerative Erkrankungen sind Parkinson, Alzheimer und Chorea Huntington (*engl. Huntington's disease, HD*). Das Kennzeichen dieser Erkrankungen ist die Akkumulation missgefalteter Proteine.

HD gehört zu den sogenannten polyQ-Aggregaterkrankungen, bei denen es durch CAG-Wiederholungen (CAG kodiert für die Aminosäure Glutamin, Q) in der DNA-Sequenz zu mutierten Proteinen kommt, die expandierte polyQ-Schwänze aufweisen (Katsuno et al. 2008). Für HD konnte eine Verbindung zwischen fehlerhaften DNA-Reparaturmechanismen und CAG-Wiederholungen hergestellt werden. So werden Fehler in der Basenexzisionsreparatur (*engl. base excision repair, BER*) von SSBs, die durch oxidative Sauerstoffspezies entstanden sind, für die Entstehung expandierter CAG-DNA-Sequenzen verantwortlich gemacht (Kjølhede Jeppesen 2011; Kovtun et al. 2007). Fehlerhafte Basen können normalerweise durch BER erkannt und herausgeschnitten werden. Die Effektivität des BER nimmt jedoch altersbedingt ab (Akbari, Krokan 2008).

Eine Länge von bis zu 35 CAG-Wiederholungen ist normal, ab 36 CAG-Wiederholungen erreichen die polyQ-Sequenzen jedoch eine kritische Länge, die zur Aggregation des Proteins führt (Walker 2007).

In HD kommt es zu polyQ-Expansionen im Protein Huntingtin. Die Funktion von Huntingtin ist noch nicht vollständig geklärt, aber es scheint eine Rolle bei der Transkription und dem axonalen Transport zu spielen, indem es den Mikrotubuli-abhängigen Transport von Organellen zu den Neuronen reguliert (Caviston 2007; Borrell-Pagès et al. 2006; Gauthier et al. 2004).

Huntingtin wird nicht nur in postmitotischen Neuronen exprimiert, sondern auch in Mitose-kompetenten Zellen, wo es mit Centrosomen und Mikrotubuli assoziiert ist (Gauthier et al. 2004). Neuere Studien zeigen, dass Huntingtin eine Rolle in der

Mitose spielt, indem es bei der richtigen Orientierung der Mitosespindel hilft. Dazu interagiert es mit bekannten mitoseassoziierten Proteinen wie NuMA (*engl. nuclear mitotic apparatus protein*) (Godin 2011, Godin 2010). NuMA fokussiert die Mikrotubuli in den Spindelpolen und kontrolliert die Größe der Spindel (Merdes et al. 2000).

Während der Pathogenese bilden die expandierten polyQ-Proteine Aggregate, die sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleus vorkommen (Rubinsztein, Carmichael 2003). Die nucleären Aggregate werden auch nucleäre Einschlüsse (*engl. nuclear inclusions, NIs*) genannt und enthalten zusätzlich zu den polyQ-Proteinen andere Proteine wie Transkriptionsfaktoren, Chaperone, proteasomale Untereinheiten, MDM2 und das PML Protein. Proteine, die andere Proteine posttranslational modifizieren können, wie beispielsweise Ubiquitin oder SUMO, können ebenfalls in NIs detektiert werden (Janer et al. 2010; Chen et al. 2008; Ross 2002).

Die expandierten polyQ-Schwänze können sich zu langen, unverzweigten β -Faltblattstrukturen falten, die Fibrillen genannt werden. Monomere, die fibrilliertes polyQ aufweisen, können lösliche polyQ-Proteine rekrutieren und sie zu unlöslichen, oligomeren Aggregaten konvertieren. Da diese unlöslichen Aggregate auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen und nicht nur im Nucleoplasma vorkommen, werden sie unter dem Begriff Amyloid zusammengefasst. Amyloide sind sehr resistent gegen Proteolyse und können deshalb nicht abgebaut werden. Sie sind selbst in starken Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (*Sodiumdodecylsulfat, SDS*) nicht löslich (von Mikecz 2009; Novoselova 2005; Wanker et al. 1999).

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass sich durch Silica-Nanopartikel, die in den Zellkern von HEp-2 Zellen gelangten, nucleäre Proteinaggregate induzieren lassen, die in Komposition exakt pathogenen polyQ-induzierten NIs gleichen. Diese Silica-Nanopartikel induzierten, nucleären Aggregate waren auch, genau wie krankheitsbedingte polyQ NIs, SDS-unlöslich (Chen et al. 2008; Chen, von Mikecz 2005).

Es ist bis jetzt nicht bekannt, ob Amyloide die Ursache oder die Folge neurodegenerativer Erkrankungen sind. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass amyloid-ähnliche Proteinaggregate auch eine Schutzfunktion haben können (Douglas, Dillin 2010). In der Studie von Janer und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Proteinaggregate über die Toxizität entscheiden kann. Aggregate, die SUMO enthielten, waren weniger toxisch als Aggregate, in denen SUMO nicht lokalisiert war (Janer et al. 2010).

Proteinaggregate, wie sie in neurodegenerativen Erkrankungen vorkommen, greifen extrem in den Proteinhaushalt (Proteinhomeostase) der Zellen ein. Normalerweise werden fehlgefaltete Proteine erkannt und abgebaut, damit sie der Zelle nicht schaden können. Für die Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase sind Proteasen verantwortlich. Etwa 80-90% aller endogenen Proteine werden über das sogenannte Ubiquitin-Proteasomen-System (UPS) abgebaut (Lee, Goldberg 1998).

Die Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wird mit einer altersassoziierten Dysfunktion des UPS in Zusammenhang gebracht (Löw 2011).

1.6 Das Ubiquitin-Proteasomen-System

Das UPS ist ein komplexes System, das für die Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase sorgt und an vielen regulatorischen Prozessen, wie der Genexpression, der DNA-Schadensantwort, der Antigenpräsentation, Apoptose und auch der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Substratproteine sind zum Beispiel Cycline, CKIs und das Tumorsuppressorprotein p53 (Pagano et al. 1995; Glotzer et al. 1991; Scheffner et al. 1990).

Proteasomen sind komplexe ATP-abhängige Proteasen, die im Cytoplasma und im Nucleoplasma lokalisiert sind (von Mikecz 2006; Rockel et al. 2005; Reits et al. 1997).

Bei Eukaryonten kommt am häufigsten das 26S Proteasom in der Zelle vor. Es besteht aus dem 20S Proteasom, das wie ein Zylinder aufgebaut ist und aus vier Ringen besteht, die aus je sieben α - und je sieben β -Untereinheiten (UE) bestehen. Die α -UE bilden die beiden äußeren Ringe, während die beiden inneren Ringe aus β -UE aufgebaut sind (Groll et al. 1997). Die Ringe bilden zusammen die proteolytische Kammer, in der die Proteine degradiert werden. Drei der sieben β -UE besitzen proteolytische Aktivität. β 1 besitzt Caspase-ähnliche Aktivität, β 2 Trypsin-ähnliche und β 5 Chymotrypsin-ähnliche Aktivität. In Säugetierzellen wird das 20S Proteasom an beiden Seiten von den 19S regulatorischen Einheiten flankiert (siehe Abbildung 1.6.). 19S besteht aus mehreren UE, von denen sechs ATPase-Aktivität besitzen (Löw 2011; von Mikecz 2006). Substrate werden von der ATPase-UE S6 (Rpt5) erkannt (Lam et al. 2002), entfaltet und in die proteolytische Kammer transloziert, in der sie zu Peptiden degradiert werden. Vermutlich verlassen die Peptide das 26S

Proteasom durch die gleiche 19S regulatorische Einheit, durch die sie in das Proteasom gelangen (von Mikecz 2006; Hutschenreiter et al. 2004).

Neben dem 26S Proteasom gibt es auch das sogenannte Immunoproteasom, das aus dem 20S Proteasom und 11S regulatorischen Einheiten besteht. Dessen Bildung kann unter anderem durch eine Infektion induziert werden. Das Immunoproteasom enthält drei induzierbare (z.B. durch $\text{INF}\gamma$), katalytische β -UE, die $\beta 1i$, $\beta 2i$ und $\beta 5i$ genannt werden (Löw 2011).

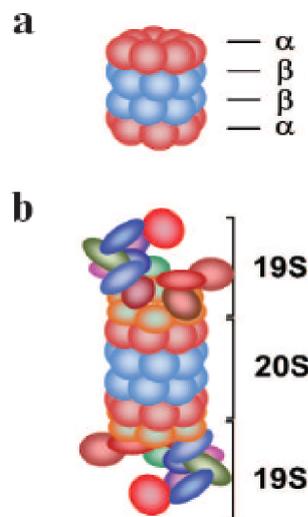


Abbildung 1.6 Das 26S Proteasom (aus Sorokin et al. 2009)

a: Das 20S Proteasom, das aus den beiden äußeren Ringen aus α -Untereinheiten und den beiden inneren Ringen aus β -Untereinheiten besteht.

b: Das 26S Proteasom, das aus dem 20S Proteasom und den flankierenden 19S regulatorischen Einheiten besteht.

Damit Proteine von der 19S regulatorischen Einheit als Substrate erkannt werden können, müssen diese ubiquitinyliert werden. Ubiquitin ist ein niedermolekulares Protein von 8 kD, das in allen Eukaryontenzellen (ubiquitär) vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass Proteasomsubstrate mit mindestens vier Ubiquitinmolekülen konjugiert sein müssen, damit das Proteasom sie als Target erkennt (Thrower et al. 2000).

Die Ubiquitinylierung erfolgt in drei Schritten und wird von drei Enzymen katalysiert. Zuerst wird ein Ubiquitinprotein am C-Terminus mit dem ATP-abhängigen Ubiquitinaktivierenden Enzym, E1, über eine Thioesterbindung verknüpft. Das aktivierte

Ubiquitin wird im zweiten Schritt auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym, E2, übertragen und von der E3-Ubiquitin-Ligase über eine Isopeptidbindung mit dem Proteasomensubstrat verknüpft (Löw 2011; von Mikecz 2006; Pickart, Rose 1985; Hershko et al. 1982). Dieser Zyklus wiederholt sich so lange, bis mindestens vier Ubiquitinmoleküle mit dem Substratprotein konjugiert sind (siehe Abbildung 1.7).

Deubiquitinylierende Enzyme (DUBs) entfernen die Ubiquitinmoleküle wieder, nachdem das Protein als Substrat von der 19S regulatorischen Einheit erkannt wurde und recyceln diese. DUBs sind Teil eines Kontrollmechanismus und können Proteine auch vor ihrer Degradation durch das Proteasom bewahren (Wilkinson 2000).

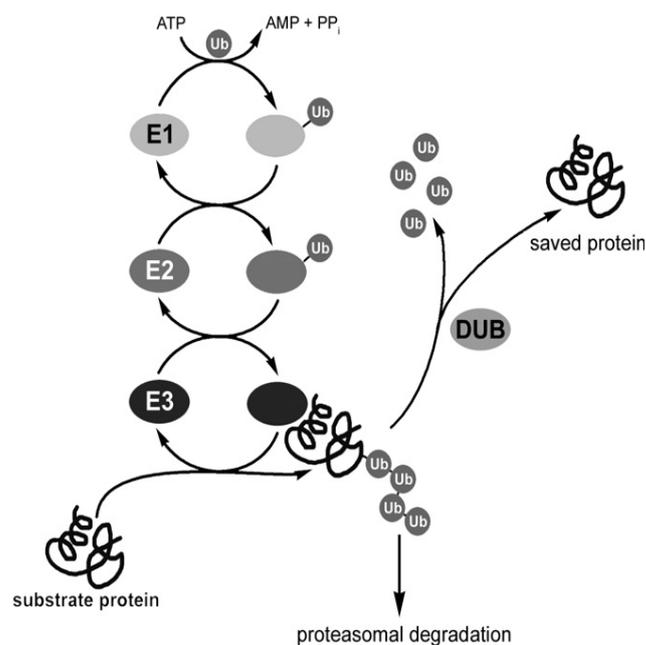


Abbildung 1.7 Die Ubiquitinierung von Proteasomensubstraten (aus Löw 2011)

Ubiquitin (Ub) wird zuerst unter ATP-Verbrauch auf ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym, E1, übertragen. Das aktivierte Ubiquitin wird anschließend auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym, E2, übertragen und von einer E3-Ubiquitin-Ligase kovalent mit dem Substratprotein (substrate protein) verknüpft. Mindestens vier Ubiquitin-Moleküle müssen mit dem Substratprotein verknüpft sein, damit es proteasomal degradiert (proteasomal degradation) werden kann. Deubiquitinylierende Enzyme (DUB) können ubiquitinierte Proteine von Ubiquitin befreien und sie so vor der Degradation durch das Proteasom bewahren (saved protein).

Durch Mikroinjektion von Zellen mit gequenchten Proteasomensubstraten, die erst nach der Degradation durch das Proteasom fluoreszieren, können aktive Proteolyseorte sichtbar gemacht werden (Rockel et al. 2005). So konnte gezeigt werden, dass aktive Proteolyseorte des Zellkerns im Euchromatin lokalisiert sind, wo

sie unter anderem mit PML-Kernkörperchen kolokalisieren (Scharf et al. 2011; Rockel et al. 2005; Chen et al. 2002).

Eine altersabhängige Abnahme der proteasomalen Aktivität und eine erhöhte Konzentration an ubiquitinylierten Proteinen wurde bereits in mehreren Geweben beobachtet (Dahlmann 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der proteasomalen Aktivität mit einer verminderten Proteasomensynthese zusammenhing (Chondrogianni et al. 2003).

Diese Studien lassen darauf schließen, dass auch das UPS Alterungsprozessen unterliegt.

In Vorarbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die durch Silica-Nanopartikel induzierten nucleären Proteinaggregate, die mit zellulärer Seneszenz einhergingen, proteolytisch aktiv waren und zu einer Induktion des UPS führten (Chen et al. 2008; Chen, von Mikecz 2005).

2 Fragestellung

Das Kennzeichen altersbedingter, neurodegenerativer Krankheiten ist das Auftreten von aberranten, unlöslichen cytoplasmatischen und nucleären Proteinaggregaten. Trotz intensiver Forschung ist bis heute wenig darüber bekannt, wie diese Aggregate entstehen und ob sie Folge oder Ursache dieser Erkrankungen sind.

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass Silica-Nanopartikel in den Zellkern von HEp-2 Zellen gelangen und dort Proteinaggregate induzieren, die in ihrer Komposition pathologischen Proteinaggregaten gleichen. 30% der induzierten Proteinaggregate zeigten proteolytische Aktivität und auch die globale proteasomale Aktivität wurde durch Silica-Nanopartikel induziert. Darüber hinaus zeigten mit Silica-Nanopartikeln behandelte Zellen Merkmale zellulärer Seneszenz. Es kam zu einer Abnahme der Zellproliferation, DNA-Replikation und Transkription bei gleichbleibender Zellviabilität (Chen 2008; Chen 2005).

Aufgrund dieser Vorarbeiten sollte in der vorliegenden Arbeit mit dem Modell der replikativen Seneszenz, bei der Fibroblasten *in vitro* aufgrund wiederholter Zellteilungen altern, untersucht werden, ob sich durch Alterungsprozesse endogene Proteinaggregate bilden. Tatsächlich konnten in humanen dermalen Fibroblasten (HDFs) Proteinaggregate beobachtet werden. Diese wurden in dieser Arbeit Seneszenz assoziierte Proteinaggregate (SAPAs) genannt. Ziel dieser Arbeit war es, folgende Fragen zu den SAPAs zu beantworten:

- 1.) Teilen SAPAs Eigenschaften mit krankheitsbedingten, aberranten Proteinaggregaten?
- 2.) Führen SAPAs zum Funktionsverlust von Proteinen?
- 3.) Kommt es durch SAPAs zu einer Veränderung im Ubiquitin-Proteasomen-System?

Die zentrale Frage war, ob in SAPAs essentielle nucleäre Proteine segregieren und dadurch der Zustand der replikativen Seneszenz manifestiert wird.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien und Chemikalien

Aceton (<i>zur Synthese</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid (29% (w/v) Acrylamid, 1% (w/v) Bisacrylamid)	AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
7-Amino-4-Methylcoumarin (AMC)	Boston Biochemical
Aminosäuren, nicht- essentiell MEM	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	ICN Biomedicals (Ohio, USA)
Bleomycin (Bleo)	Selleck Chemicals (Houston, USA)
Brilliant Blue	Roth, (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Cäsiumchlorid (CsCl)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Camptothecin (CPT)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
4'6- Diaminidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dithiotreitol (DTT)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA (Cölbe, Deutschland)
ECL- Reagenz (enhanced chemoluminescence)	VWR International (München, Deutschland)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Essigsäure (<i>100%, Eisessig zur Analyse</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (<i>absolut zur Analyse</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Fötale Kälberserum (FCS)	HyClone (Logan, UT, USA)
Glutamin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

Glycerol	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Glycin (<i>Puffersubstanz für Elektrophorese</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Instant Magermilchpulver	Gesundkostwerk (Lüneburg, Deutschland)
Igepal	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumchlorid (KCl, <i>zur Analyse</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄ , <i>zur Analyse</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Lactacystin	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
β- Mercaptoethanol	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol (<i>reinst</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Nagellack	handelsüblicher Hersteller
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
di- Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, <i>zur Analyse</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl, <i>zur Analyse</i>)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Penicillin	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Poly-L-Lysin	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Ponceau S	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Proteasomen Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Proteinstandard, Precision Plus Protein Kaleidoskop Standards	Bio-Rad (München, Deutschland)
Pyruvat	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe,

	Deutschland)
Rainbow™ coloured protein Molecular weight marker	VWR International (München, Deutschland)
N-Lauroylsarcosine sodium salt solution (Sarkosyl)	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Senescent cells staining kit	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Sodium phosphat monobasic	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Sodium phosphat dibasic	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Suc-LLVY-7- Amino-4-Methyl- coumarin (Suc-LLVY-AMC)	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Sucrose	Sigma- Aldrich (Steinheim, Deutschland)
N,N,N',N'-Tetramethylethylen- diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan (Trisma®Base)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)- Aminomethan- hydrochlorid (Trizma®HCl)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypanblau (0,4 % (w/s) in PBS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin EDTA	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)
Tween20	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Zellkulturmedium RPMI 1640	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe, Deutschland)

3.2 Puffer und Lösungen

APS-Stocklösung, 10% (w/s)

1 g	APS	(438 mM)
10 ml	H ₂ O	

Coomassie-Färbelösung für SDS-Gele

1,25 g Brilliant Blue
225 ml H ₂ O
225 ml Ethanol abs.
50 ml Eisessig

CsCl-Stocklösung 1,86g/ml

120g CsCl in 70ml TE- Puffer,
gefiltriert durch einen 0,45µm Filter

Entfärbelösung für SDS-Gele

225 ml Ethanol abs.
225 ml Eisessig
50 ml H₂O

Komponenten des Senescent cells staining kit:

Fixierungspuffer 10x

20% Formaldehyd
2% Glutaraldehyde
70.4 mM Na₂HPO₄
14.7 mM KH₂PO₄
1.37 M NaCl
26.8 mM KCl

Reagens B

400 mM Potassium Ferricyanide

Reagens C

400 mM Potassium Ferrocyanide

X-gal Lösung

40 mg/ml

Färbelösung 10X

Phosphate Buffered Saline (PBS) 10X

Laufpuffer für SDS-Gelelektrophorese

3,0 g	Trizma- Base	(25 mM)
14.4 g	Glycin	(192 mM)
1,0g	SDS	(3,5 mM)

PBS (10x)

80 g	NaCl	(137 mM)
2 g	KCl	(2,7 mM)
11,5 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	(4,3 mM)
2 g	KH ₂ PO ₄	(1,5 mM)

PBS-Tween20 (0,5% (v/v), 1l)

5 ml	Tween20
995 ml	PBS

Ponceau S Lösung

2,5 g	Ponceau S	(6,5 mM)
5 ml	Essigsäure	(175 mM)

Proteinblock-Lösung

10 g	Instant- Magermilchpulver
200 ml	PBS- Tween20

Proteintransfer-Puffer

3.0 g	Trizma®Base	(25 mM)
14.4 g	Glycin	(192 mM)
200 ml	Ethanol	(3426 mM)

Puffer A (1l)

10 mM	HEPES [pH 7,9]
10 mM	KCl
1,5 mM	MgCl ₂ Hexahydrat
0,34 M	Sucrose
10%	Glycerol
1 mM	DTT

+ 30 µl pro 10ml Puffer A Protease inhibitor cocktail (10 x Stocklsg.)

+ 0,0174 g (0,1 mM) Phenylmethylsulphonyl fluoride

Kurz vor Gebrauch zugeben.

Reaktionspuffer (20x) für PAA

500 mM	HEPES
10 mM	EDTA
pH 7,6	

Sammelgel-Puffer

30,3 g	Trizma®Base	(250 mM)
2 g	SDS	(7 mM)

Sammelgel (4%)

1.8 ml	Acrylamid Stocklösung
5.0 ml	Sammelgel- Puffer
4.0 ml	destilliertes Wasser
100 µl	APS (30%)
10 µl	TEMED

SDS-Gel-Ladepuffer (2x)

100 mM	Trizma®HCl (pH 6,8)
200 mM	DTT
4% (w/v)	SDS
0,2% (w/v)	Bromphenolblau
20% (v/v)	Glycerin

SDS-Lysepuffer

10 mM Tris-HCl, pH8
150 mM NaCl
2% SDS

SDS-Waschpuffer

10 mM Tris-HCl, pH 8
150 mM NaCl
0,1% SDS

Serumkomplement (Sc)

100 ml Glutamin (0,2 M)
20 ml Penicillin- Streptomycin- Lösung (5000 U/ml- 5000 µg/ml)
100 ml RPMI- Medium versetzt mit β- Mercaptoethanol (0,01% v/v)
100 ml nicht- essentielle Aminosäuren (MEM 100x)
100 ml Pyruvat (0,1 M)

25mM sodium phosphat buffer

Substrat-Stocklösung (100x) für PAA:

10 mM Suc-LLVY-AMC

TE-buffer für ICE-bioassay

10 mM Tris-HCl, pH 8
1 mM EDTA

Trenngel (7%)

4,375 ml Acrylamid Stocklösung
9.0 ml Trenngel- Puffer
5,125 ml destilliertes Wasser
180 µl APS (30%)
18 µl TEMED

Trenngel (12%)

7.5 ml Acrylamid Stocklösung
9.0 ml Trenngel- Puffer
2.0 ml destilliertes Wasser
180 µl APS (30%)
18 µl TEMED

Trenngel (15%)

9,35 ml Acrylamid
9.0 ml Trenngel- Puffer
125 µl destilliertes Wasser
180 µl APS (30%)
18 µl TEMED

Trenngel-Puffer

90,8 g Trizma base
2,0 g SDS

3.3 Antikörper

3.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1 : Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper

Antikörper	Klon	Spezifität	Quelle
ATM	5C2	ATM	Novus Biologicals
Calnexin	H-70	AS 1-70	SantaCruz
H3K9m3		Histon H3, trimethyliert am Lysin 9	Abcam
γ H2AX S139	JBW	an Serin 139 phosphoryliertes Histon H2A	Upstate
HP1 γ	2MOD-1G6	an Serin 93 phosphoryliertes Heterochromatin Protein 1	Euromedex
Huntingtin	1HU-4C8	AS 181-810 vom Wildtyp Protein	Millipore
MDM2	SMP14	AS 154-167	SantaCruz
NuMA		NuMA	Bethyl
phospho-NUMA (S395)		an Serin 395 phosphoryliertes NuMA	CellSignaling (BioLabs)
p16		p16	BD Pharmingen
p21		p21	BD Pharmingen
PML	PG-M3	N-Terminus, AS 37-51	SantaCruz
Proteasom	PW8195	20S α -UE 1,2,3,5,6,& 7 (für Western Blot verwendet)	Enzo Life Sciences
Proteasom	PW8155	20S α -UE 5, 7, β -UE 1, 5, 5i, 7 (für Immunfluoreszenz verwendet)	Enzo Life Sciences

RPA34	9H8	RPA34	Imgenex
SUMO1		SUMO1	Abcam
α -Tubulin	DM1A	α - Tubulin	Sigma
TopoI		Humanes, polyklonales Serum	Sklerodermie-Serenbank
U1-70K		Humanes, polyklonales Serum	Sklerodermie-Serenbank

3.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Die in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper	Konjugat
Ziegenserum gegen humanes IgG	Fluorochrom FITC
Ziegenserum gegen humanes IgG	Fluorochrom Rhodamin
Ziegenserum gegen humanes IgG	Fluorochrom Cy5
Ziegenserum gegen humanes IgG	Meerrettichperoxidase
Ziegenserum gegen murines IgG	Fluorochrom FITC
Ziegenserum gegen murines IgG	Fluorochrom Rhodamin
Ziegenserum gegen murines IgG	Fluorochrom Cy5
Ziegenserum gegen murines IgG	Meerrettichperoxidase
Ziegenserum gegen Kaninchen IgG	Fluorochrom FITC
Ziegenserum gegen Kaninchen IgG	Fluorochrom Rhodamin
Ziegenserum gegen Kaninchen IgG	Fluorochrom Cy5
Ziegenserum gegen Kaninchen IgG	Meerrettichperoxidase

Alle sekundären Antikörper wurden von der Firma Jackson ImmunoResearch (Hamburg, Deutschland) bezogen. Die Fluorochrom-gekoppelten Antikörper wurden für die indirekte Immunfluoreszenz in der Verdünnung 1:100 eingesetzt, und die Peroxidase-gekoppelten Antikörper wurden im Western Blot in den Verdünnungen 1:5000 (Ziegenserum gegen murines IgG) bzw. 1:10000 (Ziegenserum gegen Kaninchen IgG, Ziegenserum gegen humanes IgG) verwendet.

3.4 Verbrauchsmaterialien

Celluloseacetat- Membran	Whatman, Schleicher & Schuell
Deckgläschen (Dicke Nr. 1, 22x22 mm)	Erie Scientific Company (Portsmouth, NH, USA)
Einmalreaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eindeckelmedium: Vectashield	Vector (Burlingame, CA, USA)
Filter, 0,45µm	Greiner- Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
Gewebekulturflaschen	Greiner- Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
Gewebekulturplatten	Greiner- Bio One (Frickenhausen, Deutschland)
Kanülen: Microlance 3 (20 G1, 23 G1, 27 G3/4)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Nitrocellulosemembran: Hybond® ECL	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Objektträger: SuperFrost®Plus	Menzel- Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Polyallomertubes (14x89 mm)	Konrad Beranek (Weinheim, Deutschland)
Röntgenfilm: Hyperfilm™ ECL	VWR International (Darmstadt, Deutschland)
Sterilfilter (0,2 µm)	Pall Corporation (East Hill, NY, USA)
Zentrifugenröhrchen	Greiner- Bio One (Frickenhausen, Deutschland)

3.5 Technische Geräte

Brutschrank: <i>Hera cell</i>	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Bio-Dot® SF Microfiltration Apparat	Bio-Rad (München, Deutschland)
Elektronische Analysewaage R200D	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Elektrophoresekammer: Mini- Protean II Cell	Bio- Rad (München, Deutschland)
Elektroblotter Trans- Blot SD Semi dry transfer cell	Bio- Rad (München, Deutschland)
Feinwaage PT 210	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Filmentwickler: <i>CURIX 60</i>	AGFA (Köln, Deutschland)
Fluorometer Fluoroskan Ascent	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Gammacell 2000	Mølsgaard medical (Hørsholm, Dänemark)
Konfokales- Laser- Scanning- Mikroskop: IX 70 mit Fluoview 2.0	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Lichtmikroskop: Aristoplan	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Metamorph 4.6, Software	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	peQLab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Neubauer- Zählkammer	Assistent (Sondheim, Deutschland)
pH- Meter 720	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipettierhilfe: pipetus®	Hirschmann Laborg. (Eberstadt, Deutschland)
PowerPac 200 Power Supply	Bio- Rad (München, Deutschland)
Schüttler: Shaker 3020	GFL® (Burgwedel, Deutschland)
Sterilbank: Herasafe KS 12	Heraeus- Kendro (Langenselbold,

	Deutschland)
Schwenkbecherrotor SW41Ti Für Ultrazentrifuge L8-M	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Thermoblock: Techne dri- block	Intergra Bioscience (Fernwald, Deutschland)
Wasserbad	GFL® (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifugen:	
- Centrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
- Megafuge 1.0	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
- Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
- Ultrazentrifuge L8-M	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)

3.6 Zellkultur

3.6.1 Kultivierung

Alle verwendeten Zelltypen wurden wie folgt kultiviert: Die Zellen wurden in 35 ml Kulturmedium bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte je nach Passage für zwei bis 21 Tage bis zur Subkonfluenz kultiviert. Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt, um zu vermeiden, dass die Zellen wegen Mangel an Nährstoffen (Quieszenz) und nicht aufgrund wiederholter Zellteilungen aufhören zu wachsen. Subkonfluente Zellen wurden zwei Mal mit PBS (37°) gewaschen, mit Trypsin (37°) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und 1:4 (junge Fibroblasten) oder 1:2 (präseneszenzente und seneszenzente Fibroblasten) erneut ausgesät.

Replikative Seneszenz von Fibroblasten wurde nach mehreren Populationsverdopplungen (*engl. population doublings, PD*) in Kultur erreicht. Wurden die Zellen 1:2 ausgesät, entsprach das einer PD, bis sie wieder subkonfluent waren. Wurden sie 1:4 ausgesät, hatten die Zellen zwei PDs durchlaufen bis sie wieder subkonfluent waren. Nach mehreren PDs hören die Zellen auf sich zu teilen und werden seneszent. Da dieser Vorgang zum ersten mal von Hayflick und Moorhead beschrieben wurde (Hayflick, Moorhead 1961), nennt man das Erreichen der replikativen Seneszenz auch das Hayflick Limit.

3.6.2 Verwendete Zelltypen

WI-38 Zellen sind Fibroblasten aus der Lunge eines drei Monate alten weiblichen Fötus. Bezogen wurden sie von der American Tissue Culture Collection (ATCC) als Passage 16. Da nicht bekannt war, in welchem Verhältnis (1:2 oder 1:4) diese Zellen ausgesät wurden, wurden die PD der WI-38 Zellen auf 24 geschätzt.

WI-38 Zellen konnten unter den verwendeten Kulturbedingungen bis zu 47 PDs durchlaufen, bevor sie das Hayflick Limit erreichten. Die Einteilung in junge, präseneszente und seneszente WI-38 wurde wie folgt vorgenommen:

PD 0- 35: junge WI-38

PD 35- 45: präseneszente WI-38

PD 45- 47: seneszente WI-38

HDFs sind Humane Dermale Fibroblasten aus der Haut von adulten Donoren. Die Zellen wurden von Prof. Reifenberger (Uniklinik Düsseldorf) mit Passage 14 bezogen (ursprüngliche Quelle: Firma Promocell). Diese Zellen proliferierten unter den verwendeten Kulturbedingungen bis PD60, bevor sie das Hayflick Limit erreichten. Die in dieser Arbeit gezeigten Daten mit diesen Zellen stammen alle von dem initialen Aliquot, das heißt von einem Donor.

Die Einteilung in junge, präseneszente und seneszente HDFs wurde wie folgt vorgenommen:

PD 0- 45: junge HDFs

PD 45 -57: präseneszente HDFs

PD 57- 60: seneszente HDFs

HFF (*engl. Human Foreskin Fibroblasts*) sind Fibroblasten aus der Vorhaut von männlichen Donoren. Sie proliferieren unter den verwendeten Kulturbedingungen bis PD82 bevor sie das Hayflick Limit erreichen.

Die Einteilung in junge, präseneszente und seneszente HFF wurde wie folgt vorgenommen:

PD 0- 50: junge HFF

PD 50- 79: präseneszente HFF

PD 79- 82: seneszente HFF

3.6.3 Kulturmedien

Für alle Zelltypen wurde DMEM (1g/l Glukose, ohne L- Glutamin) mit 10% fötalem Kälberserum und 5% Serumkomplement versetzt.

3.7 Behandlung von Zellen

γ -Bestrahlung: Um in WI-38 Zellen DNA-Schäden zu induzieren, wurden sie mit 15 Gy bestrahlt, für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und anschließend fixiert.

Bleomycin: Um in HDFs DNA-Schäden zu induzieren, wurden sie wie in Rodier et al. 2010 beschrieben für 30 min mit 10µg/ml Bleomycin (Bleo) inkubiert und nach einer 30 minütigen Erholungsphase in frischem DMEM (1hBleo) fixiert.
Da Bleomycin in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst wird, wurden die Kontrollzellen mit DMSO behandelt.

Camptothecin: Für den ICE-bioassay (siehe 3.13.) wurden HDFs für 1 h mit 50 µM Camptothecin in serumfreien DMEM (-FCS/5% SC) inkubiert.
Camptothecin wurde in DMSO gelöst und dementsprechend die Kontrollzellen mit DMSO behandelt.

3.8 β -Galaktosidaseassay

Der β -Galaktosidaseassay basiert auf der histochemischen Färbung der β -Galaktosidaseaktivität bei pH 6. Unter diesen Bedingungen werden nur seneszente Zellen gefärbt; quieszente, immortale Zellen oder Tumorzellen werden nicht detektiert (Dimri et al. 1995).

Für den β -Galaktosidaseassay wurden junge und seneszente Fibroblasten auf Deckgläschen (DG) ausgesät und zwei Tage kultiviert. Der im Kit enthaltene Fixierungspuffer und das 10x PBS wurden jeweils mit Reinstwasser verdünnt.

Die Zellen auf den DG wurden zwei Mal mit 1 ml 1x PBS gewaschen und anschließend für 6-7 min bei Raumtemperatur (RT) mit 1,5 ml 1x Fixierungspuffer fixiert. Während des Fixierungsschritts wurde die Färbelösung wie folgt angesetzt (für 4 DG):

1 ml Färbelösung
125 µl Reagens B
125 µl Reagens C
0.25 ml X-gal Lösung
8.50 ml Reinstwasser

Die Färbelösung wurde durch einen 0,2 µm Filter gefiltert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen drei Mal mit 1 ml 1x PBS gewaschen, mit 1,5 ml Färbelösung versetzt und 18 h bei 37°C ohne CO₂ in einer, mit Parafilm luftdicht verschlossenen, Gewebekulturplatte inkubiert. Seneszente Zellen sind nach der Färbung blau gefärbt. Für mikroskopische Aufnahmen wurden die Zellen mit Eindeckelmedium eingedeckelt. Für Quantifikationen wurden jeweils von drei unabhängigen Experimenten ~100 Zellen ausgezählt und der Anteil seneszenter (blauer) Zellen ermittelt.

3.9 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten, sterilen DG ausgesät und für zwei Tage kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit Methanol (5 min, -20 °C) und Aceton (2 min, -20 °C) fixiert. Nach drei Waschschritten (5 min, RT) mit 1x PBS, wurden die Zellen mit den jeweiligen primären Antikörpern für eine Stunde in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Bei Doppel- bzw. Dreifachfärbungen wurden entsprechend zwei bzw. drei primäre Antikörper verschiedener Spezies aufgetragen. Nach weiteren drei Waschschritten (10 min, RT) mit 1x PBS wurden die Zellen für 45 min mit dem sekundären Antikörper in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Bei einer Doppel- bzw. Dreifachfärbung wurden jeweils zwei bzw. drei sekundäre Antikörper verschiedener Spezies aufgetragen. Nach drei weiteren 10 min Waschschritten in 1x PBS wurden die DG mit Eindeckelmedium eingedeckelt, mit Nagellack luftdicht verschlossen, trocknen gelassen und bei 4 °C gelagert.

3.10 Gelelektrophorese und Western Blot

Subkonfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS (37°C) zwei Mal gewaschen und mit Trypsin (37 °C) vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in ein Sammelgefäß überführt. Die seneszenten Zellen wurden zusätzlich mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst, da diese mit Trypsin nicht vollständig abgelöst

werden konnten. Die Zellkulturflaschen wurden erneut zwei Mal mit DMEM gewaschen, um verbliebene Zellen zu ernten. Durch Zentrifugation (1200 rpm, 3 min, 4 °C) wurden die Zellen pelletiert und in PBS aufgenommen. Nachdem die Proteinmenge spectrophotometrisch mittels NanoDrop bestimmt war, wurden die Zellen 1:1 mit SDS-Gel-Ladepuffer (2X) versetzt. Zum Scheren der DNA wurde das Zelllysate durch Kanülen unterschiedlicher Größe (20G1, 23G1, 27G) gesogen.

Das gesamte Zelllysate wurde für 2 min bei 95°C gekocht, um die enthaltenen Proteine zu denaturieren. Das Gesamtzelllysate wurde zusammen mit einem Marker, der Proteine definierter Größe enthält, auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels vertikaler Elektrophorese bei 180 V in Laufpuffer aufgetrennt. Für niedermolekulare Proteine wurde ein 15%iges SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet, während für Proteine mittleren Molekulargewichts ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel und für hochmolekulare Proteine ein 7%iges SDS-Polyacrylamid-Gel verwendet wurde. Nach Auftrennung der Proteine wurden diese mit einer „*semy-dry*“ Transfer Apparatur (15–60 kD Proteine) mit Transferpuffer bei 15 V (45 min) oder mit einer „*wet blot*“ Apparatur (40–250 kD Proteine) bei 100 V (1 h, 4 °C) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die transferierte Proteinmenge wurde mittels PonceauS Färbung überprüft.

Bevor spezifische Proteine detektiert werden konnten, musste die Nitrocellulosemembran in Proteinblock-Lösung für eine Stunde inkubiert werden, um unspezifischen Antikörper-Bindestellen zu blockieren. Der primäre Antikörper wurde in der Proteinblock-Lösung verdünnt, auf die Membran aufgetragen und für eine Stunde in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 10 min) mit PBS-Tween20 folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 45 min in einer Feuchtkammer bei RT. Der sekundäre Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase gekoppelt. Anschließend wurde drei Mal 10 min mit PBS-Tween20 gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran mit ECL-Reagenz befeuchtet. Das ECL-Reagenz löst die durch die Meerrettichperoxidase katalysierte Reaktion der Chemolumineszenz aus, die mittels lichtempfindlicher Röntgenfilme detektiert werden kann.

3.10.1 Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Die SDS-Gele wurden nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit der Coomassie-Färbelösung für mindestens 4 h bei RT

gefärbt und anschließend für 4-8 h mit der Entfärbelösung entfärbt, bis die Hintergrundfärbung ausgewaschen war und nur noch distinkte Proteinbanden zu sehen waren (Protokoll nach Sambrock et al. 1989).

3.11 Filterbindungsassay

Junge und seneszente HDFs wurden wie unter 3.10 beschrieben, geerntet und pelletiert. Das Pellet wurde mit 400µl PBS gelöst und mit 500µl SDS-Lysepuffer (+3µl/ml Protease Inhibitor Cocktail) versetzt und für 30 min bei RT lysiert. Das Lysat wurde 50-60 sec sonifiziert und 2 min bei 98°C gekocht. Die Proteinmenge wurde spectrophotometrisch mittels NanoDrop bestimmt. Von jeder Probe wurde die gleiche Menge Protein in Titrationsschritten (900–300 µg Protein) mit SDS-Waschpuffer versetzt (Endvolumen 200 µl) und mit einem Dot-Blot Apparat durch eine Celluloseacetatmembran gefiltert. Diese Membran ist nicht affin für Proteine und hält nur aggregierte, SDS-unlösliche Proteine aufgrund ihrer Größe zurück. Alle löslichen Proteine werden durch die Membran gefiltert und ausgewaschen (Novoselova 2005).

3.12 *In vivo* complex of enzyme (ICE)-Bioassay

Junge HDFs wurden wie in 3.7 beschrieben mit CPT bzw. DMSO behandelt und seneszente HDFs wurden entsprechend parallel für 1 h mit serumfreiem DMEM inkubiert. CPT stabilisiert die kovalenten Topol-DNA-Komplexe, die Topol während der DNA-Replikation und der Transkription mit der DNA eingeht und dient als Positivkontrolle (Pourquier et al. 2000). Nach der Behandlung wurde das Medium verworfen. Die Zellen wurden direkt in der Zellkulturflasche mit 3 ml 1% Sarkosyl in TE-Puffer (37 °C) lysiert und mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Das Lysat wurde 5x durch eine 21G Kanüle gesogen, um die DNA zu scheren.

Die gesamten 3 ml wurden auf einen Dichtegradienten aus Cäsiumchlorid (CsCl) in Polyallomerröhrchen gegeben, der aus je 2ml CsCl-Lösung mit den Dichten 1.82 g/ml, 1.72 g/ml, 1.5 g/ml und 1.45 g/ml bestand.

Die CsCl-Lösungen wurden wie in Tabelle 3 aufgeführt aus der 1.86 g/ml CsCl-Stocklösung hergestellt:

Tabelle 3: Herstellung der CsCl-Lösungen unterschiedlicher Dichte für die Dichtegradientenzentrifugation

Dichte	1.82 g/ml	1.72 g/ml	1.5 g/ml	1.45 g/ml
TE-Puffer	0,051 vol	0,15 vol	0,40 vol	0,60 vol
CsCl- Stock	0,949 vol	0,85 vol	0,60 vol	0,40 vol

Das Gewicht wurde bei jedem Experiment durch Abwiegen überprüft.

Nach sorgfältigem Austarieren mit TE-Puffer wurden die Dichtegradienten in einen Schwenkbecherrotor (SW41Ti) überführt und 20 h bei 20°C mit 31000 rpm in einer Beckmann Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden die ersten 3 ml verworfen und die CsCl-Fraktionen (500µl) von oben (erste Fraktion: 1.45 g/ml CsCl) entnommen. Die Fraktion, in der sich die DNA befand, wurde spectrophotometrisch mittels NanoDrop ermittelt und gegebenenfalls erneut geschert. Die DNA sollte sich ihrer Dichte entsprechend in den Fraktionen mit der Dichte 1.72 g/ml befinden (Fraktionen 9-12). Von jeder Probe wurde die gleiche Menge DNA der Fraktionen 6-13 mit 25 mM Natrium Phosphat Puffer (pH 6,5) versetzt (Endvolumen jeweils 200 µl). Eine Nitrocellulosemembran, die 15 min in 25 mM Natrium Phosphat Puffer equilibriert wurde, wurde zusammen mit fünf getränkten Whatman Papieren (in 25 mM Natrium Phosphat Puffer) in einen Slot-Blot-Apparat überführt. Der Slot-Blot-Apparat wurde an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, und die Fraktionen 6-13 wurden mittels Vakuum auf die Membran appliziert. Nach zweimaligem Waschen der Slots mit 25 mM Natrium Phosphat Puffer wurde die Membran wie unter 3.10 beschrieben mit einem humanen Serum gegen Topo I (1:800) detektiert.

3.13 Zellfraktionierung und Proteasomaler Aktivitätsassay (PAA)

Junge und seneszente WI-38 Zellen, HDFs und HFFs wurden wie unter 3.10 beschrieben geerntet, pelletiert, in Puffer A + 0,5% Igepal aufgenommen und für 5-10 min auf Eis fraktioniert. Nach anschließender Zentrifugation wurde die cytoplasmatische Fraktion (Überstand) abgenommen und das nucleäre Pellet in PBS

aufgenommen und sonifiziert. Die Proteinmenge wurde mittels NanoDrop bestimmt. Ein Teil der Fraktionen wurde 1:1 mit Ladepuffer versetzt und für die weitere Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Der andere Teil der Probe wurde eingesetzt, um die proteasomale Aktivität im Cytoplasma und im Nucleoplasma zu bestimmen.

Dafür wurde sowohl die cytoplasmatische als auch die nucleäre Fraktion in Reaktionspuffer (1x, verdünnt in H_2O) mit $10\text{ }\mu\text{M}$ Suc-LLVY-AMC Substrat bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Suc-LLVY-AMC ist ein gequenchtetes proteasomenspezifisches Substrat, das aus einem Peptid mit vier Aminosäuren (Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin) und einem inaktiven Fluorochrom (AMC, 7- amino-4-methylcoumarin) am C-Terminus besteht. Das Fluorochrom wird erst frei, wenn das angehängte Peptid durch die chymotryptische Aktivität des 20S Proteasoms hydrolysiert wird. Die frei werdende Fluoreszenz und somit die proteasomale Aktivität kann mittels Fluorometer bei 380 nm Extinktion und 460 nm Emission gemessen werden. Um die Spezifität der Messung zu kontrollieren, wurde 2 h nach Beginn der Inkubation der Proteasomeninhibitor Lactacystin zu einem Teil der Proben gegeben. Die proteasomale Aktivität wurde über einen Zeitraum von 16 h beobachtet. Der 16 h Wert (arbiträre Einheiten) der jungen Kontrollzellen wurde auf 100% gesetzt und die Werte der seneszenten Zellen auf die Werte der jungen Kontrollzellen relativiert.

3.14 Mikroskopie und Bildbearbeitung

Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und mittels eines konfokalen Laser Scanning Mikroskops (Olympus IX70, Fluoview 2.0) mit einem 60x Ölimmersionsobjektiv gescannt. Die FITC-markierten Antikörper emittieren grünes Licht, wenn sie mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm angeregt werden. Die Rhodamin-, bzw. Cy5-markierten Antikörper werden mit Lasern der Wellenlänge 568 nm bzw. 647 nm angeregt und emittieren rotes Licht.

Mikrographien, die die Morphologie der Zellen zeigen, wurden mit der Normarski Optik (Differenzieller Interferenzkontrast, DIC) aufgenommen.

Die generierten multi-TIFs wurden mit dem Computerprogramm Metamorphe 4.6 als 12 bit TIF in Adobe Photoshop 7.0 überführt und in 300 dpi (*engl. dots per inch*) zu Mikrographien zusammengesetzt. Die Pixelzahl der Aufnahmen wurde dabei nicht verändert.

„*Linescans*“ wurden mit dem Computerprogramm Metamorph 4.6 erstellt und stellen die Intensität von Pixeln entlang einer Linie als Graph dar. Auf der x-Achse sind die Pixel innerhalb der Linie und auf der y-Achse die Intensität aufgetragen. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Bildausschnitte zum Teil vergrößert über Pixelwiederholungen berechnet und dargestellt.

Zur Bestimmung der Entfernung zweier Objekte wurde im Adobe Photoshop 7.0 Programm die Option „Messwerkzeug“ verwendet. Objekte, die $\leq 1 \mu\text{m}$ voneinander entfernt lagen, wurden als benachbart angesehen. Objekte, die $\geq 1 \mu\text{m}$ voneinander entfernt lagen, wurden als getrennt voneinander (separiert) angesehen. Für Distanzmessungen und Quantifikationen wurden Zellen von mindestens drei unabhängigen Experimenten ausgewertet. Die Datensätze wurden in Excel (Microsoft Office Suite) mittels ungepaarstem t-Test verglichen.

Densitometrische Auswertungen von Western Blot Filmen wurden mit dem Computerprogramm Metamorph 4.6 ausgeführt. Dazu wurden die Filme zunächst in Photoshop 7.0 geöffnet, invertiert und dann in das Programm Metamorph importiert. Die einzelnen Banden (*engl. regions of interest, ROI*) wurden umrandet und die durchschnittliche Intensität nach Abzug des Hintergrundsignals ermittelt. Die Werte für die Intensitäten konnten anschließend in Excel (Microsoft Office Suite) importiert und untereinander mittels ungepaarstem t-Test verglichen werden.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse von Seneszenzmarkern in WI-38 Zellen und HDFs

Um die Rolle von Proteinaggregation und Proteinhomeostase im alternden Zellkern zu untersuchen, wurde das Modell der replikativen Seneszenz verwendet, bei dem Fibroblasten als Folge wiederholter Zellteilungen in Kultur altern. Es gibt viele unterschiedliche Seneszenzmarker (Abschnitt 1.3.2). Die Messung der β -Galaktosidaseaktivität ist der am besten etablierte Marker und die p53/p21- und p16^{INK4a}-pRB-Signalwege sind die Signalwege (Abschnitt 1.2.1 und 1.2.2), die zur replikativen Seneszenz führen. Aus diesem Grund wurden WI-38 Zellen und HDFs zunächst auf β -Galaktosidaseaktivität und die Expression von p21 und p16 untersucht.

Dazu wurden sie histochemisch für β -Galaktosidaseaktivität mit einem "*senescent cells staining kit*" gefärbt. Seneszente Zellen weisen eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität bei pH 6 auf und erscheinen nach der Färbung blau. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und etwa 100 Zellen für die Quantifikation direkt am Mikroskop ausgewertet.

Der Anteil blau gefärbter, junger WI-38 Zellen liegt bei $1,4 \pm 0,1\%$. Dieser Anteil steigt in seneszenten WI-38 auf $69,6 \pm 2,9\%$ an (Abb. 4.1 A). In jungen HDFs erscheinen $0,89 \pm 1\%$ Zellen blau und in seneszenten HDFs $82,41 \pm 10,31\%$ (Abb. 4.1 B).

Ein weiterer Marker ist die veränderte Morphologie seneszenten Zellen im Vergleich zu jungen Zellen. Während junge Fibroblasten eine längliche, schmale Morphologie aufweisen, werden seneszente Fibroblasten größer und breiten sich nach allen Seiten aus (Abb. 4.1 A und B).

In Abbildung 4.1 C und D ist die Expression von p21 und p16 im Gesamtzelllysat junger, präseneszenten und seneszenten WI-38 (C) und HDFs (D) dargestellt.

In beiden Zelltypen ist p21 in jungen Zellen kaum exprimiert, nimmt dann in präseneszenten Zellen zu und in seneszenten Zellen wieder ab. p16 ist in jungen Zellen minimal exprimiert und akkumuliert in seneszenten Zellen. Die Ladekontrolle (Ausschnitt vom SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie) bleibt unverändert.

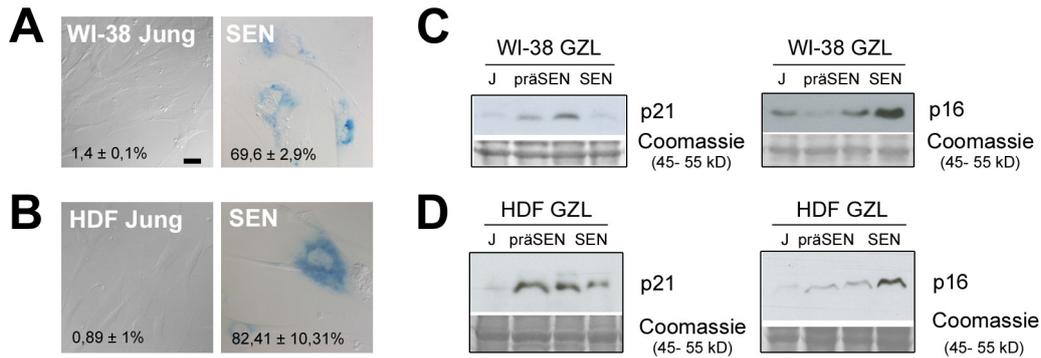


Abbildung 4.1: Expression von Seneszenzmarkern in WI-38 Zellen und HDFs

Junge und seneszente (SEN) WI-38 Zellen (A) bzw. HDFs (B) wurden histochemisch für β -Galaktosidaseaktivität bei pH 6 gefärbt. Zellen, die β -Galaktosidase exprimieren, erscheinen blau (seneszente Zellen). Die Zahlenwerte zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten ($n = \sim 300$). Maßstab: $10\mu\text{m}$

In C und D ist die Expression der Seneszenzmarker p21 und p16 in WI-38 Zellen (C) und HDF (D) im Gesamtzelllysate (GZL) von jungen (J), präseneszenten (präSEN) und seneszenten (SEN) Zellen dargestellt. Das Coomassie (45-55 kD) dient als Ladekontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass WI-38 und HDFs dieselben Seneszenzmarker im Verlauf der replikativen Seneszenz exprimieren.

4.2 HDFs bilden Seneszenz-assoziierte Proteinaggregate (SAPAs)

4.2.1 Lokalisation der SAPAs in Bezug auf Heterochromatin

Ein weiteres Merkmal einiger seneszenten Zellen ist die Bildung von fakultativem Heterochromatin in lokalen Bereichen des Zellkerns, die SAHFs genannt werden (Narita et al. 2003, Abschnitt 1.3.2). Eine Methode die SAHFs sichtbar zu machen, ist die Färbung des Proteins HP1 γ mit spezifischen Antikörpern.

Für WI-38 ist bereits bekannt, dass sich im alternden Zellkern SAHFs bilden (Zhang 2007; Narita et al. 2003). Um herauszufinden, ob es in HDFs auch zu Chromatinveränderungen kommt, wurden junge und seneszente WI-38 und HDFs gegen HP1 γ und Topol I, einem weiteren Marker für SAHFs (Humbert et al. 2009), gefärbt. Topol wurde auch mitgefärbt, da in Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass Topol einen Marker für die, durch Silica-Nanopartikel induzierten, Proteinaggregate darstellt (Chen et al. 2008; Chen, von Mikecz 2005).

In jungen WI-38 Zellen zeigt HP1 γ ein homogenes Muster mit vereinzelt hellen Foci, die zum Teil nah an den Nucleolen lokalisiert sind. Topol ist stark in den Nucleolen gefärbt und schwach im Nucleoplasma verteilt. Es kommt zu keiner Kollokalisierung von HP1 γ und Topol in jungen WI-38 (Abb. 4.2 A, WI-38 jung).

In seneszenten WI-38 verändert sich sowohl die Verteilung von HP1 γ als auch von Topol. Es bilden sich helle, vereinzelt Foci im Nucleoplasma, in denen HP1 γ und Topol kolokalisieren. Bei diesen Foci handelt es sich um SAHFs (Abb. 4.2 WI-38 SEN, vergrößerter Ausschnitt).

Die *linescans* stellen die Intensität von Pixeln entlang einer Linie als Graph dar. Auf der x-Achse sind die Pixel innerhalb der Linie und auf der y-Achse die Intensität aufgetragen. Der *linescan* zeigt die Bereiche, in denen HP1 γ und Topol kolokalisieren (Abb. 4.2 a, gelbe Pfeile).

In jungen WI-38 zeigen ~ 5% der Zellen SAHFs. Diese Anzahl steigt in seneszenten WI-38 signifikant auf 40% ($p= 0,0029$) an. Im Gegensatz dazu finden sich in jungen HDFs keine und in seneszenten HDFs 1,4% Zellen mit SAHFs (Abb. 4.2 Diagramm 1).

Betrachtet man junge und seneszente HDFs, die mit HP1 γ und Topol gefärbt wurden, zeigen sich Unterschiede im Fluoreszenzmuster seneszenter HDFs im Vergleich zu WI-38 Zellen. In jungen HDFs ist das Muster vergleichbar mit dem in jungen WI-38. HP1 γ ist im Nucleoplasma verteilt und zeigt vereinzelt helle Foci. Topol ist in den Nucleolen lokalisiert und schwach im Nucleoplasma zu sehen. HP1 γ und Topol kolokalisieren nicht (Abb.4.2 B, HDF jung).

In seneszenten Zellen wird HP1 γ im Vergleich zu jungen Zellen im Nucleoplasma schwächer, und zeigt vereinzelt, helle Foci. Für Topol zeigen sich, zusätzlich zu der nucleolären Färbung, zwei helle aggregatähnliche Foci im Nucleoplasma. Diese Foci wurden, da sie nur in seneszenten HDFs zu sehen sind, Seneszenz assoziierte Proteinaggregate, kurz SAPAs genannt (Abb. 4.2 B, HDF SEN, vergrößerter Ausschnitt). Wie im *linescan* zu sehen ist, kolokalisieren die Topol-SAPAs nicht mit HP1 γ (Abb. 4.2 b, grüne Pfeile). Topol-SAPAs sind zu einem geringen Prozentsatz auch in jungen und seneszenten WI-38 Zellen zu sehen ($\leq 10\%$), jedoch ist nur in seneszenten HDFs die Anzahl der Zellen mit SAPAs von ~5% (jung) auf ~50% signifikant erhöht ($p= 0,0012$; Abb. 4.2 Diagramm 2).

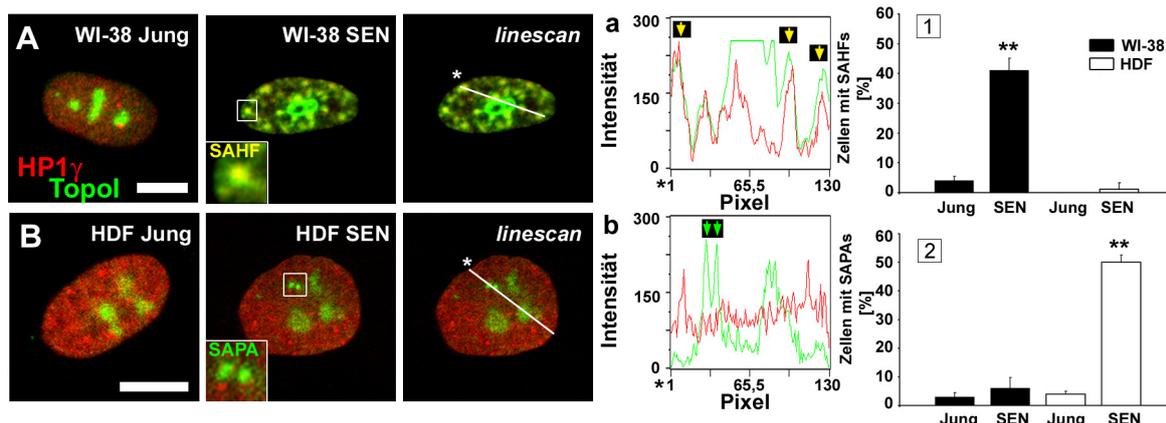


Abbildung 4.2: Lokalisation von HP1 γ und Topol in jungen und seneszenten WI-38 Zellen und HDFs

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von jungen und seneszenten Fibroblasten (A: WI-38, B: HDFs), die gegen HP1 γ (rot) und Topoisomerase I (Topol, grün) doppelgefärbt wurden. In seneszenten WI-38 Zellen (WI-38 SEN) bilden sich *Seneszenz assoziierte Heterochromatin Foci* (SAHFs), die mit Topol kolokalisieren. Im vergrößerten Ausschnitt ist die Kolokalisation in gelb zu sehen. Die *linescans* zeigen die Linien, anhand derer der Graph mit dem Computerprogramm Metamorphe 4.6 erstellt wurde. Auf der x-Achse sind die Pixel innerhalb der Linie und auf der y-Achse ist die Intensität aufgetragen. Der Graph zeigt die Überlappung der roten und grünen Fluoreszenzsignale im Bereich der SAHFs (a, gelbe Pfeile). Die Anzahl der Zellen mit SAHFs wurde anhand der Fluoreszenzaufnahmen quantifiziert. Diese ist in seneszenten WI-38 signifikant erhöht (Diagramm 1, ** = $p < 0,01$). In seneszenten HDFs (HDF SEN) bildet Topol *Seneszenz assoziierte Protein Aggregate* (SAPAs), die nicht mit HP1 γ kolokalisieren (vergrößerter Ausschnitt). Der als Graph dargestellte *linescan* zeigt keine Kolokalisation des grünen Fluoreszenzsignals mit dem roten Fluoreszenzsignal (b, grüne Pfeile). Die Anzahl der Zellen mit SAPAs wurde anhand der Fluoreszenzaufnahmen quantifiziert. Diese ist in seneszenten HDFs signifikant erhöht (Diagramm 2, ** = $p < 0,01$). Die Sterne markieren den Startpunkt der *linescans*. Die Diagramme 1 und 2 zeigen die Mittelwerte + Standardabweichungen (Anzahl der ausgewerteten Zellen: WI-38 jung: $n = 331$, WI-38 SEN: $n = 261$, HDF jung: $n = 243$, HDF SEN: $n = 318$). Maßstab: $5\mu\text{m}$

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich in seneszenten WI-38 die bereits beschriebenen SAHFs bilden, die sich mit HP1 γ und Topol anfärben lassen. Im Gegensatz dazu zeigen HDFs Topol-SAPAs. Es konnte gezeigt werden, dass Topol nicht nur ein Marker für Silica-Nanopartikel induzierte Aggregate darstellt (Chen et al. 2008; Chen, von Mikecz 2005), sondern auch für endogene, altersbedingte Proteinaggregate.

Um zu überprüfen, ob es ein charakteristisches Merkmal der Topol-SAPAs ist, dass sie nicht mit Heterochromatin assoziiert sind, wurden Immunfärbungen mit H3K9m3 durchgeführt. H3K9m3 ist ein Marker für Heterochromatin und bezeichnet das Histon H3, das am Lysin (K) 9 dreifach methyliert ist (m3). Als Kontrolle wurden WI-38 Zellen mitgefärbt, da Topol in WI-38 Zellen Heterochromatin assoziiert ist (s. Abb. 4.2 A, Vergrößerung).

Junge und seneszente WI-38 und HDFs wurden fixiert und gegen Topol und H3K9m3 gefärbt. In jungen WI-38 und HDFs ähnelt sich das Muster für H3K9m3. Bereiche entlang der Kernhülle und einige Bereiche im Nucleoplasma sind stark gefärbt, während die anderen Bereiche schwach gefärbt sind. Die Mikrographien und der zum *linescan* gehörende Graph zeigen, dass Topol und H3K9m3 in jungen Zellen nur an Randbereichen der Nucleoli kolokalisieren (Abb. 4.3 A, a, C, c).

In seneszenten WI-38 bilden sich im gesamten Nucleoplasma helle Heterochromatin-Foci, die sich mit H3K9m3 und Topol anfärben lassen. Es kommt zu einer Kolokalisation zwischen H3K9m3 und Topol, die durch die Überlappung der roten und grünen Fluoreszenzsignale in den zum *linescan* gehörigen Graph dargestellt ist (Abb. 4.3 B, b).

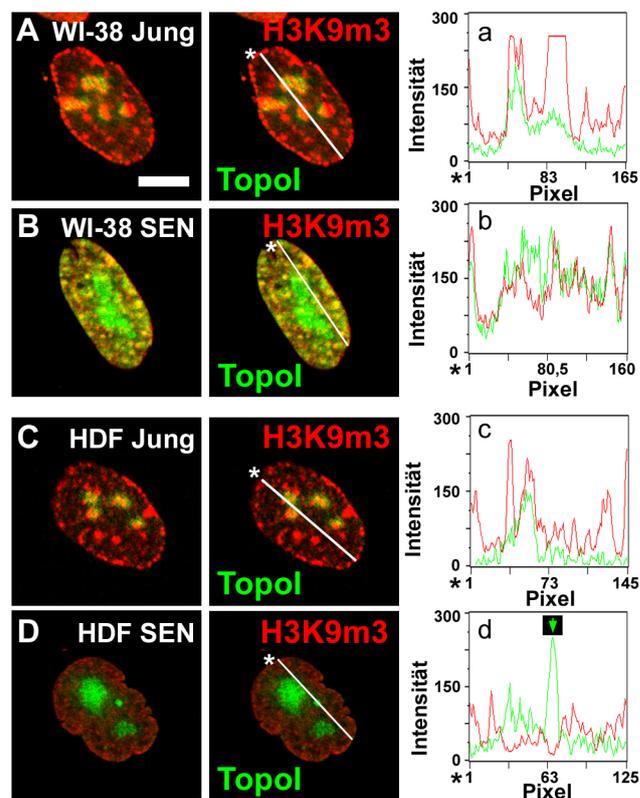


Abbildung 4.3: Lokalisation von Topol und Heterochromatin in WI-38 und HDF

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von jungen WI-38 (A) bzw. HDFs (C) und seneszenten WI-38 (B) bzw. HDFs (D), die gegen Topol (grün, A-D) und H3K9m3 (rot, A-D) gefärbt wurden. Die Graphen zeigen auf der x-Achse die Pixel und auf der y-Achse die Intensität innerhalb der Linie, die durch die übereinandergelagerten Mikrographien gezogen wurden. Die Sterne markieren den Startpunkt der Linie. Die rote und grüne Fluoreszenz ist anhand der roten und grünen Linien dargestellt (a-d). Der grüne Pfeil markiert den Bereich, an dem sich der Topol-SAPA befindet (d). Maßstab: 5µm

In seneszenten HDFs nimmt das Signal für H3K9m3 ab, es sind keine hellen Heterochromatinbereiche zu sehen, sondern eine schwach homogene Färbung im Nucleoplasma. Topol ist in den Nucleolen lokalisiert und bildet einen distinkten SAPA im Nucleoplasma (Abb. 4.3 D). Dieser hebt sich deutlich vom roten Fluoreszenzsignal für H3K9m3 ab, wie in dem zum *linescan* gehörigen Graph zu sehen ist (Abb. 4.3 d, grüner Pfeil).

4.3 Analyse der in SAPAs enthaltenen Proteine

4.3.1 Die Expression von Topol

Mit den Immunfluoreszenzexperimenten konnte gezeigt werden, dass es in seneszenten WI-38 und HDFs zu Veränderungen der Lokalisation des Proteins Topol kommt. Um zu untersuchen, ob sich auch die Expression von Topol ändert, wurde Gesamtzelllysate junger, präseneszenten und seneszenten HDFs in der SDS-PAGE untersucht.

In WI-38 Zellen nimmt die Topol-Expression im Verlauf der replikativen Seneszenz im Vergleich zu jungen WI-38 Zellen erst etwas ab und dann zu.

In jungen und präseneszenten HDFs bleibt die Topol-Expression unverändert und nimmt erst in seneszenten HDFs im Vergleich zur Ladekontrolle (Coomassie) ab (Abb. 4.4).

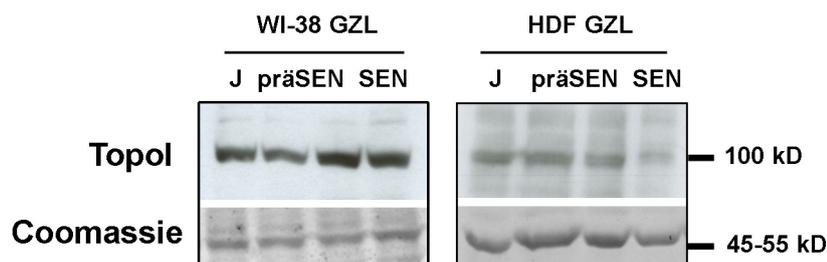


Abbildung 4.4: Die Expression von Topol in WI-38 Zellen und HDFs

Gesamtzelllysate (GZL) von jungen (J), präseneszenten (präSEN) und seneszenten (SEN) WI-38 Zellen und HDFs wurde auf ein 7%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen Topol (100 kD) detektiert. Der Ausschnitt vom Coomassie (45-55 kD) dient als Ladekontrolle.

4.3.2 SAPAs kolokalisieren mit endogenem Huntingtin

Um zu untersuchen, ob Topol-SAPAs mit bekannten aggregationsanfälligen Proteinen assoziiert sind, wurden Doppelfärbungen mit dem Markerprotein der neurodegenerativen Aggregaterkrankung Chorea Huntington durchgeführt. Zum Vergleich wurden WI-38 mitgefärbt.

Junge und seneszente HDFs bzw. WI-38 wurden fixiert und mit Antikörpern gegen Topol und Huntingtin gefärbt. Die eingesetzten Huntingtin-Antikörper sind gegen das endogene Wildtyp Protein gerichtet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.5 dargestellt. Topol ist in jungen HDFs in den Nucleolen und schwach im Nucleoplasma verteilt. Huntingtin ist in jungen HDFs hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert, zeigt aber vereinzelte Foci im Nucleoplasma. In der übereinandergelagerten Mikrographie ist keine Kolokalisation zwischen Topol und Huntingtin zu sehen. Der Ausschnitt ist für die grüne Fluoreszenz (Topol), die rote Fluoreszenz (Huntingtin) und die übereinandergelagerte Mikrographie vergrößert neben den Mikrographien dargestellt (Abb. 4.5 A). Anhand des Graphen kann man sehen, dass in jungen HDFs die rote Fluoreszenz für Huntingtin nicht mit der grünen Fluoreszenz für Topol überlappt (Abb. 4.5 a).

In seneszenten HDFs ist Topol als Ringstruktur um die Nucleolen und im Nucleoplasma verteilt. Im Nucleoplasma bilden sich distinkte Topol-SAPAs. Das Signal für Huntingtin nimmt im Vergleich zu jungen Zellen sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleoplasma zu. Huntingtin verteilt sich wie Topol um und bildet distinkte Aggregate im Nucleoplasma (Abb. 4.5 B). In der übereinandergelagerten Mikrographie ist die Kolokalisation zwischen Topol und Huntingtin im Bereich der Aggregate zu sehen. Der Ausschnitt ist für die grüne Fluoreszenz (Topol), die rote Fluoreszenz (Huntingtin) und die übereinandergelagerte Mikrographie vergrößert neben den Mikrographien dargestellt (Abb. 4.5 B). Die graphische Darstellung der Signalintensität mittels *linescan* zeigt eine Überlappung der Fluoreszenzsignale für Topol-SAPAs und Huntingtin-SAPAs (Abb. 4.5 b).

In 38,64% der seneszenten HDFs bildet Huntingtin distinkte SAPAs (Abb. 4.5 Diagramm 1, $p=0,00103$), die mit Topol-SAPAs kolokalisieren (kol, 70,05%, Abb. 4.5 B, b), partiell kolokalisieren (part, 15,96%), benachbart (ben, 6,83%) oder nicht mit Topol-SAPAs assoziiert (separiert, sep, 7,14%) sind (Abb. 4.5 Diagramm 2).

In WI-38 ist Huntingtin sowohl in jungen als auch in seneszenten Zellen schwach in den Nucleolen zu erkennen. In den übereinandergelagerten Mikrographien ist weder in jungen noch in seneszenten WI-38 eine Kolokalisation mit Topol zu sehen (Abb. 4.5 C und D).

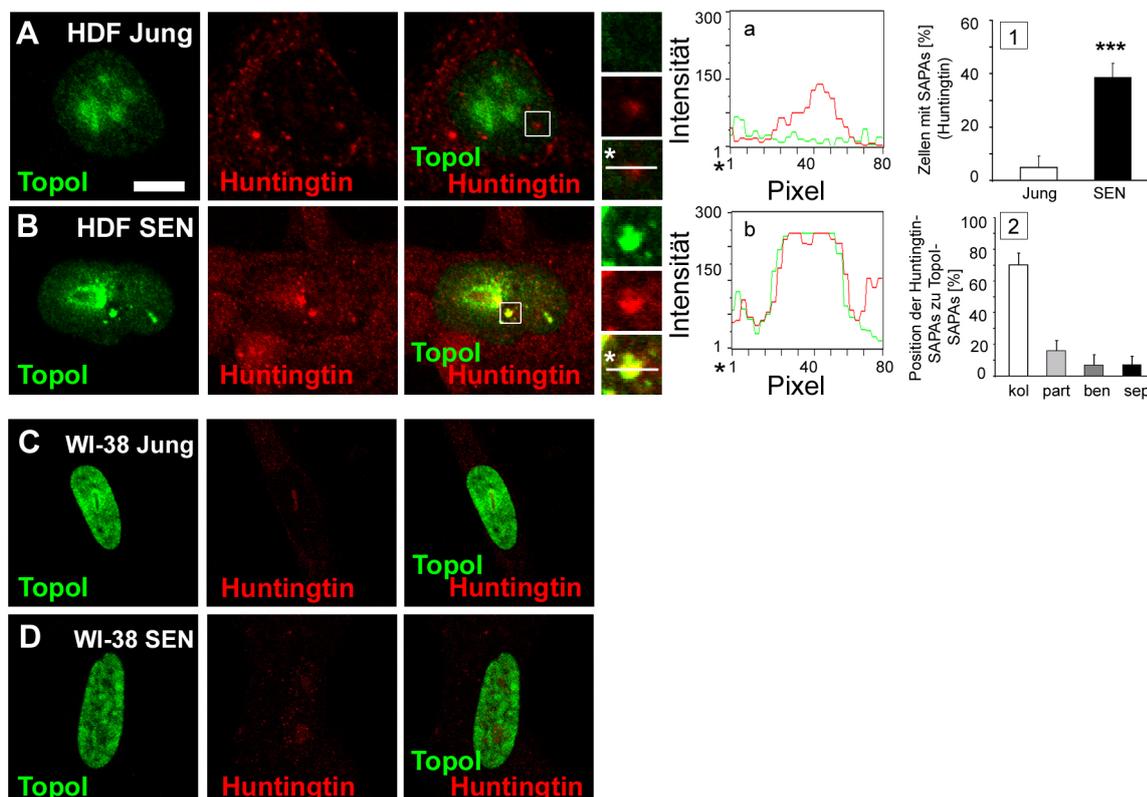


Abbildung 4.5: Topol-SAPAs kolokalisieren mit Huntingtin

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von jungen und seneszenten Fibroblasten (A, B: HDF, C und D: WI-38), die gegen Topol (grün) und gegen Huntingtin (rot) gefärbt wurden. Die Ausschnitte sind vergrößert neben den Mikrographien dargestellt (für A und B). Der Graph zeigt auf der x-Achse die Pixel und auf der y-Achse die Intensität der Linie, die durch die vergrößerten Ausschnitte gezogen wurden. Die Sterne markieren den Startpunkt der Linie. Die rote und grüne Fluoreszenz ist anhand der roten und grünen Linien dargestellt (a, b). In seneszenten HDFs bildet Huntingtin nucleäre Aggregate (A, Diagramm 1), die mit Topol-SAPAs kolokalisieren (kol), partiell kolokalisieren (part), benachbart (ben) oder separiert (sep) sind (Diagramme 2). Die Diagramme 1 und 2 zeigen die Mittelwerte + Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten (HDF jung: n= 421 Zellen, HDF SEN: 390 Zellen, ***p< 0,001). Maßstab: 5µm

Es konnte gezeigt werden, dass in seneszenten HDFs nicht nur das Protein Topol aggregiert, sondern auch das aggregationsanfällige Protein Huntingtin.

Im Folgenden wurden hauptsächlich seneszente HDFs untersucht, um die SAPAs, die nur in HDFs und nicht in WI-38 Zellen beobachtet wurden, näher zu charakterisieren.

4.3.3 SAPAs enthalten SDS-unlösliche Proteine

Ein Merkmal aggregierter Proteine in neurodegenerativen Erkrankungen ist, dass sie unlöslich sind und sich auch in starken Detergenzien wie SDS nicht lösen lassen (von Mikecz 2009; Novoselova 2005; Wanker et al. 1999).

Eine Möglichkeit, die Löslichkeit von Proteinen zu untersuchen, ist die Methode des Filterbindungsassays. Dazu wurden junge und seneszente HDFs in SDS-Lysepuffer, der 2% SDS enthält lysiert, 30 min bei RT inkubiert und aufgeköcht. Das Lysat wurde sonifiziert und anschließend durch einen Celluloseacetatmembranfilter gefiltert, der nur die SDS-unlöslichen, aggregierten Proteine aufgrund ihrer Größe zurückhält (Novoselova 2005). Die auf der Membran retardierten Proteine können anschließend mit Antikörpern detektiert werden.

In Abbildung 4.6 ist das Ergebnis des Filterbindungsassays mit jungen und seneszenten HDFs gezeigt, bei denen die Proteine Huntingtin und Topol detektiert wurden. In jungen HDFs ist ein schwaches Signal bei 900 µg eingesetzten Proteinlysats für Huntingtin und Topol zu sehen. In seneszenten HDFs dagegen sieht man ein starkes Signal für Huntingtin und Topol bei 900 µg Gesamtproteinmenge, das konzentrationsabhängig (900 bis 300 µg Gesamtproteinmenge) abnimmt (Abb. 4.6 A und C).

In den Diagrammen ist die densitometrische Auswertung der Lumineszenzsignale für Huntingtin und Topol gezeigt. Signifikante Unterschiede im Lumineszenzsignal zeigen sich bei 900 (Topol: $p=0,0334$; Huntingtin: $p=0,0443$) und 600 µg (Topol: $p=0,0431$; Huntingtin: $p=0,0156$) eingesetztem Gesamtprotein seneszenten HDFs im Vergleich zu jungen HDFs (Abb. 4.6 B und D).

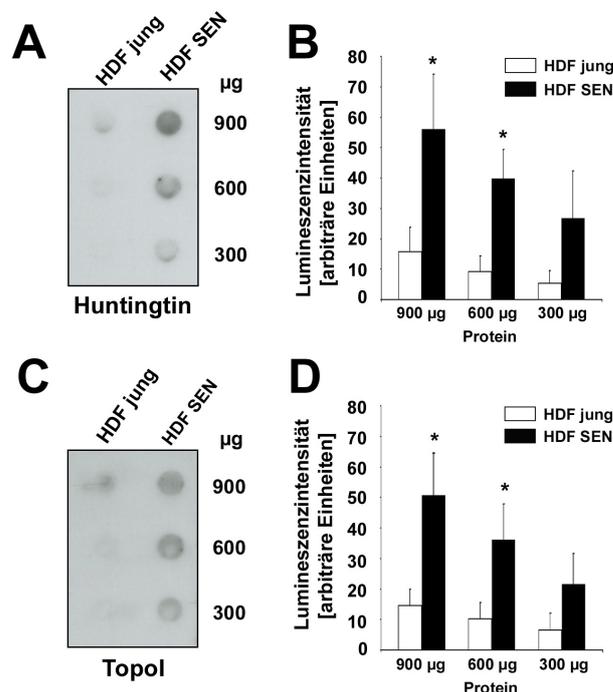


Abbildung 4.6: Huntingtin und Topol sind in seneszenten HDFs SDS-unlöslich

Junge und seneszente (SEN) HDFs wurden in SDS-Lysepuffer lysiert, 30 min inkubiert, denaturiert und durch eine Celluloseacetatmembran gefiltert. Aggregierte, SDS-unlösliche Proteine retadierten aufgrund ihrer Größe auf der Membran. Es wurden 900 bis 300 µg Gesamtprotein eingesetzt. Anschließend wurde die Membran mit Antikörpern gegen Huntingtin (A) und Topol (C) detektiert.

In den Diagrammen sind die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung von drei unabhängigen Experimenten für Huntingtin (B) und für Topol (D) dargestellt. Sie geben die Mittelwerte + Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten an (* p = 0,05).

4.3.4 Topol-SAPAs kolokalisieren mit nucleären Proteinen

Um Topol-SAPAs näher zu charakterisieren, wurden mit seneszenten HDFs Immunfluoreszenzfärbungen mit Proteinen durchgeführt, die in nucleären Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Folgende Proteine wurden untersucht: MDM2, der negative Regulator des Tumorsuppressors p53; die Seneszenzmarker p16 und p21; die Komponenten der PML-Kernkörperchen PML und SUMO1; das Protein NuMA und das Protein RPA34 (*engl. Replication protein A 34*), das eine Rolle in der DNA-Replikation und DNA-Reparatur spielt.

In Abbildung 4.7 sind die Immunfluoreszenzfärbungen von seneszenten HDFs für die Proteine dargestellt, die mit Topol-SAPAs kolokalisieren.

Topol ist in seneszenten HDFs in den Nucleolen lokalisiert und bildet Topol-SAPAs im Nucleoplasma (Abb. 4.7 A- D).

MDM2 zeigt in seneszenten HDFs ein gepunktetes Muster, das über den gesamten Zellkern verteilt und an den Nucleolen stärker lokalisiert ist. In der übereinandergelagerten Mikrographie mit Topol, und in den vergrößerten Ausschnitten, die den Bereich des Topol-SAPA zeigen, ist zu erkennen, dass dieser mit MDM2 kolokalisiert (die Kolokalisation ist in gelb zu sehen). Um zu quantifizieren, in wie vielen Zellen MDM2 mit Topol-SAPAs kolokalisiert, wurden nur die Zellen, die Topol-SAPAs aufwiesen, anhand der Fluoreszenzaufnahmen ausgezählt. Die Quantifikation der Zellen mit Topol-SAPAs ergab, dass $77 \pm 25,17\%$ eine Kolokalisation mit MDM2 aufweisen (Abb. 4.7 A). Der Graph stellt die Intensität der Pixel entlang der Linie, die durch den vergrößerten Ausschnitt gezogen wurde, dar. Der Graph zeigt, dass das rote mit dem grünen Fluoreszenzsignal überlappt (Abb. 4.7 a).

p21 ist in seneszenten HDFs nur gering exprimiert. Es lässt sich eine schwache Färbung im Bereich des Topol-SAPA erkennen (übereinandergelagerte Mikrographien und vergrößerte Ausschnitte). $27,2 \pm 11,83\%$ der Zellen mit Topol-SAPAs zeigen in der Immunfluoreszenz eine Kolokalisation der SAPAs mit p21 (Abb. 4.7 B, b).

Die Komponenten der PML-Kernkörperchen PML und SUMO1 sind in distinkten Punkten über den gesamten Zellkern verteilt. Einige PML-Kernkörperchen bilden eine Ringstruktur. In den übereinandergelagerten Mikrographien ist zu sehen, dass die Topol-SAPAs innerhalb der Ringstruktur von PML und SUMO1 lokalisiert sind (Abb. 4.7 C und D vergrößerte Ausschnitte). Der Graph zeigt, dass das rote Fluoreszenzsignal das grüne umgibt (Abb. 4.7 c und d). In $78,79 \pm 5,74\%$ der Zellen mit Topol-SAPAs kolokalisieren diese mit PML-Kernkörperchen.

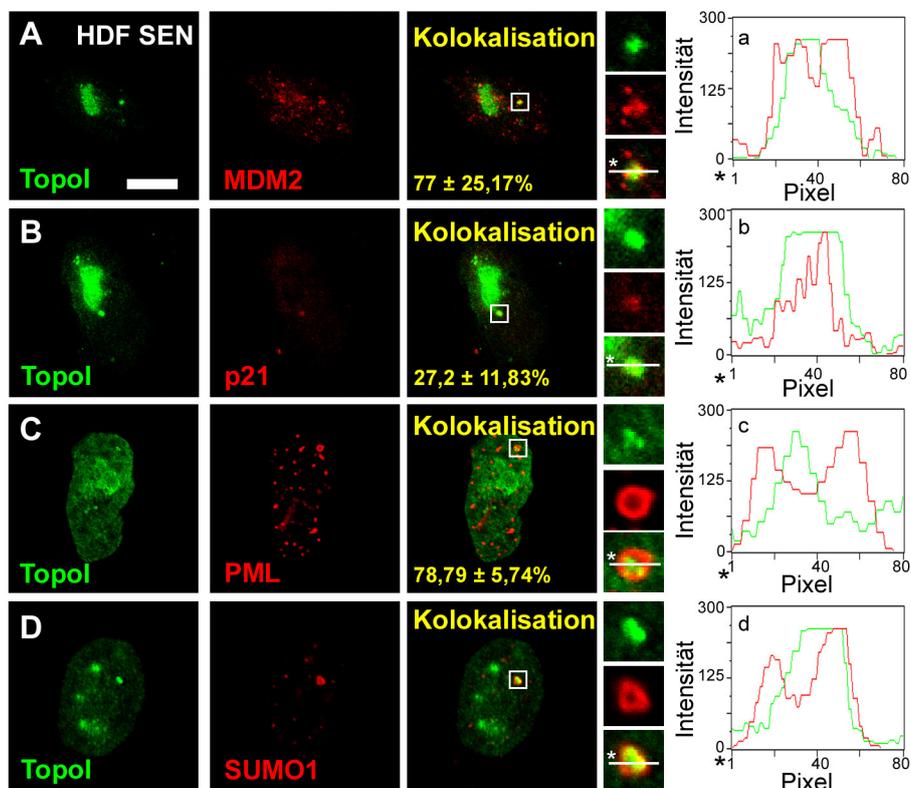


Abbildung 4.7: Proteine, die in SAPAs lokalisiert sind

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von seneszenten HDFs, die gegen Topol (A-D, grün) und MDM2 (A, rot) bzw. p21 (B, rot), PML (C, rot) und SUMO1 (D, rot) gefärbt wurden.

In den übereinandergelagerten Bildern ist die Kolokalisation der Antigene in gelb zu sehen. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen die Bereiche der Topol-SAPAs. Die Graphen stellen die Intensität der Pixel entlang der Linie, die durch den vergrößerten Ausschnitt gezogen wurde dar. Auf der x-Achse sind die Pixel innerhalb der Linie und auf der y-Achse die Intensität aufgetragen. Der Startpunkt der *linescans* ist durch die Sterne markiert. Die Zahlenwerte zeigen die Mittelwerte + Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten. Es wurden nur die Zellen quantifiziert, die Topol-SAPAs zeigten. Die Werte geben an in wievielen Zellen mit Topol-SAPAs diese eine Kolokalisation mit dem jeweiligen Antigen aufweisen (MDM2: n= 84, p21: n=27, PML: n=75). Maßstab: 5µm

In Abbildung 4.8 sind die Immunfluoreszenzaufnahmen der Proteine dargestellt, die in seneszenten HDFs nicht mit Topol-SAPAs kolokalisieren.

Topol ist in seneszenten Zellen im Nucleoplasma homogen verteilt und zeigt in einigen Bereichen distinkte SAPAs (Abb. 4.8 A-C).

p16 zeigt in seneszenten HDFs ein körniges Muster im Nucleoplasma. Die Nucleolen sind nicht gefärbt. Im Bereich des Topol-SAPA ist p16 komplett ausgespart. In 0%

der Zellen mit Topol-SAPAs kolokalisieren diese mit p16. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen den Bereich des Topol-SAPA (Abb. 4.8 A).

Auch der Graph zeigt, dass das rote Fluoreszenzsignal für p16 im Bereich des Topol-SAPA nicht mit dem grünen Fluoreszenzsignal für Topol überlappt (Abb. 4.8 a).

Das selbe Bild zeigt sich für NuMA. NuMA ist homogen im Nucleoplasma verteilt, nur im Bereich des Topol-SAPA ist keine Fluoreszenz zu sehen. Die vergrößerten Ausschnitte stellen den Bereich des Topol-SAPA dar und lassen keine Kolokalisation zwischen NuMA und Topol erkennen (Abb. 4.8 B, übereinandergelagerte Mikrographien). Die roten und grünen Fluoreszenzsignale überlappen nicht (Abb. 4.8 b).

RPA34 ist in seneszenten HDFs sehr schwach exprimiert. Es zeigt sich keine Kolokalisation des Antigens mit den Topol-SAPAs (Abb. 4.8 C, übereinandergelagerte Mikrographien und vergrößerte Ausschnitte). Der Graph des *linescans* zeigt keine Überlappung der roten und grünen Fluoreszenz (Abb. 4.8 c).

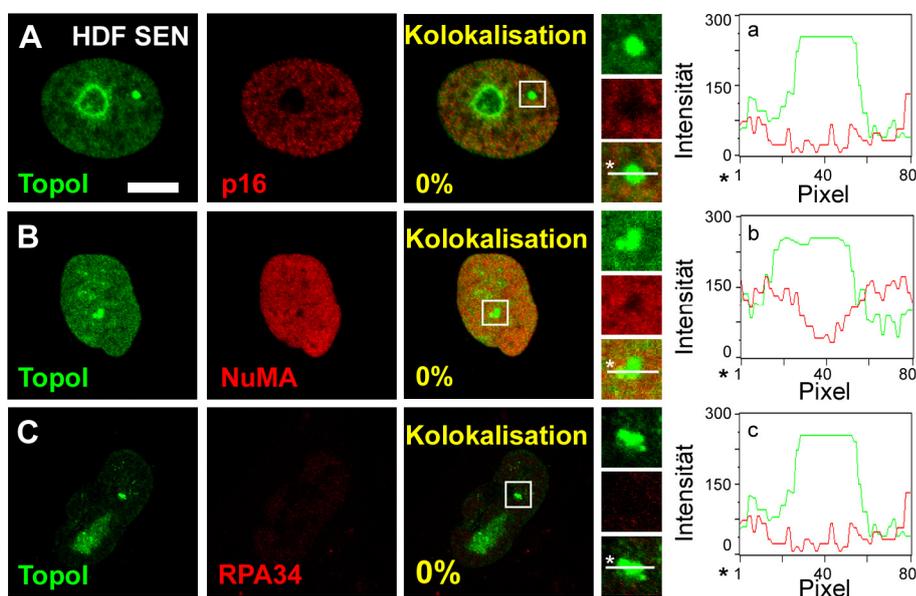


Abbildung 4.8: Proteine, die nicht in Topol-SAPAs lokalisiert sind

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von seneszenten HDFs, die gegen Topol (A-C, grün), p16 (A, rot), NuMA (B, rot) und RPA34 (C, rot) gefärbt wurden. In den übereinandergelagerten Bildern ist keine Kolokalisation zu sehen (0%, p16: n= 48, NuMA: n= 77, RPA34: n= 39). Die vergrößerten Ausschnitte zeigen den in den übereinandergelagerten Mikrographien markierten Bereich der Topol-SAPAs. Die Graphen stellen die Intensität der Pixel entlang der Linie, die durch den vergrößerten Ausschnitt gezogen wurde, dar. Auf der x-Achse sind die Pixel innerhalb der Linie und auf der y-Achse die Intensität aufgetragen. Der Startpunkt der *linescans* ist durch die Sterne markiert. Maßstab: 5µm

4.4 Analyse von NuMA in seneszenten WI-38 und HDFs

4.4.1 NuMA wird in seneszenten WI-38 und HDFs modifiziert

Im Folgenden wurde überprüft, ob sich die Expression von NuMA, welches nicht in SAPAs lokalisiert ist, im Verlauf der replikativen Seneszenz verändert.

Dafür wurde das Gesamtzelllysat junger, präseneszenten und seneszenten HDFs mittels SDS-PAGE analysiert. In Abbildung 4.9 ist die Expression von NuMA (~240 kD) während der replikativen Seneszenz zu sehen. NuMA ist in jungen HDFs exprimiert. Die Expression geht im Verlauf der Seneszenz zurück. In kurzen Expositionszeiten (Expo. 1) der lichtempfindlichen Filme ist oberhalb der 240 kD Bande für NuMA eine weitere Bande zu erkennen, die in längeren Expositionszeiten (Expo. 2) deutlich hervortritt (Stern).

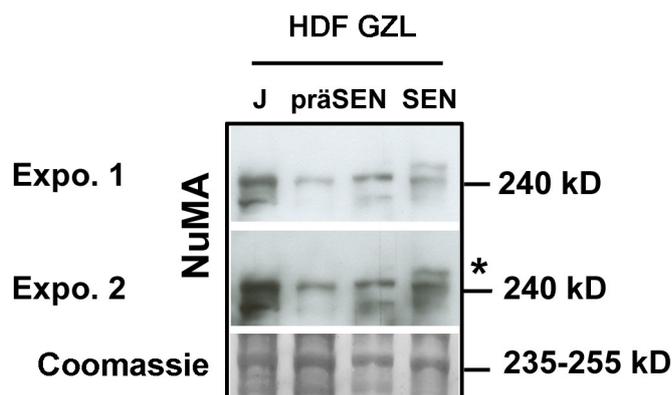


Abbildung 4.9: Die Expression von NuMA während der replikativen Seneszenz in HDFs

Gesamtzelllysat (GZL) von jungen (J), präseneszenten (präSEN) und seneszenten (SEN) HDFs wurde auf ein 7%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen NuMA (240 kiloDalton, kD) detektiert. In seneszenten HDFs erscheint eine zusätzliche Bande oberhalb der 240 kD Bande (Stern). Es sind zwei verschiedene Expositionszeiten der lichtempfindlichen Filme gezeigt (Expo. 1 und 2). Das Coomassie dient als Ladekontrolle (235- 255 kD).

Um zu untersuchen, ob die veränderte Expression von NuMA im Zusammenhang mit den SAPAs steht, wurde zum Vergleich die Expression von NuMA während der replikativen Seneszenz von WI-38 Zellen untersucht.

Dafür wurde das Gesamtzelllysat junger, präseneszenten und seneszenten WI-38 Zellen mittels SDS-PAGE analysiert. In Abbildung 4.10 ist die Expression von NuMA (~240 kD) während der replikativen Seneszenz in WI-38 Zellen zu sehen. Genau wie

in HDFs ist NuMA in jungen, proliferierenden WI-38 exprimiert. Die Expression geht dann im Verlauf der Seneszenz zurück. In kurzen Expositionszeiten (Expo. 1) der lichtempfindlichen Filme erscheint oberhalb der 240 kD Bande für NuMA eine weitere Bande, die in längeren Expositionszeiten (Expo. 2) deutlicher hervortritt (Stern).

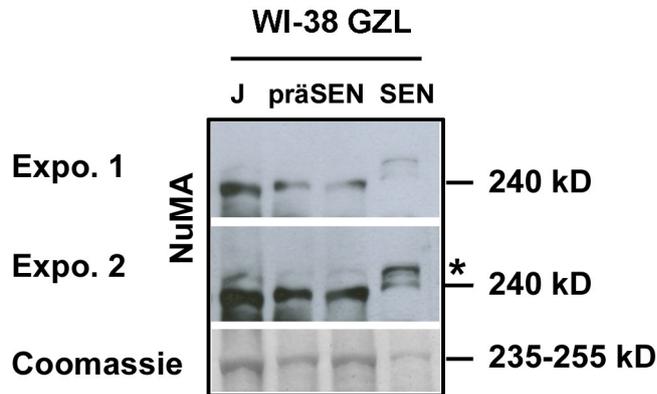


Abbildung 4.10: Die Expression von NuMA während der replikativen Seneszenz in WI-38

Gesamtzelllysate (GZL) von jungen (J), präseneszenten (präSEN) und seneszenten (SEN) WI-38 wurden auf ein 7%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen NuMA (240 kDa) detektiert. In seneszenten WI-38 erscheint eine zusätzliche Bande oberhalb der 240 kDa Bande (Stern). Es sind zwei verschiedene Expositionszeiten der lichtempfindlichen Filme gezeigt (Expo. 1 und 2). Das Coomassie dient als Ladekontrolle (235- 255 kDa).

Mit diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass NuMA sowohl in seneszenten HDFs als auch in seneszenten WI-38 modifiziert wird.

4.4.2 NuMA wird während der replikativen Seneszenz phosphoryliert

Da in zellulärer Seneszenz die Anzahl der DNA-Schadensorte zunimmt, wurde mit spezifischen Antikörpern getestet, ob es sich bei der Modifikation von NuMA in seneszenten HDFs und WI-38 um die Phosphorylierung von Serin 395 handelt. Es ist bekannt, dass NuMA in Antwort auf DNA-Schäden an Serin 395 phosphoryliert wird (Matsuoka et al. 2007, Stokes et al. 2007).

Dazu wurde Gesamtzelllysate von jungen, präseneszenten und seneszenten WI-38 und HDFs mittels SDS-PAGE untersucht. Die Membran wurde mit phosphospezifischen Antikörpern gegen NuMA (p-NuMA) detektiert. In jungen WI-38 und HDFs ist p-NuMA noch nicht exprimiert. Die Expression nimmt erst zum Ende der präseneszenten Phase zu und nimmt dann in seneszenten Zellen wieder etwas ab (Abb. 4.11). Das Coomassie dient als Ladekontrolle.

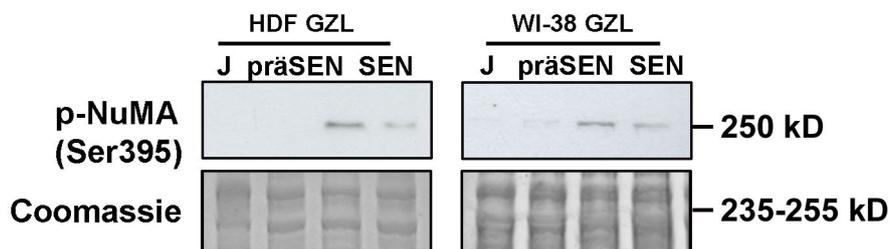


Abbildung 4.11: Die Expression von p-NuMA in HDFs und WI-38

Gesamtzelllysate (GZL) von jungen (J), präseneszenten (präSEN) und seneszenten (SEN) HDFs und WI-38 Zellen wurde auf ein 7%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit Antikörpern detektiert, die spezifisch an Serin 395 phosphoryliertes NuMA erkennen (p-NuMA (Ser395), 250 kD). Das Coomassie dient als Ladekontrolle (235- 255 kD).

Mit den phosphospezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass NuMA während der replikativen Seneszenz modifiziert wird, und dass es sich bei dieser Modifikation um die Phosphorylierung an Serin 395 handelt.

Um zu testen, ob sich die erhöhte Expression von p-NuMA in seneszenten Zellen mittels Immunofluoreszenzexperimenten bestätigen lassen, wurden junge und seneszente WI-38 und HDFs fixiert und mit den phosphospezifischen NuMA-Antikörpern gefärbt. Abbildung 4.12 (A-D) zeigt, dass p-NuMA in fokalen Bereichen des Zellkerns lokalisiert ist, die in seneszenten WI-38 und HDFs zunehmen. Da NuMA von der Proteinkinase ATM in Antwort auf DNA-Schäden phosphoryliert wird (Matsuoka et al. 2007; Stokes et al. 2007), wurden Doppelfärbungen von seneszenten HDFs mit Antikörpern gegen p-NuMA und ATM durchgeführt. In Abbildung 4.12 (E und e) ist dargestellt, dass p-NuMA und ATM kolokalisieren (Kolokalisation in gelb).

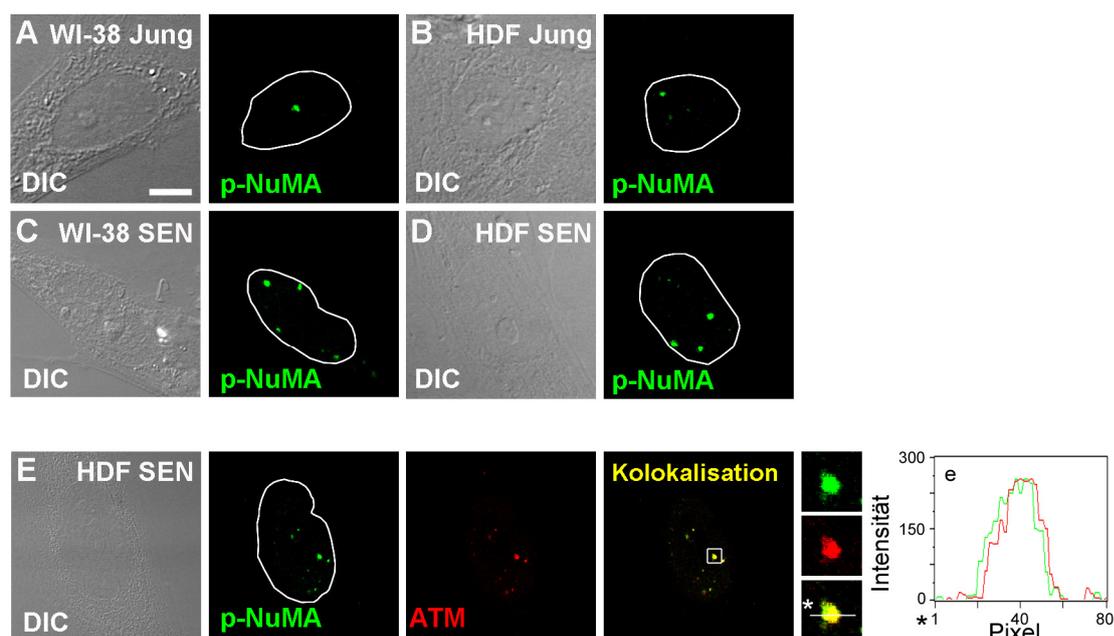


Abbildung 4.12: p-NuMA-Foci kolokalisieren mit der Proteinkinase ATM

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von jungen (A, B) und seneszenten (C, D, E) WI38 und HDFs, die gegen NuMA, phosphoryliert an Ser 395 (p-NuMA, grün, A-D), und gegen ATM (rot, E) gefärbt wurden. In den übereinandergelagerten Bildern in E ist die Kolokalisation in gelb zu sehen. Die vergrößerten Ausschnitte zeigen den Bereich eines p-NuMA-Focus. Der Graph stellt die Intensität der Pixel entlang der Linie, die durch den vergrößerten Ausschnitt gezogen wurde, dar. Auf der x-Achse sind die Pixel innerhalb der Linie und auf der y-Achse die Intensität aufgetragen. Der Startpunkt des *linescan* ist durch den Stern markiert. Maßstab: 5µm

4.4.3 Phospho-NuMA kolokalisiert mit γ H2AX

Ein Marker für DNA-Schadensorte, die durch DSBs ausgelöst wurden, ist das Histon H2A, das an Serin 139 phosphoryliert ist (γ H2AX). In Antwort auf DNA-Schäden bildet γ H2AX distinkte Foci im Nucleoplasma. Da diese Foci den p-NuMA-Foci ähneln und es in seneszenten Zellen vermehrt zu γ H2AX-Foci kommt (Passos et al. 2010, Wang et al. 2009, Nakamura et al. 2008), wurden Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen p-NuMA und γ H2AX von jungen und seneszenten WI-38 bzw. HDFs durchgeführt. WI-38 Zellen wurden als Positivkontrolle mit γ -Strahlung (15Gy) bestrahlt, um DNA-Schäden zu induzieren. HDFs wurden als Positivkontrolle mit Bleomycin (Bleo) behandelt, da sich durch Bleomycin distinktere DNA-Schadensfoci induzieren ließen, die besser ausgezählt werden konnten.

Die Auszählung der γ H2AX- und p-NuMA-Foci ergab, dass junge WI-38 Zellen im Durchschnitt $0,4 \pm 0,17$ γ H2AX- und $0,87 \pm 0,43$ p-NuMA-Foci pro Zellkern aufweisen (Abb. 4.13 A). Diese Anzahl steigt in seneszenten Zellen auf $2,37 \pm 0,33$ für γ H2AX

($p= 0,0039$) und $2,95 \pm 0,79$ für p-NuMA ($p= 0,003$; Abb. 4.13 B) an. Auch in der Positivkontrolle (1h15Gy) nimmt sowohl die Anzahl der γ H2AX-Foci ($32,76 \pm 1,65$ /Zellkern, $p= 0,00113$) als auch der p-NuMA-Foci ($19,4 \pm 2,7$ /Zellkern, $p= 0,00013$) nach gezielter Induktion von DNA-Schäden signifikant zu (Abb. 4.13 C).

In HDFs ergibt sich ein ähnliches Bild. In jungen, DMSO-behandelten Zellen (Negativkontrolle für Bleomycin) sind $0,35 \pm 0,07$ γ H2AX-Foci und $0,48 \pm 0,18$ p-NuMA zu sehen (Abb. 4.13 D). In seneszenten Zellen steigt die Anzahl der Foci sowohl für γ H2AX ($2,69 \pm 0,48$ Foci/Zellkern, $p= 0,00192$) als auch für p-NuMA ($3,24 \pm 0,5$ Foci/Zellkern, $p= 0,00092$) signifikant an (Abb. 4.13 E). In den Bleomycin-behandelten Zellen geht die Anzahl der γ H2AX-Foci ($5,35 \pm 1,67$; $p= 0,02$) und der p-NuMA-Foci ($5,73 \pm 2,81$; $p= 0,046$) ebenfalls signifikant nach oben (Abb. 4.13 F).

In den übereinandergelagerten Bildern und den vergrößerten Ausschnitten ist zu sehen, dass in allen Gruppen (Jung, SEN, 1h15Gy und 1hBleo) die meisten γ H2AX-Foci mit p-NuMA-Foci kolokalisieren (Abb. 4.13 A-F, Kolokalisation).

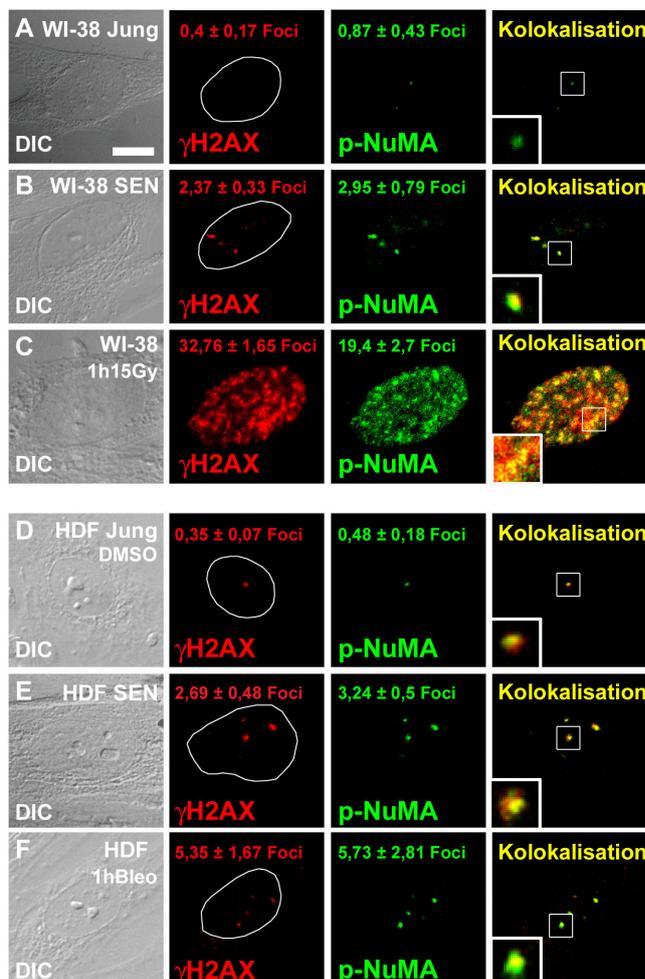


Abbildung 4.13: p-NuMA kolokalisiert mit γ H2AX

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von jungen, seneszenten und mit 15Gy bestrahlten WI-38 (A-C) bzw. jungen, seneszenten und mit 10 μ g/ml Bleomycin behandelten HDFs (D-F), die gegen γ H2AX (rot) und Antikörpern gegen p-NuMA (grün) gefärbt wurden. Die übereinandergelagerten Bilder und die vergrößerten Ausschnitte zeigen die Kolokalisation der beiden Antigene (Kolokalisation in gelb). Die Anzahl der γ H2AX- bzw. p-NuMA-Foci wurde von Zellen dreier unabhängigen Experimente gezählt (WI38: young n= 192, SEN n= 121, 1h15Gy n= 186; HDF: DMSO n= 187, SEN n= 155, 1hBleo n= 169). Die Zahlenwerte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Maßstab: 5 μ m

p-NuMA-Foci lokalisieren an den selben Orten im Nucleoplasma wie γ H2AX-Foci und ihre Anzahl steigt genau wie die von γ H2AX-Foci in seneszenten Zellen an. Zudem können sie, wie γ H2AX-Foci, gezielt durch DNA-Schäden induziert werden.

4.5 SAPAs sind mit DNA-Schadensorten assoziiert

4.5.1 SAPAs sind mit p-NuMA- und γ H2AX-Foci benachbart

Um zu untersuchen, wie sich Topol-SAPAs in bezug auf DNA-Schadensorte verhalten, wurden junge und seneszente HDFs mit Antikörpern gegen Topol, γ H2AX und p-NuMA gefärbt.

In jungen HDFs bilden sich vereinzelt γ H2AX- und p-NuMA-Foci, die miteinander kolokalisieren. Topol zeigt nur eine Färbung in den Nucleolen und kolokalisiert nicht mit γ H2AX- oder p-NuMA. Zur übersichtlicheren Darstellung wurde der Bildausschnitt in Abbildung 4.14 A, der den DNA-Schadensfokus zeigt, vergrößert über Pixelwiederholungen dargestellt (Vergrößerung). Auch in der Vergrößerung ist keine Kolokalisation zwischen Topol und γ H2AX- oder p-NuMA in jungen HDFs zu sehen (Abb. 4.14 A). Die Kolokalisation des p-NuMA-Focus mit dem γ H2AX-Focus ist durch die Überlappung der roten und grünen Fluoreszenz im Graphen des *linescans* dargestellt. Die blaue Fluoreszenz für Topol ist nicht mit dem DNA-Schadensfokus assoziiert (Abb. 4.14 a).

In seneszenten Zellen ist Topol in den Nucleolen lokalisiert. Ein Topol-SAPA befindet sich in der Nähe der Nucleolen im Nucleoplasma. In der Vergrößerung ist der Bereich mit dem Topol-SAPA vergrößert dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass sich der Topol-SAPA in unmittelbarer Nähe zu den γ H2AX- und p-NuMA-Foci befindet (Abb.4.14 B, Kolokalisation, Vergrößerung).

Im Graphen des *linescans* ist die Kolokalisation des p-NuMA-Focus mit dem γ H2AX-Focus durch die Überlappung der roten und grünen Fluoreszenz dargestellt. Die Linie für die blaue Fluoreszenz des Topol-SAPA ist zu der roten und grünen Fluoreszenz benachbart (Abb. 4.14 b).

Die genaue Position der Topol-SAPAs zu den p-NuMA- und γ H2AX-Foci wurde durch Ausmessen bestimmt. Das Diagramm in Abbildung 4.14 C zeigt das Ergebnis der Ausmessung von jeweils ~ 50 Zellen dreier unabhängiger Experimente. Etwa 45% der γ H2AX- und p-NuMA-Foci sind mit Topol-SAPAs entweder kolokalisiert, partiell kolokalisiert oder befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Topol-SAPAs. Etwa 60% der γ H2AX- und p-NuMA-Foci sind unabhängig von SAPAs im Nucleoplasma positioniert (Abstand $\geq 1\mu\text{m}$, Abb. 4.14 C).

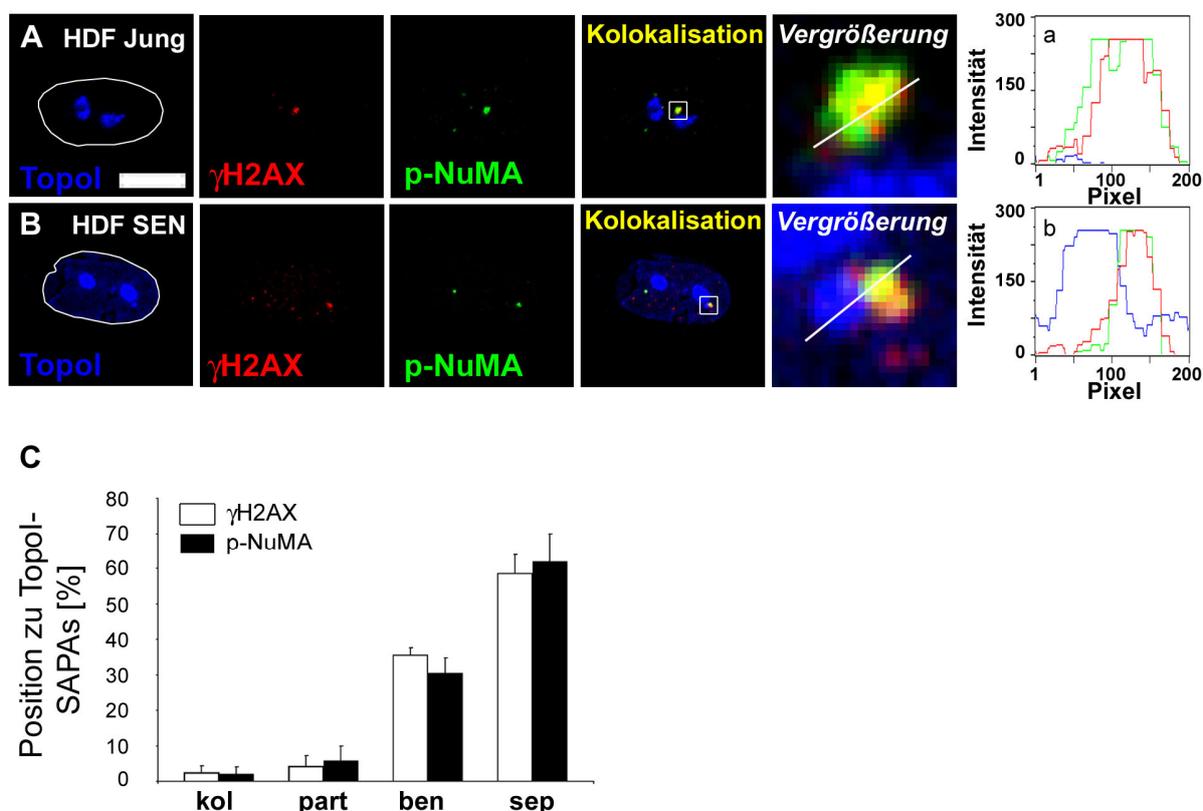


Abbildung 4.14: Topol-SAPAs befinden sich in Nachbarschaft zu DNA-Schadensorten

Repräsentative konfokale Immunfluoreszenzaufnahmen von jungen (A) und seneszenten (B) HDFs, die gegen Topol (blau), γ H2AX (rot) und p-NuMA (grün) gefärbt wurden. Im Anschluss folgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern, die jeweils Cy5-, Rhodamin- und FITC-gekoppelt waren. Da Cy5 und Rhodamin beide rotes Licht emittieren, wurde für Rhodamin die Falschfarbe blau verwendet. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die Bildausschnitte der übereinandergelagerten Bilder (Kolokalisation), die die DNA-Schadensorte zeigen, vergrößert über Pixelwiederholungen dargestellt (Vergrößerung). Der Graph stellt die Intensität der Pixel entlang der Linie, die durch die Vergrößerungen gezogen wurde, dar. Auf der x-Achse sind die Pixel innerhalb der Linie und auf der y-Achse die Intensität aufgetragen. γ H2AX- und p-NuMA-Foci kolokalisieren und sind in seneszenten HDFs zu $\sim 2\%$ kolokalisiert (kol), $\sim 5\%$ partiell kolokalisiert (part), 35% zu den SAPAs benachbart (ben) und zu $\sim 60\%$ separiert (sep, Abstand $\geq 1\mu\text{m}$; Diagramm C) Das Diagramm zeigt die Mittelwerte + Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten (HDF SEN: n= 155 Zellen). Maßstab: $5\mu\text{m}$.

4.5.2 Kovalente Topol-DNA-Komplexe nehmen in seneszenten HDFs zu

Um herauszufinden, ob die enge Nachbarschaft der γ H2AX- und p-NuMA-Foci ein Hinweis dafür ist, dass es sich bei den Topol-SAPAs um DNA-Schadensorte handelt, wurde ein *in vivo* complex of enzyme (ICE)-bioassay durchgeführt. Mit diesem Assay können die kovalenten Komplexe, die Topol bei der DNA-Synthese und Transkription mit der DNA eingeht, detektiert werden.

Dafür wurde aus jungen HDFs, die mit DMSO (Negativkontrolle) und CPT behandelt wurden, und seneszenten HDFs die DNA mittels Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradienten isoliert. Die CsCl-Fractionen 6 bis 13 wurden mittels Slot-Blot-Apparat auf eine Nitrocellulosemembran appliziert. Die DNA befand sich ihrer Dichte entsprechend in den CsCl-Fractionen 9 und 10 (Dichte: 1.72 g/ml). Anschließend wurde die Membran mit Antikörpern gegen Topol detektiert. Die Stärke des Topol-Signals korreliert mit der Anzahl der kovalenten Topol-DNA-Komplexe.

In den DMSO behandelten, jungen HDFs ist in allen CsCl-Fractionen ein schwaches Signal für Topol zu erkennen, in den CsCl-Fractionen 9 und 10 ist es etwas erhöht (Abb. 4.15 A DMSO).

CPT diente als Positivkontrolle, da es als spezifischer Inhibitor der Topol die kovalenten Topol-DNA-Komplexe stabilisiert. In den CPT behandelten Zellen nimmt die Intensität des Topol-Signals in den CsCl-Fractionen 9 und 10 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle deutlich zu (Abb. 4.15 A, 1h 50 μ M CPT). Auch die seneszenten Zellen zeigen in den CsCl-Fractionen 9 und 10 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine Zunahme des Topol-Signals (Abb. 4.15 A, HDF SEN).

Die Intensität des Topol-Signals in den CsCl-Fractionen 9 und 10 wurde densitometrisch ausgewertet. Das Signal in der DMSO-Kontrolle wurde auf 1 normalisiert, um das basale Level an natürlich vorkommenden Topol-DNA-Komplexen in proliferierenden Zellen zu berücksichtigen (Abb. 4.15 B, weiße Balken). Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle steigt das Topol-Signal in CPT behandelten Zellen in der CsCl-Fraktion 9 signifikant um ein 4,2 faches ($p= 0,0083$) und in der CsCl-Fraktion 10 um ein 4,8 faches an ($p= 0,0069$, Abb. 4.15 B, graue Balken).

Die densitometrische Auswertung des Topol-Signals bei seneszenten Zellen zeigt eine signifikante Erhöhung um das 1,6 fache ($p= 0,0487$) in der CsCl-Fraktion 9 und

das 1,8 fache ($p = 0,0369$) in der CsCl-Fraktion 10 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 4.15 B, schwarze Balken).

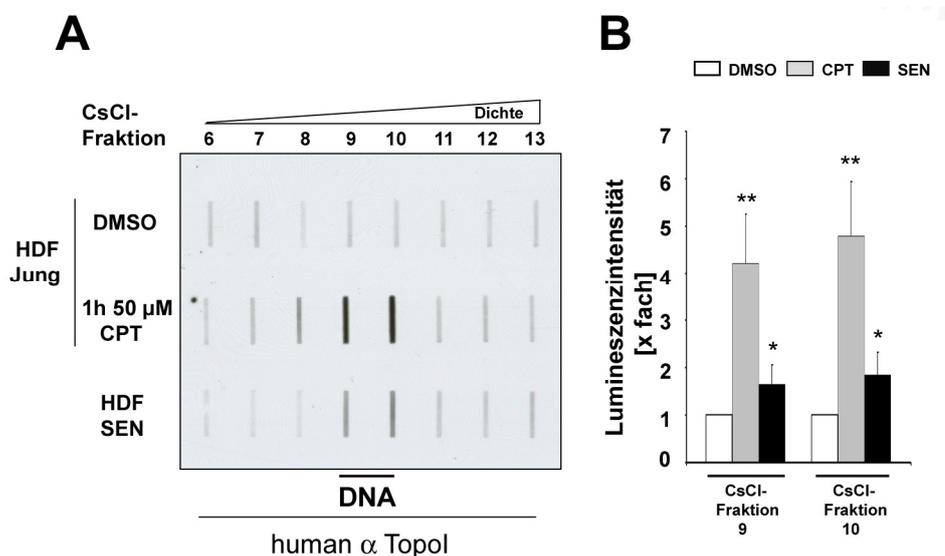


Abbildung 4.15: In seneszenten HDFs ist die Anzahl kovalenter TopoII-DNA-Komplexe erhöht
 DMSO behandelte, junge Kontrollzellen, für 1 h mit 50 μ M Camptothecin (CPT) behandelte HDFs und seneszente HDFs (SEN) wurden lysiert und auf einen Cäsiumchlorid(CsCl)-Dichtegradienten gegeben. Nach der Zentrifugation wurden die DNA-enthaltenden Fraktionen (9 und 10) mittels NanoDrop spectrophotometrisch ermittelt und die CsCl-Fraktionen 6-13 auf eine Nitrozellulosemembran appliziert. Anschließend wurde die Membran mit einem humanen Serum gegen TopoII detektiert (A). Das Diagramm in B zeigt die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwerte + Standardabweichungen, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Mit dem ICE-bioassay konnte gezeigt werden, dass die Anzahl stabilisierter kovalenter TopoII-DNA-Komplexe in seneszenten HDFs im Vergleich zu jungen HDFs signifikant erhöht ist.

4.6 Die Rolle des UPS in der replikativen Seneszenz

4.6.1 Die Lokalisation der 20S Proteasomen in seneszenten WI-38 und HDFs

Für die Proteinhomeostase der Zelle spielt das UPS eine zentrale Rolle. Um zu untersuchen, ob die Veränderungen der nucleären Struktur durch SAHFs in WI-38 und SAPAs in HDFs einen Einfluss auf die Proteinhomeostase alternder Zellen haben, wurde zunächst die Lokalisation des 20S Proteasoms in seneszenten Zellen untersucht. Dafür wurden Doppelfärbungen in seneszenten WI-38 und HDFs gegen

Topol und Antikörpern, die die α -UE 5 und 7, und die β -UE 1, 5, 5i und 7 des 20S Proteasoms erkennen, durchgeführt.

In seneszenten WI-38 bilden sich SAHFs, die sich mit Topol anfärben lassen und über das gesamte Nucleoplasma verteilt sind. Die UE des 20S Proteasoms sind um die SAHFs lokalisiert, die SAHFs selber sind ausgespart. In dem übereinandergelagerten Bild ist deutlich zu sehen, dass Topol und 20S Proteasomen nicht an denselben Orten im Zellkern lokalisiert sind (0% Kolokalisation, Abb. 4.16 A). Die Graphen der Fluoreszenzintensitäten pro Pixel (*linescan*, Abb. 4.16 a) für Topol und 20S UE verlaufen antiparallel.

Im Gegensatz dazu bilden sich in seneszenten HDFs Topol-SAPAs, in denen die 20S UE lokalisiert sind. In 100% der Zellen mit Topol-SAPAs konnte eine Kolokalisation festgestellt werden, jedoch kolokalisieren die 20S UE nicht zu 100% in den SAPAs. Es gibt auch Bereiche, in denen sie unabhängig von Topol-SAPAs in aggregatähnlichen Strukturen vorliegen (Abb. 4.16 B, b roter Pfeil).

Im Graphen vom *linescan* ist zu erkennen, dass das grüne Fluoreszenzsignal im Bereich der Topol-SAPAs mit dem roten Fluoreszenzsignal (UE des 20S Proteasoms) überlappt (Abb. 4.16 b).

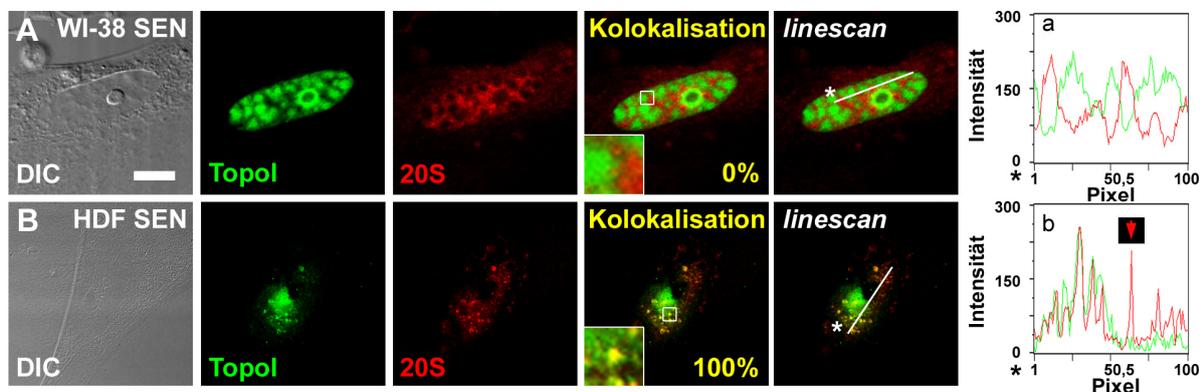


Abbildung 4.16: Die nucleäre Lokalisation von 20S Proteasomen in seneszenten WI-38 und HDFs

Indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen seneszenten WI-38 (A) und HDFs (B), die mit Antikörpern gegen Topol (grün) und Antikörpern, die die α -Untereinheiten 5 und 7, und die β -Untereinheiten 1, 5, 5i und 7 des 20S Proteasoms (rot) erkennen, gefärbt wurden. In den übereinandergelagerten Mikrographien ist die Kolokalisation in gelb zu sehen (0% in WI-38, n= 178 und 100% in HDFs, n= 98) Es wurden nur Zellen mit SAHFs bzw. SAPAs quantifiziert. Die *linescans* stellen die Intensitäten der Pixel entlang der eingezeichneten Linie als Graph dar (a und b). Auf der x-Achse sind die Pixel innerhalb der Linie und auf der y-Achse ist die Intensität aufgetragen. In b ist ein Peak des roten Fluoreszenzsignals, der nicht mit dem grünen Fluoreszenzsignal überlappt (roter Pfeil). Die Sterne zeigen die Startpunkte der *linescans* an. Maßstab: 5 μ m.

4.6.2 Die nucleäre proteasomale Aktivität in WI-38 und HDFs

Zur Beantwortung der Frage, wie funktionell das UPS in seneszenten WI-38 und HDFs ist, wurden junge und seneszente WI-38 und HDFs biochemisch fraktioniert. Anschließend wurde ein proteasomaler Aktivitätsassay (PAA) mit der cytoplasmatischen und nucleären Fraktion durchgeführt.

Dazu wurden die Fraktionen mit dem Proteasomensubstrat Suc-LLVY-AMC 16 h bei 37 °C inkubiert. Das Substrat Suc-LLVY-AMC ist spezifisch für die chymotryptische Aktivität des 20S Proteasoms. Wird es proteolytisch von diesem degradiert, wird das Fluorochrom AMC frei. Die Fluoreszenz kann mittels eines Fluorometers bestimmt werden und gibt die Aktivität des Proteasoms wider.

In Abbildung 4.17 ist die nucleäre chymotryptische Aktivität von jungen und seneszenten WI-38 (Abb. 4.17 A) und HDFs (Abb. 4.17 B) als Fluoreszenzintensität gegen die Zeit in einer Produktkurve dargestellt.

In WI-38 steigt die proteasomale Aktivität in jungen und seneszenten Zellen in den ersten 40 min zunächst parallel an. Danach steigt die Aktivität seneszenter Zellen im Vergleich zu jungen Zellen an und ist nach 16 h signifikant um 50% erhöht ($p=0,0097$). In den Proben, in denen der spezifische Proteasomeninhibitor Lactacystin als Negativkontrolle zugegeben wurde, wurde die proteasomale Aktivität gestoppt (Pfeil) (Abb. 4.17 A), das heißt, dass der Anstieg der Produktkurve spezifisch für die proteasomale Aktivität ist.

Die Reinheit der Fraktionen wurde anhand der Markerproteine Calnexin und U1-70k sichergestellt. Calnexin ist ein Protein, das im Endoplasmatischen Retikulum im Cytoplasma lokalisiert ist, und U1-70k ist ein nucleäres Protein. Die Ergebnisse des Immunoblots zeigen, dass sich sowohl in jungen (J) als auch in seneszenten (S) WI-38 Calnexin ausschließlich in der cytoplasmatischen (Cy) und U1-70k ausschließlich in der nucleären (Nu) Fraktion befindet (Abb. 4.17 A Immunoblots oberhalb der Diagramme).

In HDF steigt die proteasomale Aktivität in jungen und seneszenten Zellen in den ersten 80 min zunächst parallel an. Danach steigt die Aktivität seneszenter Zellen im Vergleich zu jungen Zellen an und ist nach 16 h signifikant um 40% erhöht ($p=0,0081$).

Auch bei den HDFs wurde die Reinheit der Fraktionen anhand des cytoplasmatischen Proteins Calnexin und des nucleären Proteins U1-70k sichergestellt (Abb. 4.17 B Immunoblots oberhalb der Diagramme).

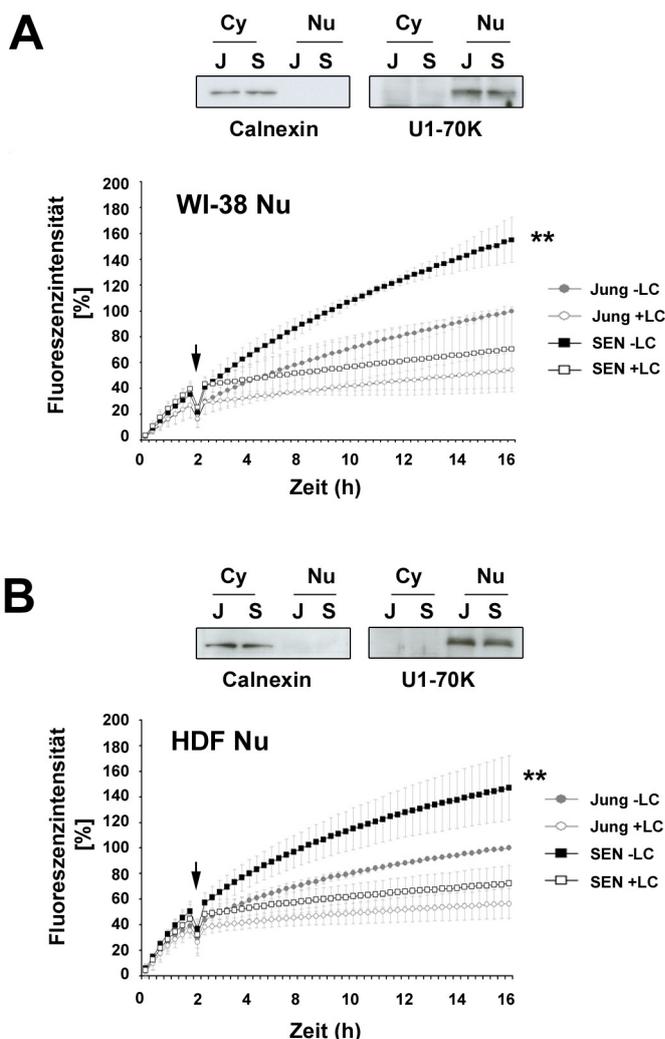


Abbildung 4.17: Die nucleäre proteasomale Aktivität seneszenten WI-38 und HDFs

Junge und seneszente WI-38 und HDFs wurden biochemisch fraktioniert und die proteasomale Aktivität der Fraktionen untersucht. Die Reinheit der Fraktionierung wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen Calnexin (Komponente des Endoplasmatischen Retikulums) und gegen U1-70K (nucleäres Protein) sichergestellt.

In A ist die nucleäre proteasomale Aktivität von WI-38 Zellen (WI-3 Nu) und in B die nucleäre proteasomale Aktivität von HDFs (HDF Nu) über einen Zeitraum von 16 h als Fluoreszenzintensität gegen die Zeit in einer Produktkurve dargestellt. Nach 2 h (Pfeil) wurde zu einem Teil der Probe der spezifische Proteasomeninhibitor Lactacystin (LC) gegeben, um die Spezifität der Messung zu kontrollieren. Die Zahlenwerte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit $**p < 0,01$.

4.6.3 Die cytoplasmatische proteasomale Aktivität in WI-38 und HDFs

Die Untersuchung der cytoplasmatischen proteasomalen Aktivität ergibt Unterschiede zwischen WI-38 und HDFs.

In WI-38 steigt die cytoplasmatische proteasomale Aktivität in jungen und seneszenten Zellen in den ersten 2 h zunächst parallel an. Danach steigt die Aktivität seneszenter Zellen im Vergleich zu jungen Zellen an und ist nach 16 h um 20% erhöht. Dieser Anstieg ist jedoch nicht signifikant (Abb 4.18 A).

In HDFs steigt die proteasomale Aktivität in jungen und seneszenten Zellen in den ersten 2 h auch zunächst parallel an. Danach nimmt sie jedoch im Gegensatz zu seneszenten WI-38 im Vergleich zu jungen Zellen ab und ist nach 16 h signifikant um 20% reduziert ($p=0,044$, Abb. 4.18 B).

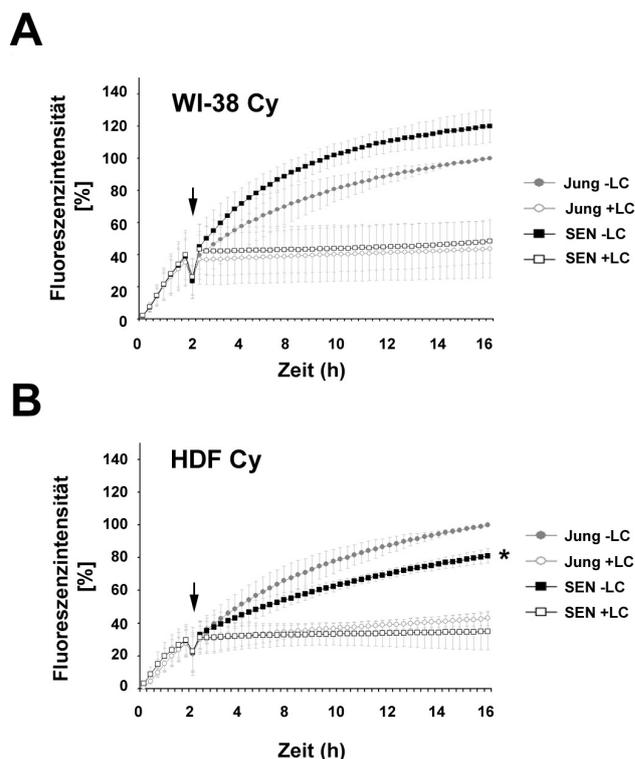


Abbildung 4.18: Die cytoplasmatische proteasomale Aktivität in seneszenten WI-38 und HDFs

In A ist die cytoplasmatische proteasomale Aktivität von WI-38 Zellen (WI-38 Cy) und in B die cytoplasmatische proteasomale Aktivität von HDFs (HDF Cy) über einen Zeitraum von 16 h in einer Produktkurve dargestellt. Nach 2 h (Pfeil) wurde der spezifische Proteasomeninhibitor Lactacystin (LC) zugegeben. Die Zahlenwerte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit $*p<0,05$

Mit der Messung der proteasomalen Aktivität, konnte gezeigt werden, dass die SAHFs bzw. SAPAs nicht zu einer Abnahme der nucleären Aktivität führen.

4.6.4 Die Expression proteasomaler Untereinheiten in WI-38 und HDFs

Um zu analysieren, ob die gesteigerte Aktivität des nucleären UPS mit einer Zunahme proteasomaler UE zusammenhängt, wurde die Expression der proteasomalen α -UE 1, 2, 3, 5, 6 und 7 im Gesamtzelllysat junger, präseneszenten und seneszenten WI-38 und HDFs mittels SDS-PAGE analysiert.

In WI-38 Zellen bleibt die Expression der 20S α -UE in jungen und präseneszenten Zellen gleich. In seneszenten Zellen steigt die Expression der 20S α -UE im Vergleich zur Ladekontrolle (α -Tubulin) etwas an (Abb. 4.19 A).

Im Gegensatz dazu zeigen HDFs keine Veränderungen der Expression der 20S α -UE im Vergleich zur Ladekontrolle (α -Tubulin) während der replikativen Seneszenz (Abb. 4.19 B).

Da sich die proteasomale Aktivität im Nucleoplasma seneszenten HDFs von der Aktivität im Cytoplasma unterscheidet, wurden die im PAA eingesetzten Fraktionen (Cytoplasma und Nucleoplasma) zusätzlich mittels SDS-PAGE analysiert.

Die Expression der 20S α -UE in jungen (J) und in seneszenten (S) WI-38 und HDFs bleibt sowohl im Cytoplasma (Cy) als auch im Nucleoplasma (Nu) unverändert (Abb. 4.19 C, E).

Für die densitometrische Auswertung wurde das Lumineszenzsignal der Immunoblot-Filme mit dem Lumineszenzsignal des Coomassies normalisiert. Die densitometrische Auswertung zeigt weder für die cytoplasmatischen (Cy), noch für die nucleoplasmatischen (Nu) Fraktionen einen signifikanten Unterschied in der Expression der 20S α -UE zwischen jungen (J) und seneszenten (S) WI-38 und HDFs (Abb. 4.19 D, F). Für die Normalisierung wurde nur der mit dem schwarzen Kasten markierte Bereich des Coomassies verwendet, da sich in diesem Bereich die Intensität der Proteinbanden zwischen jungen und seneszenten Zellen nicht unterscheidet. Im unteren Bereich des Coomassies, bei etwa 15 kD, verändert sich die Intensität der Histonbanden in der nucleären Fraktion. Diese nimmt in seneszenten Zellen deutlich ab (Abb. 4.19 C und E, Histone).

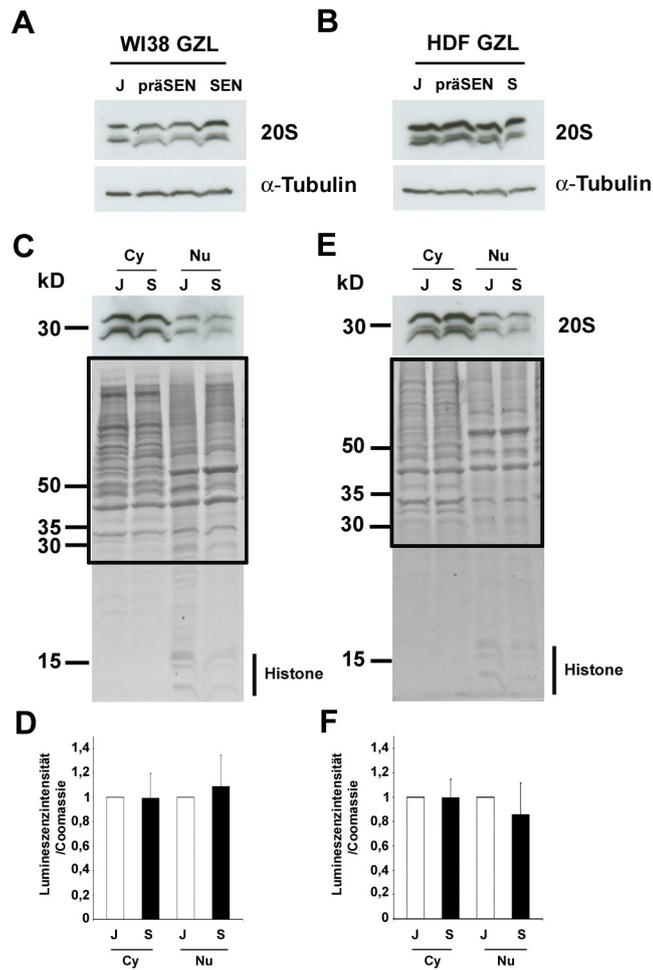


Abbildung 4.19: Die Expression proteasomaler α -Untereinheiten in WI-38 und HDFs

Das Gesamtzelllysate (GZL) junger (J), präseneszenten (präSEN) und seneszenten (SEN) WI-38 (A) und HDFs (B), bzw. die cytoplasmatischen (Cy) und nucleoplasmatischen (Nu) Fraktionen junger (J) und seneszenten (S) Zellen vom PAA (C, WI-38; E, HDFs) wurden auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die α -UE 1, 2, 3, 5, 6 und 7 des 20S Proteasoms (~30 kD) detektiert. α -Tubulin dient beim GZL als Ladekontrolle. Das Coomassie wurde für die Normalisierung der Werte für die densitometrische Auswertung (D und F) der Immunoblotbanden in C und F herangezogen (nur der mit dem schwarzen Kasten markierte Bereich, ~ 30- 100 kD). Histone befinden sich nur in den nucleoplasmatischen Fraktionen (C und E). Die Diagramme zeigen die Mittelwerte + Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten (D und F).

4.7 Analyse des UPS in Zellen ohne SAHFs und SAPAs

4.7.1 Expression von Seneszenzmarkern in HFFs

Zur Beantwortung der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Erhöhung der nucleären proteasomalen Aktivität und der Organisation des seneszenten Zellkerns in SAHFs bei WI-38 Zellen bzw. SAPAs in HDFs besteht, wurden seneszente Fibroblasten untersucht, die weder SAHFs noch SAPAs während der replikativen Seneszenz ausbilden.

Dazu wurden humane Vorhautfibroblasten (*engl. Human Foreskin Fibroblasts*, HFF) zunächst auf die Seneszenzmarker β -Galaktosidaseaktivität, p21 und p16 untersucht.

Abbildung 4.20 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchung. Für die Quantifikation der Zellen, die eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität aufweisen, wurden von drei unabhängigen Experimenten etwa 100 Zellen direkt am Mikroskop ausgezählt. 1,14% \pm 0,63% der jungen HFFs und 80,33% \pm 6,5% der seneszenten HFFs zeigen eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität bei einem pH-Wert von 6 (Abb. 4.20 A).

In Abbildung 4.20 (B) ist die Expression von p21 und p16 im Gesamtzelllysat junger, präseneszenten und seneszenten HFF dargestellt. p21 ist in jungen Zellen kaum exprimiert und nimmt dann in präseneszenten und seneszenten Zellen zu. p16 ist in jungen Zellen minimal exprimiert und akkumuliert in seneszenten Zellen. Die Ladekontrolle (Ausschnitt vom SDS-Gel, gefärbt mit Coomassie) bleibt unverändert (Abb. 4.20 B).

Um sicherzustellen, dass seneszente HFFs weder SAHFs noch SAPAs bilden, wurden junge und seneszente HFFs mit Antikörpern gegen Topol und HP1 γ gefärbt. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen in jungen und seneszenten HFFs ein ähnliches Muster. Topol ist im Nucleoplasma homogen verteilt und lokalisiert in den Nucleolen. HP1 γ ist in jungen Zellen homogen im Nucleoplasma lokalisiert und zeigt vereinzelt, feine helle Foci, die über das gesamte Nucleoplasma verteilt sind. Die übereinandergelagerten Mikrographien zeigen keine Kolo-kalisation zwischen Topol und HP1 γ in jungen HFFs (Abb. 4.20 C).

Auch in seneszenten HFFs ist Topol homogen im Nucleoplasma verteilt und im Nucleolus lokalisiert. HP1 γ wird im Vergleich zu jungen HFFs schwächer und homogener. In den übereinandergelagerten Mikrographien ist keine Kolokalisation zwischen Topol und HP1 γ zu sehen, es bilden sich in seneszenten HFFs weder SAHFs noch SAPAs (Abb. 4.20 C).

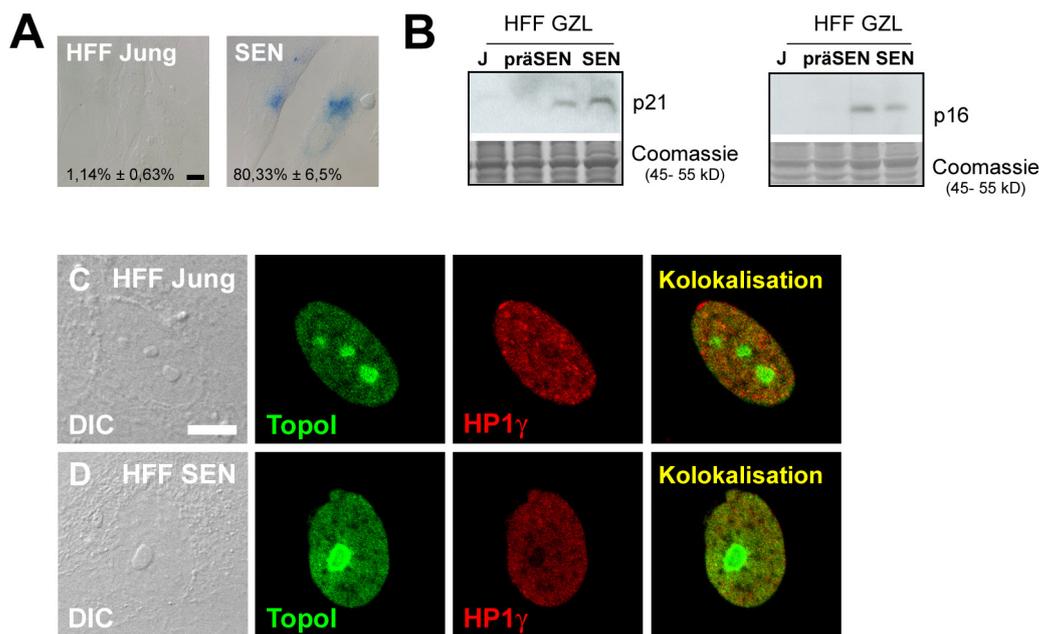


Abbildung 4.20: Analyse von Seneszenzmarkern in HFFs

Junge und seneszente (SEN) HFF (A) wurden histochemisch für β -Galaktosidaseaktivität bei pH 6 gefärbt. Zellen, die β -Galaktosidaseaktivität bei pH 6 zeigen, erscheinen blau und sind seneszent. Die Zahlenwerte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten ($n = \sim 300$). Maßstab: 10 μ m. In B ist die Expression der Seneszenzmarker p21 und p16 im Gesamtzelllysat (GZL) von jungen (J), präseneszenten (präSEN) und seneszenten (SEN) HFF gezeigt. Das Coomassie (45-55 kD) dient als Ladekontrolle. Die konfokalen Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen junge (C) und seneszente (D) HFFs, die mit Antikörpern gegen Topol (grün) und HP1 γ (rot) gefärbt wurden. Maßstab 5 μ m

4.7.2 Die Proteasomale Aktivität und Expression proteasomaler Untereinheiten in HFFs

Um die proteasomale Aktivität junger und seneszenten HFF zu ermitteln, wurden sie wie WI-38 Zellen und HDFs fraktioniert (3.14 und 4.4.1) und mit einem PAA untersucht.

Die nucleäre proteasomale Aktivität seneszenten HFFs steigt direkt zu Beginn der Messung schneller an als die von jungen HFFs. Dieser Anstieg geht kontinuierlich weiter und steigt im Vergleich zu jungen Zellen nach 16 h signifikant um 100% an ($p =$

0,0012). In den Proben, in denen der spezifische Proteasomeninhibitor Lactacystin als Negativkontrolle zugegeben wurde, konnte die proteasomale Aktivität gestoppt werden (Pfeil) (Abbildung 4.21 A).

Die Reinheit der Fraktionen wurde anhand der Markerproteine Calnexin und U1-70k sichergestellt. Calnexin ist ausschließlich in der cytoplasmatischen (Cy) und U1-70k ausschließlich in der nucleären (Nu) Fraktion lokalisiert (Abb. 4.21 A Immunoblots oberhalb der Diagramme).

Die cytoplasmatische proteasomale Aktivität steigt in jungen und seneszenten HFFs die ersten 60 min zunächst parallel an. Danach steigt die Aktivität seneszenter Zellen im Vergleich zu jungen Zellen an und ist nach 16 h signifikant um ~30% erhöht ($p=0,0283$; Abb. 4.21 B).

Die Expression der 20S α -UE in jungen (J) und seneszenten (S) HFFs bleibt im Cytoplasma (Cy) unverändert. Im Gegensatz dazu kommt es zu einer signifikanten Abnahme ($p=0,0377$) der Expression im Nucleoplasma (Nu) von seneszenten HFFs (Abb. 4.21 C, D).

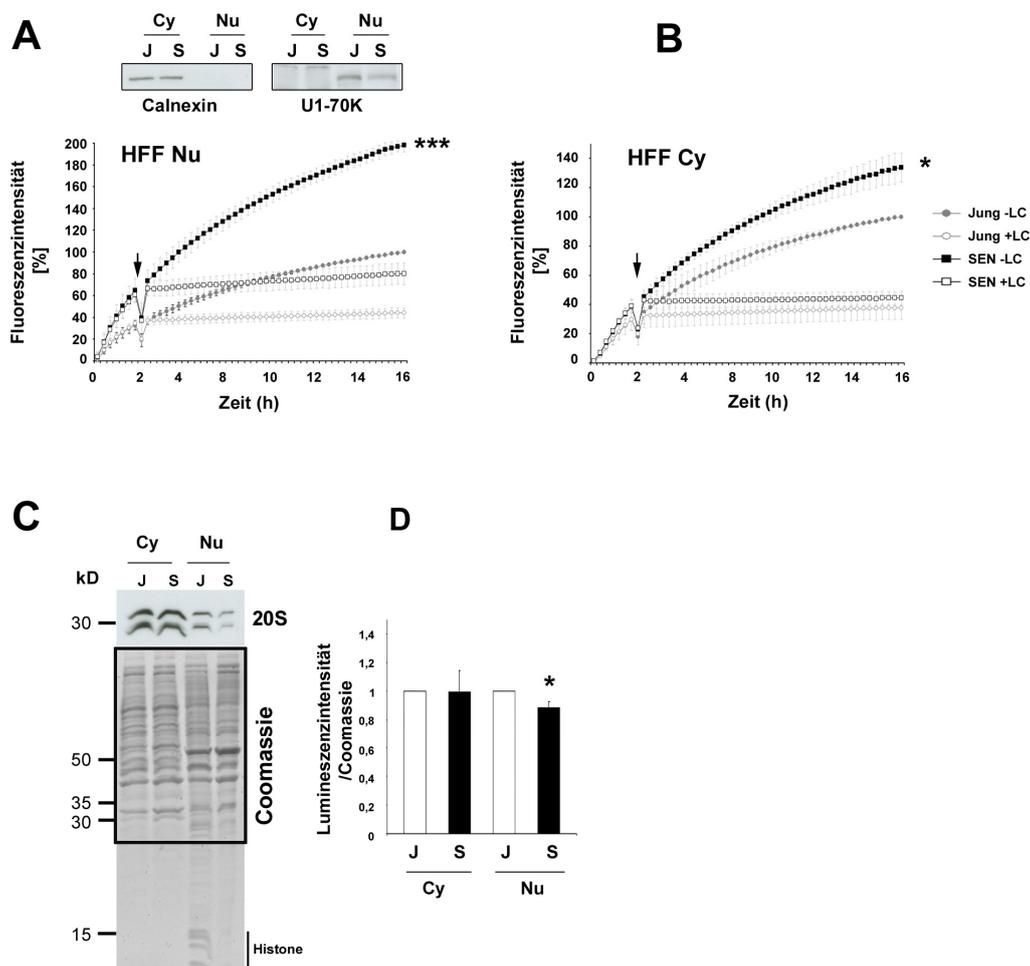


Abbildung 4.21: Die proteasomale Aktivität und Expression proteasomaler α -UE in HFFs

Junge und seneszente HFFs wurden biochemisch fraktioniert und die proteasomale Aktivität der Fraktionen wurde untersucht. Die Reinheit der Fraktionierung wurde im Immunoblot mit Antikörpern gegen Calnexin (Komponente des Endoplasmatischen Retikulums) und U1-70K (nucleäres Protein) sichergestellt (Immunoblots über dem Diagramm in A). In A ist die nucleäre proteasomale Aktivität von HFFs (HFF Nu) und in B die cytoplasmatische proteasomale Aktivität von HFFs (HFF Cy) über einen Zeitraum von 16 h in einer Produktkurve dargestellt. Nach 2 h (Pfeil) wurde zu einem Teil der Probe der Proteasomeninhibitor Lactacystin (LC) gegeben, um die Spezifität der Messung zu kontrollieren. Die Zahlenwerte zeigen die Mittelwerte \pm Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten mit $*p < 0,05$ und $***p < 0,001$. Die cytoplasmatischen (Cy) und nucleoplasmatischen (Nu) Fraktionen junger (J) und seneszenter (S) HFFs vom PAA wurden auf ein 12%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Membran wurde mit Antikörpern gegen die α -UE 1, 2, 3, 5, 6 und 7 des 20S Proteasoms (~ 30 kD) detektiert. Der mit dem schwarzen Kasten markierte Bereich (~ 30 -100 kD) des Coomassie wurde für die Normalisierung der Werte für die densitometrische Auswertung (D) der Immunoblotbanden in C (20S) herangezogen. Histone befinden sich nur in den nucleoplasmatischen Fraktionen (C). Das Diagramm in D zeigt die Mittelwerte + Standardabweichungen der densitometrischen Auswertung von drei unabhängigen Experimenten.

Mit der Messung der proteasomalen Aktivität konnte gezeigt werden, dass diese in allen drei untersuchten Fibroblastentypen in seneszenten Zellkernen, trotz Unterschieden der nucleären Organisation, ansteigt.

Die festgestellten Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei Fibroblastentypen sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse

	WI-38	HDFs	HFFs
β-Galaktosidase	+	+	+
p21-Expression	+	+	+
p16-Expression	+	+	+
SAHF	+	-	-
SAPA	-	+	-
γH2AX-Foci	+	+	ND
p-NuMA-Foci	+	+	ND
Nu proteasomale Aktivität	↑	↑	↑
Cy proteasomale Aktivität	↑	↓	↑

5 Diskussion

5.1 WI-38 und HDFs exprimieren die selben Seneszenzmarker

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der replikativen Seneszenz in den Fibroblasten WI-38 und HDF etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass beide Fibroblastentypen die selben Seneszenzmarker exprimieren. Sowohl in WI-38 als auch in HDFs kommt es im Verlauf der replikativen Seneszenz zu: 1.) einer erhöhten β -Galaktosidaseaktivität, 2.) Zu- und dann wieder Abnahme der Expression von p21 und 3.) Akkumulation von p16 in späten PDs (Abb. 4.1 A-D). Wie unter 1.3.2 beschrieben, sind diese drei Marker charakteristische Seneszenzmarker.

Die Messung der β -Galaktosidaseaktivität bei pH 6 ist der meist genutzte Assay, um seneszente Zellen zu identifizieren. Es wird vermutet, dass der Anstieg der Aktivität daran liegt, dass die Anzahl und die Größe, und somit auch der Inhalt der Lysosomen in seneszenten Zellen zunehmen. Auch die Expression des Proteins β -Galaktosidase nimmt zu, sodass ein Schwellenwert überschritten wird, und die β -Galaktosidaseaktivität auch bei einem suboptimalen pH Wert von 6 gemessen werden kann. Die erhöhte β -Galaktosidaseaktivität ist nicht die Ursache, sondern die Folge von replikativer Seneszenz (Lee et al. 2006).

Anders verhält es sich mit den Seneszenzmarkern p21 und p16. Wie unter 1.2.1 und 1.2.3 beschrieben gehören p21 und p16 zu den CKIs, die den Zellzyklus permanent arretieren können. Für Zellen, die zunächst p21 und dann p16 exprimieren, wird angenommen, dass der p53-p21-Signalweg die Seneszenzantwort initiiert und der p16^{INK4a}-pRb-Signalweg für die Aufrechterhaltung der Seneszenz notwendig ist (Alcorta et al. 1996). Sowohl für WI-38 als auch für HDFs scheint dies der Fall zu sein, da p16 erst akkumuliert, wenn die Expression von p21 abnimmt (Abb. 4.1 C und D).

5.2 SAPAs bilden sich nur in HDFs

5.2.1 SAPAs sind nicht Chromatinassoziiert

In WI-38 Zellen konnten mittels Immunfluoreszenzexperimenten, bei denen die Proteine Topol, HP1 γ und H3K9m3 gefärbt wurden, die Veränderungen des Chromatins beobachtet werden, bei denen Bereiche dicht gepackten Heterochromatins entstehen, die SAHFs genannt werden (Narita et al. 2003). Die Bildung der SAHFs konnte in etwa 40% der seneszenten Zellen gezeigt werden

(Abb. 4.2 Diagramm 1). Anhand des β -Galaktosidaseassays wurden jedoch etwa 70% seneszente Zellen gezählt (Abb. 4.1 A). Das heißt, dass etwa 30% der Zellen auch unabhängig von SAHFs gealtert sind. Diese Tatsache könnte mit dem Phänomen erklärt werden, dass einige Zellen "mosaikartig altern". Das heißt, einige Zellen aktivieren als Antwort auf dysfunktionale Telomere den p53-p21-Signalweg. Andere Zellen, die keine Anzeichen von dysfunktionalen Telomeren zeigen, aktivieren aus noch ungeklärten Gründen den p16^{INK4a}-pRb-Signalweg (Herbig et al. 2004, d'Adda Fagagna 2003, Itahana et al. 2003). Das würde auch die Theorie untermauern, dass die Bildung der SAHFs von der p16-Expression abhängig ist (Di Micco et al. 2011).

Gegen diese Annahme spricht jedoch, dass die in dieser Arbeit untersuchten HDFs nach vielen PDs p16 akkumulieren, jedoch keine SAHFs bilden. Im Gegenteil kam es zu einer Abnahme von HP1 γ und H3K9m3 im Vergleich zu jungen Zellen (Abb. 4.2 B und 4.3 D). Die Abnahme von HP1 γ lässt sich damit erklären, dass in HDFs das Histon H3 scheinbar nicht an Lysin 9 dreifach methyliert vorliegt (Abb. 4.3 D). Diese Methylierung ist jedoch die Voraussetzung dafür, dass HP1 γ an H3K9m3 binden kann. Die Unterschiede in der Chromatinanordnung könnten demnach unter anderem mit Unterschieden im Histoncode begründet sein.

In Studien, bei denen ebenfalls eine Abnahme der Chromatinmarker HP1 γ und H3K9m3 beobachtet wurde, konnte beim Vergleich von humanen dermalen Fibroblasten junger (sieben und neun Jahre) und alter (88 und 92 Jahre), gesunder Donoren ein Zusammenhang mit der Dysintegrität der Kernhülle hergestellt werden. Pegoraro und Kollegen konnten zeigen, dass es bei gesunden alten Donoren zu einer altersbedingten, anormalen Lokalisation der Lamine A und C kam (Pegoraro 2009). Lamine sind Filamentproteine, die die nucleäre Lamina bilden. Diese liegt unter der inneren Kernmembran und sorgt für die Stabilität der Kernhülle. Die Lamine sind über mehrere Proteinkomplexe mit dem Chromatin, unter anderem mit HP1 γ verbunden und sorgen so für die Organisation und die Stabilität des Chromatins (Hetzler et al. 2005; Stuurman et al. 1998).

Unterschiede in der Chromatinordnung in verschiedenen seneszenten Zellen sind demnach bereits beschrieben worden.

In der vorliegenden Arbeit konnten zum ersten Mal Unterschiede in der Lokalisation des Proteins Topol während der replikativen Seneszenz für verschiedene Zelltypen definiert werden. Bekannt ist, dass Topol in WI-38 in SAHFs lokalisiert (Humbert et al. 2009). Diese Tatsache konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (Abb. 4.2 A, WI-38 SEN und 4.3 B). Ob Topol bei der Bildung der SAHFs beteiligt ist, konnte in dieser Studie jedoch nicht gezeigt werden (Humbert et al. 2009).

In seneszenten HDF zeigte sich eine ganz andere Lokalisation von Topol. Die Lokalisation ist vergleichbar mit jungen WI-38 und jungen HDFs. Zusätzlich konnten in 50% der seneszenten HDFs helle aggregatähnliche Strukturen, die SAPAs beobachtet werden. Der auffälligste Unterschied zu den WI-38 Zellen ist, dass Topol in seneszenten WI-38 Heterochromatinassoziiert ist und in HDFs nicht. Topol-SAPAs kolokalisieren weder mit dem Chromatinmarkern HP1 γ noch mit H3K9m3 (Abb. 4.2 B, HDF SEN und 4.3 D). Ein charakteristisches Merkmal der Topol-SAPAs konnte mit diesen Experimenten etabliert werden: Topol-SAPAs sind nicht Heterochromatin assoziiert.

SAPAs konnten nicht in allen untersuchten seneszenten HDFs gezeigt werden, ebenso wie bei den WI-38 die SAHFs. Möglicherweise liegt der Entstehung von SAPAs und SAHFs ein Mechanismus zugrunde, der nicht in allen Zellen gleich abläuft.

5.2.2 Die Expression von Topol ist in WI-38 und HDFs verschieden

Weiterhin wurde untersucht, ob die veränderte Lokalisation von Topol im Verlauf der Seneszenz sowohl in WI-38 Zellen als auch in HDFs mit einer veränderten Expression von Topol einhergeht. Dafür wurde sowohl für WI-38 Zellen als auch für HDFs das Gesamtzelllysat von jungen, präseneszenten und seneszenten Zellen untersucht. Auch hier zeigen sich Unterschiede zwischen WI-38 und HDFs. Die Expression von Topol stieg in WI-38 im Verlauf der Seneszenz an. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen einer Studie überein, in der Komponenten der SAHFs in ihrer Expression zunahm (Narita et al. 2003).

Im Gegensatz dazu nahm die Topol-Expression in seneszenten HDFs ab (Abbildung 4.4). Es könnte sein, dass Topol in seneszenten Zellen nicht mehr exprimiert wird, da

es in seneszenten Zellen zu einer Abnahme der DNA-Replikation und Transkription, an denen Topol beteiligt ist, kommt. Eine andere Ursache könnte sein, dass Topol in den Topol-SAPAs proteolytisch degradiert wird, oder dass die Topol-Aggregate unlöslicher werden und sich schlecht mittels SDS-PAGE auftrennen lassen.

5.3 SAPAs teilen Eigenschaften mit krankheitsbedingten Proteinaggregaten

5.3.1 In SAPAs segregiert das aggregationsanfällige Protein Huntingtin

Um Topol-SAPAs im Hinblick auf Proteinaggregation zu charakterisieren, wurden Doppelfärbungen gegen Topol und Huntingtin durchgeführt. Huntingtin ist das Markerprotein der neurodegenerativen Aggregaterkrankung Chorea Huntington, in der es durch Mutationen zu verlängerten polyQ-Sequenzen im Huntingtin Protein kommt. Die verlängerten polyQ-Sequenzen werden für die Aggregationsanfälligkeit des mutanten Proteins verantwortlich gemacht (Walker 2007). Da in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollte, ob Proteinaggregate auch unabhängig von Krankheiten aggregieren und die untersuchten HDFs von einem gesunden Donor stammten, wurden Antikörper eingesetzt, die das endogene Wildtyp Huntingtin erkennen.

Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, aggregiert Huntingtin wie Topol zu distinkten Proteinaggregaten im Nucleoplasma. Huntingtin ist sowohl ein cyto- als auch ein nucleoplasmatisches Protein und kann sowohl cyto- als auch nucleoplasmatische Aggregate bilden (Rubinsztein, Carmichael 2003). In seneszenten HDFs beschränkt sich die Aggregatbildung jedoch auf das Nucleoplasma. In etwa 40% der untersuchten seneszenten HDFs wurden Huntingtin-Aggregate beobachtet (Abb. 4.5 Diagramm 1). Topol-SAPAs wurden in 50% seneszenter HDFs gezählt (Abb. 4.2, Diagramm 2). Um zu untersuchen, ob Huntingtin-SAPAs im Nucleoplasma auch unabhängig von Topol-SAPAs auftreten, wurden Positionsstudien durchgeführt. Mit etwa 90% ist der größte Anteil der Huntingtin-SAPAs mit Topol-SAPAs entweder kolokalisiert, partiell kolokalisiert oder benachbart. Nur 10% der Huntingtin-Aggregate sind zufällig zu den Topol-SAPAs lokalisiert (Abstand $\geq 1 \mu\text{m}$, Abb. 4.5 Diagramm 2). Das deutet darauf hin, dass die meisten aggregierten Proteine in den selben Bereichen des Zellkerns aggregieren und nicht zufällig und unabhängig voneinander im Zellkern verteilt sind.

Im Gegensatz zu HDFs bilden WI-38 Zellen keine Huntingtinaggregate. Die Verteilung im Nucleoplasma unterscheidet sich sehr von der in HDFs. Huntingtin ist

sowohl in jungen als auch in seneszenten WI-38 Zellen nur schwach in den Nucleolen zu erkennen (Abb. 4.5 C und D).

Durch die beschriebenen Experimente konnte gezeigt werden, dass in seneszenten HDFs nicht nur Topol aggregiert, sondern auch das endogene Protein Huntingtin. Huntingtin scheint auch unabhängig von krankheitsbedingten expandierten polyQ-Sequenzen ein aggregationsanfälliges Protein zu sein, das auch aufgrund von Alterungsprozessen aggregiert.

Diese Beobachtung beschränkt sich jedoch auf HDFs und konnte nicht als allgemeingültiges Merkmal für *in vitro* gealterte Fibroblasten manifestiert werden.

5.3.2 SAPAs enthalten SDS-unlösliche Proteine

Um die Frage zu beantworten, ob endogene, altersbedingt aggregierte Proteine Eigenschaften mit pathogenen Proteinaggregaten teilen, wurde ein Filterbindungsassay durchgeführt. Aggregierte Proteine lassen sich auch in starken Detergenzien wie SDS nicht lösen und bleiben, wenn sie durch einen Membranfilter gefiltert werden, aufgrund ihrer Größe auf diesem zurück (Novoselova 2005, Wanker et al. 1999).

Durch den Filterbindungsassay konnte nachgewiesen werden, dass der Anteil an SDS-unlöslichem Huntingtin und Topol in seneszenten HDFs signifikant ansteigt (Abb. 4.6 A-D).

Das mutante Huntingtin Protein kann lösliche polyQ-Proteine rekrutieren, so dass diese ebenfalls unlöslich werden. Topol weist jedoch keine polyQ-Sequenzen auf (<http://www.uniprot.org/uniprot/P11387>) und es ist auch nicht bekannt, dass es SDS-unlöslich werden kann. Möglicherweise rekrutiert aggregiertes Huntingtin auch unabhängig von expandierten polyQ-Sequenzen andere Proteine, sodass diese unlöslich werden. Oder Topol aggregiert aus noch ungeklärten Ursachen, und aggregationsanfällige Proteine wie Huntingtin verändern dadurch ihre Konformation.

Durch Lebendzellbeobachtungen mit ektopischen, fluoreszenzmarkierten Proteinen, wie zum Beispiel Topol und Huntingtin, könnte aufgeklärt werden, wann SAPAs im Verlauf der replikativen Seneszenz genau entstehen und welche Proteine zuerst aggregieren.

Die SDS-Unlöslichkeit von Topol könnte auch die Abnahme der Immunoblot-Bande für Topol in seneszenten Zellen erklären (siehe Abb. 4.4). Es ist möglich, dass Topol im SDS-Gel schlecht aufgetrennt werden konnte.

Mit Topol und Huntingtin konnten zwei wichtige Proteine identifiziert werden, die in der replikativen Seneszenz in ihrer Funktionalität beeinträchtigt sind.

Topol ist ein Enzym, das essentiell für die DNA-Replikation und Transkription ist. Es induziert Einzelstrangbrüche (SSBs) in die DNA, um die topologischen Probleme, die bei diesen Prozessen, bedingt durch die DNA-Doppelhelix, auftreten zu lösen. Die DNA-Doppelstränge müssen für die Transkription temporär und für die Replikation permanent getrennt werden (Champoux 2001). Die katalytische Aktivität von Topol befindet sich im C-Terminus am Tyrosin 723, das den nucleophilen Angriff auf eine DNA-Phosphodiester-Brücke vermittelt. Dabei entsteht eine vorübergehende kovalente Verbindung des Tyrosins mit einem 3'-Ende der gebrochenen DNA. Am anderen Ende der DNA entsteht ein freies 5'-Hydroxylende. Dieses freie Ende kann sich um den intakten DNA-Strang kontrolliert drehen, so dass sich die DNA-Doppelhelix bei der Replikation und Transkription nicht verdrillt (Pommier 2009; Champoux 2001).

Huntingtin ist ein wichtiges Protein, das während der Mitose benötigt wird, und vermutlich auch eine Funktion in der Transkription ausübt (Godin 2011; Godin 2010; Borrell-Pagès et al. 2006).

Die DNA-Replikation, die Transkription und die Mitose sind Prozesse, die in der replikativen Seneszenz gestört sind. Ein Grund dafür könnte sein, dass aggregiertes, unlösliches Topol und Huntingtin ihre Funktionen in der Zelle nicht mehr ausüben, da sie keine Interaktionen mit anderen Proteinen bzw. mit der DNA mehr eingehen können.

Um unvoreingenommen weitere Proteine ausfindig zu machen, die in SAPAs segregieren und aggregieren, könnten mittels der im Filterbindungsassay retardierten Proteine auf der Membran massenspektrometrische Analysen durchgeführt werden. Die Analyse könnte zu weiteren Proteinen führen, die in ihrer Funktion in seneszenten Zellen gestört sind und somit eventuell zur replikativen Seneszenz beitragen.

5.3.3 In SAPAs segregieren essentielle nucleäre Proteine

Um die Frage zu klären, ob noch weitere Proteine, die essentiell für nucleäre Prozesse sind, in SAPAs segregieren, wurden Doppelfärbungen mit seneszenten HDFs durchgeführt.

Es wurden die Proteine MDM2, PML, SUMO1 und Untereinheiten des 20S Proteasoms untersucht, da diese auch in pathologischen NIs lokalisiert werden können (Janer et al. 2010, Chen et al. 2008, Ross 2002). Des Weiteren wurden die CKIs p21 und p16 untersucht, die für die Aufrechterhaltung der replikativen Seneszenz verantwortlich sind. NuMA wurde untersucht, da es ein mitosewichtiges Protein und der Interaktionspartner von Huntingtin ist, und RPA34 wurde als Marker für SSBs eingesetzt (Rodier et al. 2010; Shao et al. 1999), um zu untersuchen, ob es sich bei Topol-SAPAs um SSBs handelt.

Die Proteine MDM2, p21, SUMO1 und PML waren in Topol-SAPAs lokalisiert (Abb.4.7), während die Proteine p16, NuMA und RPA34 nicht in Topol-SAPAs lokalisierten (Abb. 4.8).

Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass es sich bei SAPAs um Proteolyseorte im Zellkern handelt, da 1.) MDM2 eine E3-Ubiquitin-Ligase ist, die Substrate ubiquitinyliert und selbst auch proteasomal abgebaut wird, 2.) p21 auch ein proteasomales Substrat ist und wie in Abbildung 4.1 (C und D) dargestellt in seneszenten Zellen die Expression von p21 abnimmt, 3.) PML-Kernkörperchen mit aktiven Proteolyseorten assoziiert werden konnten und (Rockel et al. 2005, Maya et al. 2001, Jin et al. 2003) 4.) proteasomale Untereinheiten des 20S Proteasoms in SAPAs lokalisiert sind (Abbildung 4.16).

Gegen die Annahme, dass es sich bei SAPAs um Proteolysefoci handelt, spricht, dass MDM2 in seneszenten Zellen nicht degradiert werden dürfte. In Zellen, die das Hayflick Limit erreicht haben, ist die Seneszenz bereits durch den p53/p21-Signalweg induziert und durch den p16^{INK4a}-pRB-Signalweg abgelöst worden. Das heißt, MDM2 müsste wieder als negativer Regulator von p53 fungieren. Die Degradation von p21 würde die oben genannte Theorie wiederum untermauern.

Sdek und Kollegen konnten zeigen, dass in Folge von MDM2 siRNA, das Protein Rb akkumuliert und die DNA-Synthese inhibiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass MDM2 nicht nur der negative Regulator von p53, sondern auch der von Rb ist. Es könnte sein, dass MDM2 in SAPAs segregiert und deshalb seine Funktion als negativer Regulator von Rb nicht mehr ausüben kann. Dies hätte zur Folge, dass die E2F-responsiven Gene nicht transkribiert würden, und die replikative Seneszenz stabilisiert würde.

Es wäre auch möglich, dass die HDFs „mosaik-artig“ altern. Ein Teil der Zellen würde dementsprechend MDM2 degradieren, um den p53/p21-Signalweg aufrecht zu

erhalten. Die anderen Zellen würden p21 degradieren, weil der p16^{INK4a}-pRB-Signalweg den p53/p21-Signalweg abgelöst hat. Dafür spricht, dass in seneszenten HDFs die Expression von p21 nicht vollständig abnimmt (Abbildung 4.1 D). Darüber hinaus konnte p16 nicht in SAPAs detektiert werden, was ebenfalls dafür spricht, dass es sich bei SAPAs um Proteolysefoci handelt, da p16 in seneszenten Zellen stark exprimiert und nicht degradiert wird (Abb. 4.1 D).

Ob in SAPAs essentielle Proteine durch das UPS abgebaut werden, für nucleäre Prozesse nicht mehr zur Verfügung stehen und so den Zustand der Seneszenz manifestieren, könnte eventuell durch siRNA-Experimente herausgefunden werden. Ist dies der Fall müsste sich durch siRNA-Experimente gegen die Komponenten der SAPAs vorzeitige Seneszenz auslösen lassen.

Andererseits könnte es sich bei SAPAs auch um DNA-Schadensorte handeln, da 1.) PML-Kernkörperchen mit DNA-Schadensorten kolokalisieren, z.B. mit TIFs, 2.) MDM2 eine Rolle in der durch DSBs vermittelten Schadensantwort spielt und 3.) für SUMO1 auch eine Funktion in der DNA-Schadensantwort gezeigt wurde (Yang et al. 2006, Nabetani 2004, Desai et al. 2003, Maya et al. 2001).

SAPAs könnten jedoch auch Proteolyseorte und DNA-Schadensorte sein. Nämlich durch kovalente Topol-DNA-Komplexe induzierte SSBs, die während der DNA-Replikation und Transkription durch den nucleophilen Angriff der Topol auf die DNA entstehen. Diese kovalenten Topol-DNA-Komplexe sind normalerweise reversibel. Können die kovalenten Komplexe jedoch nicht aufgelöst werden, führen sie zu DNA-Schäden, wenn beispielsweise bei der DNA-Replikation die Replikationsgabel mit den kovalenten Komplexen kollidiert. Dies führt zu einem irreversiblen Stopp der Replikationsgabel und letztendlich zu toxischen DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs). RPA34 ist ein Protein, das an der DNA-Replikation und der Reparatur, der durch sie entstandenen Schäden beteiligt ist. Es bindet an einzelsträngige DNA und gilt als Marker für SSBs (Rodier et al. 2010; Shao et al. 1999). RPA34 konnte jedoch nicht in den SAPAs lokalisiert werden. Das heißt, wenn es sich bei SAPAs um DNA-Schadensorte handelt, handelt es sich um die sehr viel toxischeren DSBs. RPA34 konnte jedoch auch im gesamten Nucleoplasma kaum detektiert werden, da in seneszenten Zellen keine DNA-Replikation mehr stattfindet (Abb. 4.8 C). Es wäre denkbar gewesen, dass RPA34 vollständig in den SAPAs segregiert, dort degradiert wird und deshalb nicht mehr für die Replikation zur Verfügung steht.

Bei der Transkription können kovalente Topol-DNA-Komplexe zu einem Stopp der Transkription führen. Es konnte gezeigt werden, dass nach Transkriptionssinhibition Proteine der Genexpression proteasomal abgebaut werden (Scharf et al. 2011). Der Transkriptionsstopp, der durch kovalente Topol-DNA-Komplexe ausgelöst wird, bewirkt die Modifikation von Topol durch Ubiquitin und deren Degradation durch das 26S Proteasom (Desai et al. 2003), was die Lokalisation der proteasomalen 20S Untereinheiten in den SAPAs erklären würde (Abb. 4.16 B, b). Die Degradation von Topol ist die Voraussetzung dafür, dass die SSBs freiliegen und durch den Transkriptions-gekoppelten Reparaturmechanismus (*engl. Transcription-coupled repair, TCR*), der an aktiv transkribierten Genen abläuft, repariert werden (Yang et al. 2006; Desai et al. 2003). Es könnte sein, dass aggregiertes, SDS-unlösliches Topol (Abb. 4.6) nicht durch das Proteasom degradiert wird, und deshalb der TCR nicht ablaufen kann. Die SSBs würden somit nicht repariert und könnten zu DSBs werden. Die Anwesenheit von SUMO1 in SAPAs könnte ebenfalls ein Hinweis dafür sein, dass Topol in den SAPAs nicht mehr funktionell ist. Es wurde gezeigt, dass inaktive Topol sumoyliert wird (Johnson 2004).

Neben p16 und RPA34 konnte mit NuMA ein drittes Protein definiert werden, das nicht in SAPAs lokalisiert ist. Die Interaktion von NuMA und Huntingtin wurde bisher nur für mitotische Zellen beschrieben (Godin 2010, Godin 2011). Die Funktion von NuMA in der Interphase ist bis heute ungeklärt. Es wird vermutet, dass es ein Bestandteil der nucleären Matrix ist (Radulescu, Cleveland 2010). Es könnte sein, dass Huntingtin und NuMA aufgrund der SAPAs nicht mehr interagieren können. Dies könnte ein Signal für die Zelle sein, dass die Bedingungen für eine Zellteilung nicht gegeben sind und den Zustand der replikativen Seneszenz manifestieren.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass den SAPAs eine funktionelle Bedeutung zugrunde liegt, da nicht alle untersuchten Proteine unspezifisch in ihnen segregiert werden.

5.4 NuMA ist ein Marker für replikative Seneszenz

5.4.1 NuMA wird in seneszenten Fibroblasten phosphoryliert

Um zu untersuchen, ob ein Protein, das nicht in SAPAs segregiert, dennoch durch diese verändert wird, wurde die Expression von NuMA im Verlauf der replikativen Seneszenz untersucht.

Dazu wurde Gesamtzelllysate von jungen, präseneszenten und seneszenten HDFs mittels SDS-PAGE analysiert. In jungen, proliferierenden HDFs war NuMA am stärksten exprimiert und nahm im Verlauf der replikativen Seneszenz ab. In seneszenten HDFs erschien eine Bande oberhalb der Bande für NuMA, die in jungen und präseneszenten HDFs nicht zu sehen war (Abb. 4.9). Da das selbe Expressionsmuster sich auch für WI-38 Zellen im Verlauf der replikativen Seneszenz zeigte, konnte ein Zusammenhang der SAPAs mit der veränderten NUMA-Expression ausgeschlossen werden (Abb. 4.10).

Es ist bekannt, dass NuMA in Antwort auf DNA-Schäden, die durch γ - oder UV-Strahlung induziert wurden, an Serin 395 phosphoryliert wird (Matsuoka et al. 2007), (Stokes et al. 2007). Da auch in zellulärer Seneszenz die Anzahl der DNA-Schadensorte zunimmt, wurde mit spezifischen Antikörpern getestet, ob es sich bei der Modifikation von NuMA, um die Phosphorylierung von Serin 395 handelt. Mit den phosphospezifischen Antikörpern konnte eindeutig gezeigt werden, dass NuMA zum Ende der präseneszenten Phase und in seneszenten WI-38 und HDFs an Serin 395 phosphoryliert wird (Abb. 4.11, p-NuMA).

Mit Immunfluoreszenzexperimenten ließ sich diese Beobachtung bestätigen. p-NuMA zeigte in jungen Fibroblasten etwa 0,87 (WI-38, Abb. 4.13 A) und 0,48 (HDFs, Abb. 4.13 D) distinkte Foci pro Zellkern. Diese Anzahl stieg in seneszenten WI-38 und HDFs signifikant auf etwa drei Foci pro Zellkern an (Abb. 4.13 B und E). Diese Daten stimmen mit Daten aus anderen Studien überein, die zeigen, dass DNA-Schadensorte, die mittels γ H2AX sichtbar gemacht wurden, in seneszenten Zellen akkumulieren (Passos et al. 2010, Wang et al. 2009, Nakamura et al. 2008). γ H2AX bildet in Antwort auf DNA-Schäden ebenfalls distinkte Foci im Nucleoplasma und wird, wie NuMA, von der Proteinkinase ATM phosphoryliert (Burma 2001, Matsuoka et al. 2007, Stokes et al. 2007). In dieser Arbeit konnte zwar nicht gezeigt werden, dass NuMA durch ATM phosphoryliert wird, aber es konnte mittels Doppelfärbungen eine deutliche Assoziation von p-NuMA mit ATM in seneszenten HDFs detektiert werden (Abb. 4.12 E).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass p-NuMA-Foci mit γ H2AX-Foci kolokalisieren. Durch Quantifikationen der γ H2AX-Foci im Vergleich zu p-NuMA-Foci wurde festgestellt, dass beide Proteine sich in jungen und seneszenten HDFs und WI-38 ähnlich verhalten und in seneszenten Zellen akkumulieren. Durch gezielte DNA-Schädigung wurde bestätigt, dass H2AX und NuMA in Antwort auf DNA-Schäden phosphoryliert werden (Abb. 4.13 C und F).

Mit diesen Experimenten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass NuMA im Verlauf der replikativen Seneszenz modifiziert wird, und dass es sich bei dieser Modifikation eindeutig um die spezifische Phosphorylierung an Serin 395 in Antwort auf DNA-Schäden handelt. Die Phosphorylierung eines mitosewichtigen Proteins wie NuMA könnte ein Signal für die Zelle sein, dass die Bedingungen für eine Zellteilung nicht gegeben sind und zur Manifestation der replikativen Seneszenz beitragen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass p-NuMA einen neuen Marker für replikative Seneszenz in verschiedenen Fibroblasten darstellt, der DNA-Schäden, und zwar DSBs, markiert.

5.4.2 SAPAs lokalisieren an DNA-Schadensorten

Um die Frage zu beantworten, ob es sich bei SAPAs um DSBs handeln könnte, wurden Dreifachfärbungen gegen Topol, γ H2AX und p-NuMA in jungen und seneszenten HDFs durchgeführt.

Die Kolokalisationsstudien und Positionsbestimmungen konnten zeigen, dass 45% der Topol-SAPAs mit DSBs assoziiert sind (Abb. 4.14 B und C). Di Micco und Kollegen konnten zeigen, dass sich auch SAHFs in der Nähe von γ H2AX-Foci befinden. γ H2AX-Foci innerhalb der SAHFs konnten jedoch nicht gezeigt werden. Sie gehen davon aus, dass die dicht gepackte Heterochromatinstruktur der SAHFs den Faktoren der DDR den Zugang zu DNA-Schadensorten innerhalb der SAHFs versperrt. Wurde die dicht gepackte Struktur der SAHFs aufgelöst, konnte eine Hochregulierung der DDR-Faktoren beobachtet werden, die Zugang zu vorher unzugänglichen chromosomalen Regionen hatten (Di Micco et al. 2011). Auch die Struktur der SAPAs könnte durch aggregierte Proteine den Zugang für DDR-Faktoren versperren, sodass DNA-Schäden nicht repariert werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass γ H2AX-Foci vermehrt an kollabierten Replikationsgabeln lokalisieren, die durch Camptothecin (CPT) oder andere Chemikalien induziert wurden (Brett et al. 2007, Furuta et al. 2006). Die Wirkung des

Antitumormittels CPT liegt in der Stabilisierung der kovalenten TopoI-DNA-Komplexe, was zu einer Akkumulation von DNA-Schäden und Apoptose der Krebszellen führt (Pommier 2009; Desai et al. 2003).

Die in der vorliegenden Studie beschriebene Nachbarschaft der γ H2AX-Foci zu den SAPAs könnte also ein Hinweis dafür sein, dass es sich bei den TopoI-SAPAs um kollabierte Replikationsgabeln handelt, die durch kovalente TopoI-DNA-Komplexe ausgelöst wurden.

5.4.3 In seneszenten HDFs akkumulieren kovalente TopoI-DNA-Komplexe

Mittels eines ICE-bioassays konnte bestätigt werden, dass im Vergleich zu jungen HDFs die Anzahl der kovalenten TopoI-DNA-Komplexe in seneszenten HDFs um das 3,4 fache ansteigt (Abb 4.15 B, Diagramm, schwarze Balken).

Es könnte sich demnach bei den SAPAs um kovalente TopoI-DNA-Komplexe handeln, die zu SSBs führen. Diese könnten aufgrund aggregierter, unlöslicher TopoI von DNA-Reparaturmechanismen nicht beseitigt werden. Daraus resultierende kollabierte Replikationsgabeln könnten zu toxischen DSBs werden, die zu einer DSB-Schadensantwort und damit zur Expression von p21 führt. Es konnte gezeigt werden, dass durch CPT oder andere Chemikalien kollabierte Replikationsgabeln eine ATM-vermittelte Antwort initiieren, die letztendlich zur Expression von p21 führt (Brett et al. 2007, Furuta et al. 2006).

Die DNA-Replikation findet in der S-Phase statt und bei replikativer Seneszenz handelt es sich um einen stabilen G1-Arrest (Pignolo et al. 1998), was eher für eine Störung der Transkription durch kovalente TopoI-DNA-Komplexe spricht. Auch die Lokalisation von Huntingtin könnte ein Hinweis dafür sein, dass es sich um Fehler bei der Transkription handelt, da Huntingtin auch eine Funktion in der Transkription zu haben scheint (Borrell-Pagès et al. 2006).

Es gibt jedoch auch Studien, die besagen, dass es sich bei replikativer Seneszenz um einen Arrest im Übergang von der G1- zur S-Phase handelt (Sherwood et al. 1988). Demnach könnten SAPAs durch kovalente TopoI-DNA-Komplexe kollabierte Replikationsgabeln und/oder Orte "abgebrochener" Transkription (*engl. stalled transcription*) darstellen, die zur Manifestation der replikativen Seneszenz beitragen.

5.5 Die proteasomale Aktivität verändert sich während der replikativen Seneszenz

5.5.1 Die Lokalisation der 20S Proteasomen ist in WI-38 und HDFs verschieden

Die Lokalisation der 20S UE in Bezug auf Topol unterschied sich zwischen WI-38 und HDFs. In seneszenten WI-38 waren die Proteasomen um die SAHFs lokalisiert, mit denen sie nicht kolokalisierten (Abb. 4.16 A). Im Gegensatz dazu waren in seneszenten HDFs die 20S UE eindeutig in den Topol-SAPAs lokalisiert. In 100% der Zellen, die Topol-SAPAs aufwiesen, kam es auch zu einer Lokalisation der 20S UE in den SAPAs. Darüber hinaus konnten im Nucleoplasma aggregatähnliche Strukturen unabhängig von Topol-SAPAs definiert werden (Abb. 4.16 B). An diesen Orten könnten sich möglicherweise andere Proteine zu SAPAs formen, wie beispielsweise Huntingtin. Einige Huntingtin-SAPAs konnten unabhängig von Topol-SAPAs beobachtet werden (Abb. 4.5 Diagramm 2). Wie bereits beschrieben, könnte es sich bei diesen aggregatähnlichen Strukturen um aktive Proteolyseorte handeln. Es könnte jedoch auch sein, dass auch die 20S Proteasomen aggregieren und nicht mehr funktionell sind, sodass die proteolytische Aktivität inhibiert ist.

Ob es sich bei SAPAs um aktive Proteolysefoci handelt, könnte mittels Mikroinjektion der Zellkerne seneszenten HDFs mit gequenchten Proteasomensubstraten geklärt werden. Dieses Substrat fluoresziert erst, wenn es proteasomal abgebaut wird. Wenn die Fluoreszenz des abgebauten Substrats mit der Fluoreszenz für SAPAs kolokalisieren würde, könnten die SAPAs eindeutig als Proteolyseorte definiert werden.

5.5.2 Die nucleäre proteasomale Aktivität ist in seneszenten WI-38 und HDFs erhöht

Um zu testen, wie funktional das UPS in seneszenten WI-38 und HDFs trotz SAHFs und SAPAs ist, wurden PAAs mit der cytoplasmatischen und der nucleoplasmatischen Fraktion durchgeführt.

Mit einem Proteasomensubstrat, das spezifisch für die chymotryptische Aktivität ist, wurde die proteasomale Aktivität über einen Zeitraum von 16 h beobachtet. Sowohl in WI-38 Zellen als auch in HDFs konnte eine Zunahme der nucleären proteasomalen Aktivität um 40-50% beobachtet werden (Abb. 4.17 A und B). Da es in WI-38 auch zu einer Erhöhung der proteasomalen Aktivität kam, konnte ausgeschlossen werden, dass diese in HDFs allein durch die SAPAs induziert wurde.

Bezüglich der cytoplasmatischen proteasomalen Aktivität zeigten sich Unterschiede zwischen WI-38 und HDFs. Während die Aktivität in seneszenten WI-38 genau wie im Nucleoplasma anstieg, kam es in seneszenten HDFs zu einer Reduktion der proteasomalen Aktivität im Cytoplasma (Abb. 4.18 A und B).

Eine Erhöhung der nucleären Aktivität aufgrund einer unsaubereren Fraktionierung oder unterschiedlich eingesetzter Proteinmengen konnte mittels Detektion gegen das cytoplasmatische Protein Calnexin und das nucleäre Protein U1-70K (Abb. 4.17 A und B), und das Verwenden standardisierter Proteinmengen ausgeschlossen werden.

Ob die Erhöhung bzw. die Reduktion der Aktivität mit einer erhöhten Anzahl an Proteasomen zusammenhing, wurde mittels Analyse der Expression proteasomaler Untereinheiten untersucht. Weder in WI-38 noch in HDFs konnte ein signifikanter Unterschied der Proteasomenexpression im Cytoplasma oder im Nucleoplasma gezeigt werden (Abb. 4.19 A-F).

5.5.3 Die Zunahme der nucleären proteasomalen Aktivität ist unabhängig von SAHFs oder SAPAs

Um zu untersuchen, ob die SAHFs oder SAPAs im Zusammenhang mit der Induktion der nucleären proteasomalen Aktivität stehen, wurden HFFs untersucht, die weder SAHFs noch SAPAs bilden.

HFFs exprimierten die selben Seneszenzmarker wie WI-38 und HDFs. In Abb. 4.20 ist gezeigt, dass HFFs auch eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität aufwiesen (A) und die Seneszenzmarker p21 und p16 exprimierten (B). Mit Immunfluoreszenzexperimenten gegen Topol und HP1 γ wurde ausgeschlossen, dass HFFs SAHFs oder SAPAs bilden (Abb. 20 C und D).

Die Analyse der proteasomalen Aktivität ergab, dass es auch in HFFs zu einem Anstieg der proteasomalen Aktivität um fast 100% im Nucleoplasma und um 40% im Cytoplasma kam. Die Reinheit der Fraktionierung war auch hier gegeben (Abb. 4.21 A und B). Im Gegensatz zu WI-38 und HDFs konnte in HFFs eine signifikante Abnahme der Expression proteasomaler 20S UE im Nucleoplasma detektiert werden (Abb. 4.21 D).

Bei einer Zunahme der proteasomalen Aktivität würde man vermuten, dass auch die Expression der Proteasomen zunimmt. Dies war in allen drei Zelltypen nicht der Fall. Im Nucleoplasma von HFFs wurde sogar eine Abnahme der Proteasomenexpression

detektiert (Abb. 4.21 D). Dies müsste bedeuten, dass das nucleäre Proteasom im Verlauf der replikativen Seneszenz aktiver und leistungsfähiger wird. Es könnte sein, dass sich zum Beispiel die Zusammensetzung der Proteasomen aufgrund von Alterungsprozessen verändert.

Eine Studie von Merker und Kollegen, die die proteasomale Aktivität in replikativ gealterten MRC-5 untersucht haben, berichtet auch von einem Anstieg der proteasomalen Aktivität im Zellkern (Merker et al. 2003).

Ein Grund könnte sein, dass der Seneszenzstatus eine Stresssituation für die Zelle darstellt. Stress, wie zum Beispiel oxidativer Stress, kann zu einer Zunahme der proteasomalen Aktivität sowohl im Cytoplasma als auch im Nucleoplasma führen (Merker et al. 2003).

In Vorarbeiten, in denen mit Silica-Nanopartikeln Topol-Proteinaggregate im Zellkern induziert wurden, konnte gezeigt werden, dass 30% dieser Nanopartikel-induzierten Proteinaggregate proteolytisch aktiv sind. Zudem stieg die globale nucleäre proteasomale Aktivität an. In diesen Studien konnte somit, ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, gezeigt werden, dass Proteinaggregation nicht gleichzeitig mit einer verminderten UPS Aktivität einhergeht (Chen et al. 2008; Chen, von Mikecz 2005).

Ein weiterer Grund für die beschriebenen Beobachtungen könnte der sekretorische Phänotyp seneszenter Fibroblasten sein. Da dieser auch dazu führt, dass seneszente Zellen $\text{INF}\gamma$ ausschütten (Crescenzi et al. 2011), könnte die Bildung von Immunoproteasomen induziert werden, die zusätzlich zur proteasomalen Aktivität beitragen. Immunoproteasomen assoziieren zum Beispiel in HEP-2 Zellen mit PML-Kernkörperchen, wenn sie mit $\text{INF}\gamma$ stimuliert werden (Fabunmi et al. 2001), und auch SAPAs sind mit PML-Kernkörperchen assoziiert (Abb. 4.7 C).

Die meisten Studien gehen jedoch davon aus, dass das UPS aufgrund von Alterungsprozessen ineffektiver wird und zu Aggregationserkrankungen beiträgt, da es fehlgefaltete Proteine nicht schnell genug degradieren kann (Löw 2011). So wurde in Ratten eine altersbedingte Abnahme der proteasomalen Aktivität in der Großhirnrinde, im Hippocampus und im Rückenmark beobachtet. Andererseits sind einige Bereiche des Gehirns nicht betroffen, wie zum Beispiel das Cerebellum und der Hirnstamm (Löw 2011).

Auch in anderen Geweben wie Haut, Muskeln, Herz, Leber, Nieren und Lungen wurde eine altersbedingte Abnahme der proteasomalen Caspase-ähnlichen Aktivität

beschrieben. Bei aufgereinigten 20S Proteasomen von verschiedenen Geweben konnte eine altersbedingte Abnahme sowohl der Caspase-, als auch der Chymotrypsin- und Trypsin-ähnlichen Aktivität beobachtet werden. Auch die Akkumulation von ubiquitinylierten, nicht degradierten Proteinen in gealtertem Geweben spricht für eine Abnahme der proteasomalen Aktivität aufgrund des Alterns (Dahlmann 2007). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in replikativer Seneszenz die Expression der β -UE reduziert war, was eine verminderte Aktivität des Proteasoms erklären würde (Chondrogianni et al. 2003).

Eine Aufschlüsselung der Zusammensetzung der Proteasomen in unterschiedlichen Geweben und verschiedenen gealterten Fibroblasten könnte Hinweise liefern, warum es mal zu einer Induktion und mal zu einer Reduktion des UPS kommt. Dafür könnten Proteasomen von jungen und seneszenten Zellen aufgereinigt werden und mittels Western Blot auf ihre einzelnen Untereinheiten, zum Beispiel auf die proteolytischen β -UE und die durch $\text{IFN}\gamma$ induzierbaren β i-UE untersucht werden. Dazu könnte man entweder Antikörper gegen die einzelnen UE verwenden, oder zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgele einsetzen, um die UE nach ihrem isoelektrischen Punkt aufzutrennen. So könnten Unterschiede zwischen jungen und seneszenten Zellen analysiert werden.

5.6 Hypothese

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei unterschiedliche Fibroblastentypen zwar die selben Seneszenzmarker exprimieren, jedoch alle andere Seneszenzphänotypen zeigen. WI-38 zeigten die typischen SAHFs, HDFs zeigten SAPAs und HFF zeigten weder SAHFs noch SAPAs. Diese drei unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass es viele verschiedene molekulare Mechanismen gibt, wie Zellen altern können. Mit dem p53-p21- und dem p16^{INK4a}-pRB-Signalweg konnten zwei wichtige Signalwege definiert werden, die in vielen Zellen zum Alterungsprozess beitragen (Pajalunga et al. 2007; Sherr, Roberts 1999). Dennoch wurde bis jetzt kein Alleinstellungsmerkmal für seneszente Zellen gefunden (Campisi 2011).

Die hier beschriebenen SAPAs sind ein neuer Seneszenzphänotyp, der bisher noch nicht beschrieben wurde. Da SAPAs nur in HDFs beobachtet werden konnten, und diese alle von einem Donor stammten, müsste zunächst untersucht werden, ob SAPAs in weiteren humanen Fibroblasten gefunden werden können; entweder in *in vitro* gealterten Fibroblasten und/oder in Fibroblasten alter Donoren.

Die beschriebenen SAPAs zeigen Gemeinsamkeiten mit den in Vorarbeiten gezeigten nucleären Proteinaggregaten, die sich durch Silica-Nanopartikel induzieren lassen. In diesen lokalisieren unter anderem auch die Proteine TopoI, MDM2 und PML. Auch der Anteil SDS-unlöslicher Proteine steigt nach der Behandlung mit Silica-Nanopartikeln an. Zudem konnte gezeigt werden, dass das UPS in Zellen, die mit Silica-Nanopartikeln behandelt wurden, induziert und nicht reprimiert wurde. Diese Induktion konnte erst nach der Entstehung der Aggregate beobachtet werden. Das heisst, dass die Proteinaggregate zu der Induktion des UPS führten. Darüber hinaus wiesen die behandelten Zellen Merkmale der zellulären Seneszenz auf (Chen et al. 2008; Chen, von Mikecz 2005). Es könnte demnach sein, dass Proteinaggregate zur Entstehung von Seneszenz führen und auch die in dieser Arbeit beschriebenen SAPAs zur Manifestation der replikativen Seneszenz in HDFs beitragen.

Wie die SAPAs genau entstehen, konnte nicht abschließend geklärt werden. Eine mögliche Hypothese ist, dass vermehrt auftretende kovalente TopoI-DNA-Komplexe zu Problemen bei der Transkription und DNA-Replikation führen könnten. Dadurch könnten zunächst SSBs entstehen, die zum Beispiel durch kollabierte

Replikationsgabeln zu toxischen DSBs werden könnten. Proteine, die an der DNA-Replikation und Transkription beteiligt sind, wie Topol und Huntingtin, würden daraufhin aus noch ungeklärten Mechanismen aggregieren. Dadurch würde das UPS induziert, die aggregierten Proteine könnten jedoch nicht degradiert werden, sodass diese den Zugang für die DDR-Faktoren versperren. So könnten zum Beispiel SSBs, die durch kovalente Topol-DNA-Komplexe bei der Transkription entstehen durch den Transkriptions-gekoppelten Reparaturmechanismus (TCR) nicht behoben werden.

Die unreparierten DNA-Schäden könnten zusammen mit anderen DNA-Schadensorten, wie zum Beispiel dysfunktionalen Telomeren, zu einem permanenten DNA-Schadenssignal beitragen, das über ATM die DNA-Schadenssignalkaskade initiiert, bei der H2AX und NuMA phosphoryliert werden. Die p53-p21- und p16^{INK4a}-pRb-Signalwege könnten daraufhin einen Zellzyklusarrest bewirken, der zur replikativen Seneszenz wird, da die DNA-Schäden nicht behoben werden können.

Die genaue Charakterisierung der SAPAs würde neue molekulare Mechanismen aufzuklären helfen, durch die Zellen seneszent werden können, eine Unterscheidung von pathologischen Proteinaggregaten ermöglichen und zum Verständnis der Entstehung von altersassoziierten Erkrankungen beitragen.

6 Literaturverzeichnis

Acosta, Juan C.; O'Loughlen, Ana; Banito, Ana; Guijarro, Maria V.; Augert, Arnaud; Raguz, Selina et al. (2008): Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. In *Cell* 133 (6), pp. 1006–1018.

Akbari, Mansour; Krokan, Hans E. (2008): Cytotoxicity and mutagenicity of endogenous DNA base lesions as potential cause of human aging. In *Mech. Ageing Dev* 129 (7-8), pp. 353–365.

Alcorta, D. A.; Xiong, Y.; Phelps, D.; Hannon, G.; Beach, D.; Barrett, J. C. (1996): Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. In *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (24), pp. 13742–13747.

Bartkova, Jirina; Horejsí, Zuzana; Koed, Karen; Krämer, Alwin; Tort, Frederic; Zieger, Karsten et al. (2005): DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. In *Nature* 434 (7035), pp. 864–870.

Bassing, Craig H.; Alt, Frederick W. (2004): H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. In *Cell Cycle* 3 (2), pp. 149–153.

Bayreuther, K.; Rodemann, H. P.; Hommel, R.; Dittmann, K.; Albiez, M.; Francz, P. I. (1988): Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85 (14), pp. 5112–5116.

Beauséjour, Christian M.; Krtolica, Ana; Galimi, Francesco; Narita, Masashi; Lowe, Scott W.; Yaswen, Paul; Campisi, Judith (2003): Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. In *EMBO J* 22 (16), pp. 4212–4222.

Ben-Porath, Ittai; Weinberg, Robert A. (2004): When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. In *J. Clin. Invest* 113 (1), pp. 8–13.

Bernardi, Rosa; Pandolfi, PierPaolo (2007): Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. In *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (12), pp. 1006–1016.

Bond, J. A.; Wyllie, F. S.; Wynford-Thomas, D. (1994): Escape from senescence in human diploid fibroblasts induced directly by mutant p53. In *Oncogene* 9 (7), pp. 1885–1889.

Borrell-Pagès, M.; Zala, D.; Humbert, S.; Saudou, F. (2006): Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. In *Cell. Mol. Life Sci* 63 (22), pp. 2642–2660.

Brenner, Andrew J.; Stampfer, Martha R.; Aldaz, C. Marcelo (1998): Increased p16 expression with first senescence arrest in human mammary epithelial cells and extended growth capacity with p16 inactivation. In *Oncogene* 17 (2), pp. 199–205.

Brett, Ewald; Sampath, Deepa; Plunkett, William (2007): H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. In *Mol. Cancer Ther* 6 (4), pp. 1239–1248.

Bringold, F.; Serrano, M. (2000): Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. In *Exp. Gerontol* 35 (3), pp. 317–329.

Burma, S. (2001): ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. In *Journal of Biological Chemistry* 276 (45), pp. 42462–42467.

- Campisi, J. (1997): The biology of replicative senescence. In *Eur J Cancer* 33 (5), pp. 703–709.
- Campisi, Judith (2005): Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. In *Cell* 120 (4), pp. 513–522.
- Campisi, Judith (2011): Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. In *Current Opinion in Genetics & Development* 21 (1), pp. 107–112.
- Campisi, Judith; Di d'Adda Fagagna, Fabrizio (2007): Cellular senescence: when bad things happen to good cells. In *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 8 (9), pp. 729–740.
- Carbone, Roberta; Pearson, Mark; Minucci, Saverio; Pelicci, Pier Giuseppe (2002): PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. In *Oncogene* 21 (11), pp. 1633–1640.
- Caviston, Juliane P. Ross Jennifer L. Antony Sheila M. Tokito Mariko and Holzbaur Erika L. F. (2007): Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. In *PNAS* (104), pp. 10047–10050, checked on 24/09/2011.
- Champoux, J. J. (2001): DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. In *Annu. Rev. Biochem* 70, pp. 369–413.
- Chen, Min; Mikecz, Anna von (2005): Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. In *Exp. Cell Res* 305 (1), pp. 51–62.
- Chen, Min; Rockel, Thomas; Steinweger, Gabriele; Hemmerich, Peter; Risch, Jakob; Mikecz, Anna von (2002): Subcellular recruitment of fibrillarin to nucleoplasmic proteasomes: implications for processing of a nucleolar autoantigen. In *Mol. Biol. Cell* 13 (10), pp. 3576–3587.
- Chen, Min; Singer, Lena; Scharf, Andrea; Mikecz, Anna von (2008): Nuclear polyglutamine-containing protein aggregates as active proteolytic centers. In *J. Cell Biol* 180 (4), pp. 697–704.
- Chondrogianni, Niki; Stratford, Fiona L. L.; Trougakos, Ioannis P.; Friguet, Bertrand; Rivett, A. Jennifer; Gonos, Efstathios S. (2003): Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. In *J. Biol. Chem* 278 (30), pp. 28026–28037.
- Chung, Hae Young; Cesari, Matteo; Anton, Stephen; Marzetti, Emanuele; Giovannini, Silvia; Seo, Arnold Young et al. (2009): Molecular inflammation: underpinnings of aging and age-related diseases. In *Ageing Res. Rev* 8 (1), pp. 18–30.
- Ciccia, Alberto; Elledge, Stephen J. (2010): The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. In *Molecular Cell* 40 (2), pp. 179–204.
- Collado, Manuel; Gil, Jesús; Efeyan, Alejo; Guerra, Carmen; Schuhmacher, Alberto J.; Barradas, Marta et al. (2005): Tumour biology: senescence in premalignant tumours. In *Nature* 436 (7051), p. 642.
- Coppé, Jean-Philippe; Patil, Christopher K.; Rodier, Francis; Krtolica, Ana; Beauséjour, Christian M.; Parrinello, Simona et al. (2010): A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. In *PLoS ONE* 5 (2), pp. e9188.

Cremer, Thomas; Cremer, Marion; Dietzel, Steffen; Muller, Stefan; Solovei, Irina; Fakan, Stanislav (2006): Chromosome territories--a functional nuclear landscape. In *Curr Opin Cell Biol* 18 (3), pp. 307–316.

Crescenzi, E.; Pacifico, F.; Lavorgna, A.; Palma, R. de; D'Aiuto, E.; Palumbo, G. et al. (2011): NF- κ B-dependent cytokine secretion controls Fas expression on chemotherapy-induced premature senescent tumor cells. In *Oncogene* 30 (24), pp. 2707–2717.

Cristofalo, V. J.; Allen, R. G.; Pignolo, R. J.; Martin, B. G.; Beck, J. C. (1998): Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95 (18), pp. 10614–10619.

d'Adda Di Fagagna, F. Reaper P. M. Clay-Farrace L. Fiegler H. Carr P. Zglinicki T. Saretzki G. Carter N. P. & Jackson S. P. (2003): A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. In *Nature* (426), pp. 194–198, checked on 19/09/2011.

d'Adda Di Fagagna, Fabrizio; Teo, Soo-Hwang; Jackson, Stephen P. (2004): Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. In *Genes Dev* 18 (15), pp. 1781–1799.

Dahlmann, Burkhardt (2007): Role of proteasomes in disease. In *BMC Biochem* 8 Suppl 1, pp. S3.

David, C.; Ollikainen, Noah; Trinidad, Jonathan C.; Cary, Michael P.; Burlingame, Alma L.; Kenyon, Cynthia (2010): Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. In *PLoS Biol* 8 (8), pp. e1000450.

Desai, Shyamal D.; Zhang, Hui; Rodriguez-Bauman, Alexandra; Yang, Jin-Ming; Wu, Xiaohua; Gounder, Murugesan K. et al. (2003): Transcription-dependent degradation of topoisomerase I-DNA covalent complexes. In *Mol. Cell. Biol* 23 (7), pp. 2341–2350.

Di Micco, Raffaella; Sulli, Gabriele; Dobрева, Miryana; Lontos, Michalis; Botrugno, Oronza A.; Gargiulo, Gaetano et al. (2011): Interplay between oncogene-induced DNA damage response and heterochromatin in senescence and cancer. In *Nat. Cell Biol* 13 (3), pp. 292–302.

Dimri, G. P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C. et al. (1995): A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92 (20), pp. 9363–9367.

Douglas, Peter M.; Dillin, Andrew (2010): Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. In *J. Cell Biol* 190 (5), pp. 719–729.

Drayton, Sarah; Peters, Gordon (2002): Immortalisation and transformation revisited. In *Curr. Opin. Genet. Dev* 12 (1), pp. 98–104.

Fabunmi, R. P.; Wigley, W. C.; Thomas, P. J.; DeMartino, G. N. (2001): Interferon gamma regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasomes at nuclear PML bodies. In *J. Cell. Sci* 114 (Pt 1), pp. 29–36.

Franceschi, Claudio; Capri, Miriam; Monti, Daniela; Giunta, Sergio; Olivieri, Fabiola; Sevini, Federica et al. (2007): Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. In *Mech. Ageing Dev* 128 (1), pp. 92–105.

- Francia, Sofia; Weiss, Robert S.; Di d'Adda Fagagna, Fabrizio (2007): Need telomere maintenance? Call 911. In *Cell Div* 2, p. 3.
- Furuta, T.; Hayward, R. L.; Meng, L-H; Takemura, H.; Aune, G. J.; Bonner, W. M. et al. (2006): p21CDKN1A allows the repair of replication-mediated DNA double-strand breaks induced by topoisomerase I and is inactivated by the checkpoint kinase inhibitor 7-hydroxystaurosporine. In *Oncogene* 25 (20), pp. 2839–2849.
- Gauthier, Laurent R.; Charrin, Bénédicte C.; Borrell-Pagès, Maria; Dompierre, Jim P.; Rangone, Hélène; Cordelières, Fabrice P. et al. (2004): Huntingtin controls neurotrophic support and survival of neurons by enhancing BDNF vesicular transport along microtubules. In *Cell* 118 (1), pp. 127–138.
- Gilbert, Nick; Boyle, Shelagh; Fiegler, Heike; Woodfine, Kathryn; Carter, Nigel P.; Bickmore, Wendy A (2004): Chromatin architecture of the human genome: gene-rich domains are enriched in open chromatin fibers. In *Cell* 118 (5), pp. 555–566.
- Glotzer, M.; Murray, A. W.; Kirschner, M. W. (1991): Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. In *Nature* 349 (6305), pp. 132–138.
- Godin, Juliette D. (2010): Huntingtin Is Required for Mitotic Spindle Orientation and Mammalian Neurogenesis, checked on 24/09/2011.
- Godin, Juliette D. (2011): Mitotic spindle: Focus on the function of huntingtin, checked on 24/09/2011.
- Grivennikov, Sergei I.; Greten, Florian R.; Karin, Michael (2010): Immunity, inflammation, and cancer. In *Cell* 140 (6), pp. 883–899.
- Groll, M.; Ditzel, L.; Löwe, J.; Stock, D.; Bochtler, M.; Bartunik, H. D.; Huber, R. (1997): Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. In *Nature* 386 (6624), pp. 463–471.
- Guarente, Leonard; Partridge, Linda; Wallace, Douglas C. (2008): *Molecular biology of aging*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Haince, J.-F.; Kozlov, S.; Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; Hendzel, M. J.; Lavin, M. F.; Poirier, G. G. (2007): Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Signaling Network Is Modulated by a Novel Poly(ADP-ribose)-dependent Pathway in the Early Response to DNA-damaging Agents. In *Journal of Biological Chemistry* 282 (22), pp. 16441–16453.
- Hara, E.; Smith, R.; Parry, D.; Tahara, H.; Stone, S.; Peters, G. (1996): Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. In *Mol. Cell. Biol* 16 (3), pp. 859–867.
- Hara, E.; Tsurui, H.; Shinozaki, A.; Nakada, S.; Oda, K. (1991): Cooperative effect of antisense-Rb and antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIG-1. In *Biochem. Biophys. Res. Commun* 179 (1), pp. 528–534.
- Harley, C. B.; Futcher, A. B.; Greider, C. W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. In *Nature* 345 (6274), pp. 458–460.
- Hartwell, L. H.; Weinert, T. A. (1989): Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. In *Science* 246 (4930), pp. 629–634.
- Hayflick, L. (1985): The cell biology of aging. In *Clin Geriatr Med* 1 (1), pp. 15–27.
- Hayflick, L.; Moorhead, P. S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. In *Exp Cell Res* 25, pp. 585–621.

- Herbig, Utz; Jobling, WendyA; Chen, BenjaminPC; Chen, DavidJ; Sedivy, JohnM (2004): Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). In *Mol Cell* 14 (4), pp. 501–513.
- Herbig, Utz; Sedivy, JohnM (2006): Regulation of growth arrest in senescence: telomere damage is not the end of the story. In *Mech Ageing Dev* 127 (1), pp. 16–24.
- Hershko, A.; Eytan, E.; Ciechanover, A.; Haas, A. L. (1982): Immunochemical analysis of the turnover of ubiquitin-protein conjugates in intact cells. Relationship to the breakdown of abnormal proteins. In *J. Biol. Chem* 257 (23), pp. 13964–13970.
- Hetzer, Martin W.; Walther, Tobias C.; Mattaj, Iain W. (2005): Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. In *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* 21, pp. 347–380.
- Huffman, K. E.; Levene, S. D.; Tesmer, V. M.; Shay, J. W.; Wright, W. E. (2000): Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. In *J. Biol. Chem* 275 (26), pp. 19719–19722.
- Humbert, N.; Martien, S.; Augert, A.; Da Costa, M.; Mauen, S.; Abbadie, C. et al. (2009): A Genetic Screen Identifies Topoisomerase 1 as a Regulator of Senescence. In *Cancer Research* 69 (10), pp. 4101–4106.
- Hutschenreiter, Silke; Tinazli, Ali; Model, Kirstin; Tampé, Robert (2004): Two-substrate association with the 20S proteasome at single-molecule level. In *EMBO J* 23 (13), pp. 2488–2497.
- Itahana, Koji; Zou, Ying; Itahana, Yoko; Martinez, Jose-Luis; Beausejour, Christian; Jacobs, Jacqueline J. L. et al. (2003): Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. In *Mol. Cell. Biol* 23 (1), pp. 389–401.
- Jacobs, Jacqueline J. L.; Lange, Titia de (2004): Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. In *Curr. Biol* 14 (24), pp. 2302–2308.
- Janer, Alexandre; Werner, Andreas; Takahashi-Fujigasaki, Junko; Daret, Aurélie; Fujigasaki, Hiroto; Takada, Koji et al. (2010): SUMOylation attenuates the aggregation propensity and cellular toxicity of the polyglutamine expanded ataxin-7. In *Hum. Mol. Genet* 19 (1), pp. 181–195.
- Jenuwein, T.; Allis, C. D. (2001): Translating the histone code. In *Science* 293 (5532), pp. 1074–1080.
- Jeyapalan, JessieC; Ferreira, Mark; Sedivy, JohnM; Herbig, Utz (2007): Accumulation of senescent cells in mitotic tissue of aging primates. In *Mech Ageing Dev* 128 (1), pp. 36–44.
- Jin, Yetao; Lee, Hunjoo; Zeng, Shelya X.; Dai, Mu-Shui; Lu, Hua (2003): MDM2 promotes p21waf1/cip1 proteasomal turnover independently of ubiquitylation. In *EMBO J* 22 (23), pp. 6365–6377.
- Johnson, Erica S. (2004): PROTEIN MODIFICATION BY SUMO. In *Annu. Rev. Biochem* (73), pp. 355–382, checked on 30/09/2011.
- Kastan, Michael B.; Bartek, Jiri (2004): Cell-cycle checkpoints and cancer. In *Nature* 432 (7015), pp. 316–323.

- Katsuno, Masahisa; Banno, Haruhiko; Suzuki, Keisuke; Takeuchi, Yu; Kawashima, Motoshi; Tanaka, Fumiaki et al. (2008): Molecular genetics and biomarkers of polyglutamine diseases. In *Curr. Mol. Med* 8 (3), pp. 221–234.
- Katyal, Sachin; McKinnon, Peter J. (2008): DNA strand breaks, neurodegeneration and aging in the brain. In *Mechanisms of Ageing and Development* 129 (7-8), pp. 483–491.
- Khanna, K. K.; Jackson, S. P. (2001): DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. In *Nat. Genet* 27 (3), pp. 247–254.
- Kirkwood, T. B.; Austad, S. N. (2000): Why do we age? In *Nature* 408 (6809), pp. 233–238.
- Kjølhede Jeppesen, Dennis; Vilhelm A. Bohr Tinna Stevnsner (2011): DNA repair deficiency in neurodegeneration, checked on 23/09/2011.
- Kovtun, Irina V.; Liu, Yuan; Bjoras, Magnar; Klungland, Arne; Wilson, Samuel H.; McMurray, Cynthia T. (2007): OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. In *Nature* 447 (7143), pp. 447–452.
- Krtolica, A. Campisi J. (2002): Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (34), pp. 1401–1414.
- Krtolica, A.; Parrinello, S.; Lockett, S.; Desprez, P. Y.; Campisi, J. (2001): Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98 (21), pp. 12072–12077.
- Kuilman, Thomas; Michaloglou, Chrysiis; Vredeveld, Liesbeth C. W.; Douma, Sirith; van Doorn, Remco; Desmet, Christophe J. et al. (2008): Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. In *Cell* 133 (6), pp. 1019–1031.
- Lam, Y. Amy; Lawson, T. Glen; Velayutham, Murugesan; Zweier, Jay L.; Pickart, Cecile M. (2002): A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. In *Nature* 416 (6882), pp. 763–767.
- Lanigan, F.; Geraghty, J. G.; Bracken, A. P. (2011): Transcriptional regulation of cellular senescence. In *Oncogene* 30 (26), pp. 2901–2911.
- Lanza, R. P.; Cibelli, J. B.; Blackwell, C.; Cristofalo, V. J.; Francis, M. K.; Baerlocher, G. M. et al. (2000): Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. In *Science* 288 (5466), pp. 665–669.
- Le, Oanh N. L.; Rodier, Francis; Fontaine, Francois; Coppe, Jean-Philippe; Campisi, Judith; DeGregori, James et al. (2010): Ionizing radiation-induced long-term expression of senescence markers in mice is independent of p53 and immune status. In *Aging Cell* 9 (3), pp. 398–409.
- Lee, Bo Yun; Han, Jung A.; Im, Jun Sub; Morrone, Amelia; Johung, Kimberly; Goodwin, Edward C. et al. (2006): Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. In *Aging Cell* 5 (2), pp. 187–195.
- Lee, D. H.; Goldberg, A. L. (1998): Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. In *Trends Cell Biol* 8 (10), pp. 397–403.

Liu, Dan; Hornsby, Peter J. (2007): Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. In *Cancer Res* 67 (7), pp. 3117–3126.

Löw, Peter (2011): The role of ubiquitin- proteasome system in ageing. In *General and Comparative Endocrinology* (172), pp. 39–43, checked on 24/09/2011.

Lukas, Jiri; Lukas, Claudia; Bartek, Jiri (2004): Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. In *DNA Repair* 3 (8-9), pp. 997–1007.

Malmanche, Nicolas; Maia, André; Sunkel, Claudio E. (2006): The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. In *FEBS Lett* 580 (12), pp. 2888–2895.

Matsuoka, S.; Ballif, B. A.; Smogorzewska, A.; McDonald, E. R.; Hurov, K. E.; Luo, J. et al. (2007): ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. In *Science* 316 (5828), pp. 1160–1166.

Maya, R.; Balass, M.; Kim, S. T.; Shkedy, D.; Leal, J. F.; Shifman, O. et al. (2001): ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. In *Genes Dev* 15 (9), pp. 1067–1077.

Medvedev, Z. A. (1981): On the immortality of the germ line: genetic and biochemical mechanism. A review. In *Mech. Ageing Dev* 17 (4), pp. 331–359.

Meek, David W.; Hupp, Ted R. (2010): The regulation of MDM2 by multisite phosphorylation--opportunities for molecular-based intervention to target tumours? In *Semin. Cancer Biol* 20 (1), pp. 19–28.

Merdes, A.; Heald, R.; Samejima, K.; Earnshaw, W. C.; Cleveland, D. W. (2000): Formation of spindle poles by dynein/dynactin-dependent transport of NuMA. In *J. Cell Biol* 149 (4), pp. 851–862.

Merker, Katrin; Ullrich, Oliver; Schmidt, Hartmut; Sitte, Nicolle; Grune, Tilman (2003): Stability of the nuclear protein turnover during cellular senescence of human fibroblasts. In *FASEB J* 17 (13), pp. 1963–1965.

Michaloglou, Chrysiis; Vredeveld, Liesbeth C. W.; Soengas, Maria S.; Denoyelle, Christophe; Kuilman, Thomas; van der Horst, Chantal M. A. M. et al. (2005): BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. In *Nature* 436 (7051), pp. 720–724.

Mikecz, Anna von (2006): The nuclear ubiquitin-proteasome system. In *J. Cell. Sci* 119 (Pt 10), pp. 1977–1984.

Mikecz, Anna von (2009): PolyQ fibrillation in the cell nucleus: who's bad? In *Trends Cell Biol* 19 (12), pp. 685–691.

Mitsui, Y.; Schneider, E. L. (1976): Increased nuclear sizes in senescent human diploid fibroblast cultures. In *Exp Cell Res* 100 (1), pp. 147–152.

Muller, M. T.; Pfund, W. P.; Mehta, V. B.; Trask, D. K. (1985): Eukaryotic type I topoisomerase is enriched in the nucleolus and catalytically active on ribosomal DNA. In *EMBO J* 4 (5), pp. 1237–1243.

Nabetani, A. Yokoyama O. and Ishikawa F. (2004): Localization of hRad9, hHus1, hRad1, and hRad17 and Caffeine-sensitive DNA Replication at the Alternative

- Lengthening of Telomeres-associated Promyelocytic Leukemia Body. In *Journal of Biological Chemistry* 279 (24), pp. 25849–25857.
- Nakamura, Asako J.; Chiang, Y. Jeffrey; Hathcock, Karen S.; Horikawa, Izumi; Sedelnikova, Olga A.; Hodes, Richard J.; Bonner, William M. (2008): Both telomeric and non-telomeric DNA damage are determinants of mammalian cellular senescence. In *Epigenetics Chromatin* 1 (1), p. 6.
- Narita, Masashi; Nunez, Sabrina; Heard, Edith; Narita, Masako; Lin, Athena W.; Hearn, Stephen A. et al. (2003): Rb-Mediated Heterochromatin Formation and Silencing of E2F Target Genes during Cellular Senescence. In *Cell* 113 (6), pp. 703–716.
- Nasmyth, K. (1996): Viewpoint: Putting the Cell Cycle in Order. In *Science* (274), pp. 1643–1645.
- Novoselova, Tatiana V. Boris A. Margulis Sergey S. Novoselov Alexander M. Sapozhnikov Jacqueline Spuy Michael E. Cheetham and Irina V. Guzhova (2005): Treatment with extracellular HSP70/HSC70 protein can reduce polyglutamine toxicity and aggregation. In *Journal of Neurochemistry* (94), pp. 597–606, checked on 24/09/2011.
- Ohtani, Naoko; Yamakoshi, Kimi; Takahashi, Akiko; Hara, Eiji (2004): The p16INK4a-RB pathway: molecular link between cellular senescence and tumor suppression. In *J. Med. Invest* 51 (3-4), pp. 146–153.
- Olovnikov, A. M. (1973): The Theory of Marginotomy. The Incomplete Copying of Template Margin in Enzymic Synthesis of Polynucleotides and Biological Significance of the Phenomenon. In *J. theor. Biol.* (41), pp. 181–190.
- Pagano, M.; Tam, S. W.; Theodoras, A. M.; Beer-Romero, P.; Del Sal, G.; Chau, V. et al. (1995): Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. In *Science* 269 (5224), pp. 682–685.
- Pajalunga, Deborah; Mazzola, Alessia; Salzano, Anna Maria; Biferi, Maria Grazia; Luca, Gabriele de; Crescenzi, Marco (2007): Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states. In *J. Cell Biol* 176 (6), pp. 807–818.
- Partridge, L. (2001): Evolutionary theories of ageing applied to long-lived organisms (36), pp. 641–650.
- Passos, João F.; Nelson, Glyn; Wang, Chunfang; Richter, Torsten; Simillion, Cedric; Proctor, Carole J. et al. (2010): Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. In *Mol. Syst. Biol* 6, p. 347.
- Pegoraro, Gianluca (2009): Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex. In *nature cell biology* (10), checked on 27/09/2011.
- Pickart, C. M.; Rose, I. A. (1985): Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. In *Prog. Clin. Biol. Res* 180, p. 215.
- Pignolo, R. J.; Martin, B. G.; Horton, J. H.; Kalbach, A. N.; Cristofalo, V. J. (1998): The pathway of cell senescence: WI-38 cells arrest in late G1 and are unable to traverse the cell cycle from a true G0 state. In *Exp. Gerontol* 33 (1-2), pp. 67–80.
- Pommier, Yves (2009): DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. In *Chem. Rev* 109 (7), pp. 2894–2902.

- Pourquier, P.; Takebayashi, Y.; Urasaki, Y.; Gioffre, C.; Kohlhagen, G.; Pommier, Y. (2000): Induction of topoisomerase I cleavage complexes by 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine (ara-C) in vitro and in ara-C-treated cells. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (4), pp. 1885–1890.
- Radulescu, Andreea E.; Cleveland, Don W. (2010): NuMA after 30 years: the matrix revisited, checked on 28/09/2011.
- Rauser, Casandra L.; Mueller, Laurence D.; Rose, Michael R. (2006): The evolution of late life. In *Ageing Res. Rev* 5 (1), pp. 14–32.
- Reits, E. A.; Benham, A. M.; Plougastel, B.; Neefjes, J.; Trowsdale, J. (1997): Dynamics of proteasome distribution in living cells. In *EMBO J* 16 (20), pp. 6087–6094.
- Rockel, Thomas Dino; Stuhlmann, Dominik; Mikecz, Anna von (2005): Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. In *J. Cell. Sci* 118 (Pt 22), pp. 5231–5242.
- Rodier, F.; Munoz, D. P.; Teachenor, R.; Chu, V.; Le, O.; Bhaumik, D. et al. (2010): DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. In *Journal of Cell Science* 124 (1), pp. 68–81.
- Rodier, Francis; Campisi, Judith (2011): Four faces of cellular senescence. In *J. Cell Biol* 192 (4), pp. 547–556.
- Rodier, Francis; Campisi, Judith; Bhaumik, Dipa (2007): Two faces of p53: aging and tumor suppression. In *Nucleic Acids Res* 35 (22), pp. 7475–7484.
- Rodier, Francis; Kim, Sahn-Ho; Nijjar, Tarlochan; Yaswen, Paul; Campisi, Judith (2005): Cancer and aging: the importance of telomeres in genome maintenance. In *Int J Biochem Cell Biol* 37 (5), pp. 977–990.
- Ross, Christopher A. (2002): Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. In *Neuron* 35 (5), pp. 819–822.
- Rubinsztein, David C.; Carmichael, Jenny (2003): Huntington's disease: molecular basis of neurodegeneration. In *Expert Rev Mol Med* 5 (20), pp. 1–21.
- Sager, R. (1991): Senescence as a mode of tumor suppression. In *Environ. Health Perspect* 93, pp. 59–62.
- Sambrook, Joseph; Fritsch, E. F.; Maniatis (1989): 1. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Scharf, Andrea; Grozdanov, Petar N.; Veith, Roman; Kubitscheck, Ulrich; Meier, U. Thomas; Mikecz, Anna von (2011): Distant positioning of proteasomal proteolysis relative to actively transcribed genes. In *Nucleic Acids Res* 39 (11), pp. 4612–4627.
- Scheffner, M.; Werness, B. A.; Huibregtse, J. M.; Levine, A. J.; Howley, P. M. (1990): The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. In *Cell* 63 (6), pp. 1129–1136.
- Schmitt, Clemens A. (2007): Cellular senescence and cancer treatment. In *Biochim. Biophys. Acta* 1775 (1), pp. 5–20.
- Schoneich, Christian (2006): Protein modification in aging: an update. In *Exp Gerontol* 41 (9), pp. 807–812.

- Sdek, Patima; Ying, Haoqiang; Chang, Donny L. F.; Qiu, Wei; Zheng, Hongwu; Touitou, Robert et al. (2005): MDM2 promotes proteasome-dependent ubiquitin-independent degradation of retinoblastoma protein. In *Mol. Cell* 20 (5), pp. 699–708.
- Shao, R. G.; Cao, C. X.; Zhang, H.; Kohn, K. W.; Wold, M. S.; Pommier, Y. (1999): Replication-mediated DNA damage by camptothecin induces phosphorylation of RPA by DNA-dependent protein kinase and dissociates RPA:DNA-PK complexes. In *EMBO J* 18 (5), pp. 1397–1406.
- Shaw, P. J.; and E. G. Jordan (1995): The Nucleolus. In *Ann. Rev. Cell Dev. Biol* (11), pp. 93-12.
- Shay, Jerry W.; Roninson, Igor B. (2004): Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. In *Oncogene* 23 (16), pp. 2919–2933.
- Sherr, C. J.; Roberts, J. M. (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. In *Genes Dev* 13 (12), pp. 1501–1512.
- Sherwood, S. W.; Rush, D.; Ellsworth, J. L.; Schimke, R. T. (1988): Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. In *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 85 (23), pp. 9086–9090.
- Shiels, P. G.; Kind, A. J.; Campbell, K. H.; Waddington, D.; Wilmut, I.; Colman, A.; Schnieke, A. E. (1999): Analysis of telomere lengths in cloned sheep. In *Nature* 399 (6734), pp. 316–317.
- Shiloh, Yosef (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. In *Nat. Rev. Cancer* 3 (3), pp. 155–168.
- Sorokin, A. V.; Kim, E. R.; Ovchinnikov, L. P. (2009): Proteasome system of protein degradation and processing. In *Biochemistry Mosc* 74 (13), pp. 1411–1442.
- Stein, G. H.; Drullinger, L. F.; Soulard, A.; Dulić, V. (1999): Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. In *Mol. Cell. Biol* 19 (3), pp. 2109–2117.
- Stokes, M. P.; Rush, J.; MacNeill, J.; Ren, J. M.; Sprott, K.; Nardone, J. et al. (2007): Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (50), pp. 19855–19860.
- Stuurman, N.; Heins, S.; Aebi, U. (1998): Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. In *J. Struct. Biol* 122 (1-2), pp. 42–66.
- Su, Tin Tin (2006): Cellular Responses to DNA Damage: One Signal, Multiple Choices. In *Annu. Rev. Genet* 40 (1), pp. 187–208.
- Takai, Hiroyuki; Smogorzewska, Agata; Lange, Titia de (2003): DNA Damage Foci at Dysfunctional Telomeres. In *Current Biology* 13 (17), pp. 1549–1556.
- te Poele, Robert H.; Okorokov, Andrei L.; Jardine, Lesley; Cummings, Jeffrey; Joel, Simon P. (2002): DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. In *Cancer Res* 62 (6), pp. 1876–1883.
- Thrower, J. S.; Hoffman, L.; Rechsteiner, M.; Pickart, C. M. (2000): Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. In *EMBO J* 19 (1), pp. 94–102.
- Varadaraj, A.; Dovey, C. L.; Laredj, L.; Ferguson, B.; Alexander, C. E.; Lubben, N. et al. (2007): Evidence for the receipt of DNA damage stimuli by PML nuclear domains. In *J. Pathol* 211 (4), pp. 471–480.

- Wajapeyee, Narendra; Serra, Ryan W.; Zhu, Xiaochun; Mahalingam, Meera; Green, Michael R. (2008): Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. In *Cell* 132 (3), pp. 363–374.
- Walker, Francis O. (2007): Huntington's disease. In *Lancet* 369 (9557), pp. 218–228.
- Wang, Chunfang; Jurk, Diana; Maddick, Mandy; Nelson, Glyn; Martin-Ruiz, Carmen; von, Zglinicki Thomas (2009): DNA damage response and cellular senescence in tissues of aging mice. In *Aging Cell* 8 (3), pp. 311–323.
- Wanker, E. E.; Scherzinger, E.; Heiser, V.; Sittler, A.; Eickhoff, H.; Lehrach, H. (1999): Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates. In *Meth. Enzymol* 309, pp. 375–386.
- Wilkinson, K. D. (2000): Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. In *Semin. Cell Dev. Biol* 11 (3), pp. 141–148.
- Williams, G. C. (1957): Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. In *Evolution* (11), pp. 398–411.
- Wood, Richard D.; Mitchell, Michael; Lindahl, Tomas (2005): Human DNA repair genes. In *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 577 (1-2), pp. 275–283.
- Xu, Zhi-Xiang; Timanova-Atanasova, Anna; Zhao, Rui-Xun; Chang, Kun-Sang (2003): PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. In *Mol. Cell. Biol* 23 (12), pp. 4247–4256.
- Yang, Meiluen; Hsu, Chia-Tse; Ting, Chun-Yuan; Liu, Leroy F.; Hwang, Jaulang (2006): Assembly of a polymeric chain of SUMO1 on human topoisomerase I in vitro. In *J. Biol. Chem* 281 (12), pp. 8264–8274.
- Zhang, Rugang; Chen, Wei; Adams, PeterD (2007): Molecular dissection of formation of senescence-associated heterochromatin foci. In *Mol Cell Biol* 27 (6), pp. 2343–2358.
- Zhong, S.; Salomoni, P.; Pandolfi, P. P. (2000): The transcriptional role of PML and the nuclear body. In *Nat Cell Biol* 2 (5), pp. E85-90.

7 Abkürzungsverzeichnis

AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	alternate open reading frame
ATCC	American Tissue Culture Collection
ATM	engl. Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
ben	benachbart
BER	engl. base excision repair
Bleo	Bleomycin
CIP/KIP	engl. CDK-interacting protein/Kinase Inhibitory protein
CKI	engl. Cyclin-dependent kinase inhibitor
CDK	engl. cyclin-dependent kinase
CHK	checkpoint kinase
CLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
CPT	Camptothecin
CsCl	Cäsiumchlorid
Cy	Cytoplasma
DAPI	4'6-Diaminidino-2-phenylindol
DIC	Differenzieller Interferenzkontrast
DG	Deckgläschen
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. Desoxyribonucleinacid
DDR	engl. dna damage response

7 Abkürzungsverzeichnis

DSBs	engl. double-strand breaks
DTT	Dithiotreitol
DUB	Deubiquitinylierendes Enzym
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	E3-Ubiquitin-Ligase
ECL	engl. enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Expo.	Expositionszeit (Entwicklungszeit, der Western Blot Filme)
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GZL	Gesamtzelllysat
h	hour, Stunde
HD	Huntington's disease
HDF	Humane Dermale Fibroblasten
HGPS	Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEp- 2	humanes Epitheliom Typ 2
HFF	Human Foreskin Fibroblasts
H ₂ O	Wasser
HP1 γ	Heterochromatin Protein 1 gamma
ICE- Bioassay	<i>in vivo</i> complex of enzyme-Bioassay
IGFBP	insulinlike growth factor binding protein-7

7 Abkürzungsverzeichnis

INF γ	Interferon gamma
INK4	engl. Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4
IL	Interleukin
K	Lysin, Aminosäure
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
kD	kilo Dalton
kol	kolokalisiert
MDM2	murine double minute-2
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MRE11	meiotic recombination 11
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MRN	Komplex aus MRE11, Rad50 und NBS
MW	Molekulargewicht
NBS	Nijmegen-breakage syndrome
NIs	nuclear inclusions
NuMA	nuclear mitotic apparatus protein
Nu	Nucleoplasma
PAA	Proteasomaler Aktivitätsassay
part	partiell kolokalisiert
PBS	phosphate buffered saline
PD	population doublings
PML	Promyelozytische Leukämie
präSEN	präseneszenz
Q	Glutamin, Aminosäure

7 Abkürzungsverzeichnis

Rb	Retinoblastom Protein
RPA 34	engl. Replication protein A 34
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SAHF	Seneszenz assoziierte Heterochromatin Foci
SAPA	Seneszenz assoziierte Proteinaggregate
Sarkosyl	N-Lauroylsarcosine sodium salt solution
SASP	Seneszenz assoziierter sekretorischer Phänotyp
SDS	engl. Sodiumdodecylsulfat
SDS- PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
SEN	seneszent
sep	separiert
Suc-LLVY-AMC	Suc-LLVY-7-Amino-4-Methyl-coumarin
SUMO1	engl. small ubiquitin-like modifier 1
SSBs	engl. single- strand breaks
TCR	engl. transcription-coupled repair
TEMED	N,N,N,N- Tetramethylethylendiamin
TIF	telomere dysfunction-induced foci
TopoI	DNA-Topoisomerase I
tRNA	transfer Ribonucleinsäure
Ub	Ubiquitin
UE	Untereinheit
UPS	Ubiquitin-Proteasomen System
V	Volt
WI-38	humane fötale Fibroblasten der Lunge

8 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Anna von Mikecz für die wissenschaftliche Betreuung bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. R. Wagner aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen-Fakultät für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Prof. G. Reifenberger und Frau Dr. Florea bedanke ich mich für das Bereitstellen von humanen dermalen Fibroblasten.

Mein ganz besonderer Dank geht sowohl an die Geschäftsleitung des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung, Herrn Prof. Krutmann und Herrn Dr. Beaucamp, als auch an Herrn Dr. Marc Majora.

Mein Dank richtet sich auch an die Mitarbeiter und besonders auch an ehemalige Mitarbeiter des Leibniz-Instituts für umweltmedizinische Forschung.

Mein allergrößter Dank geht jedoch an meine Familie und meine Freunde fürs Zuhören, Aufmuntern, Motivieren, für die Abwechslung vom Laboralltag, die moralische Unterstützung, viele schöne gemeinsame Abende und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein riesengroßes Dankeschön geht dabei an meinen Freund Adam und meine Schwester Hanneke. Ohne euch hätte ich es nicht geschafft!

9 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich erkläre gleichzeitig, dass ich die vorgelegte Dissertation in dieser oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner Institution eingereicht habe. Weiterhin erkläre ich, dass vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen wurden.

Düsseldorf, den

Lena Singer