

Universität Ulm  
Institut für Pathologie  
Prof. Dr. Peter Möller

Immunhistologische Biomarker als  
geschlechtsspezifische Indikatoren der zellulären  
Seneszenz

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
Lena Dietrich  
geboren in Erlangen

Ulm, 2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Wabitsch

Tag der Promotion: 19.05.2011

## Inhaltsverzeichnis

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| Abkürzungsverzeichnis | III |
|-----------------------|-----|

## **1 EINLEITUNG** **1**

|                                                                                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.1 Zusammenhänge zwischen Seneszenz, Geschlecht und Mutationen einzelner Gene</b> | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Zelluläre Seneszenz                                                             | 2         |
| 1.1.2 Zusammenhang zwischen Geschlecht und Lebenserwartung                            | 6         |
| 1.1.3 Zusammenhang zwischen Mutationen einzelner Gene und Lebenserwartung             | 8         |
| <b>1.2 Immunhistologische Biomarker zellulärer Seneszenz</b>                          | <b>10</b> |
| 1.2.1 eEF1A1                                                                          | 11        |
| 1.2.2 Stathmin                                                                        | 12        |
| 1.2.3 p73                                                                             | 12        |
| 1.2.4 Ogg1                                                                            | 14        |
| 1.2.5 Aktin                                                                           | 16        |
| 1.2.6 Tankyrase 1                                                                     | 17        |
| 1.2.7 Cathelicidin                                                                    | 18        |
| <b>1.3 Zielsetzung</b>                                                                | <b>20</b> |

## **2 MATERIAL UND METHODEN** **21**

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| <b>2.1 Material</b>                            | <b>21</b> |
| 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien         | 21        |
| 2.1.2 Lösungen und Medien                      | 23        |
| 2.1.3 Humanes Gewebe                           | 25        |
| <b>2.2 Methoden</b>                            | <b>27</b> |
| 2.2.1 Allgemeines Prinzip der Immunhistochemie | 27        |
| 2.2.2 Versuchsreihenfolge                      | 28        |
| 2.2.3 Primärantikörper                         | 29        |

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| 2.2.4 Arbeitsabläufe der immunhistochemischen Methoden    | 29 |
| 2.2.5 Vorversuche                                         | 32 |
| 2.2.6 Fibroblasten                                        | 35 |
| 2.2.7 Zellkultur                                          | 35 |
| 2.2.8 Herstellung von Zytospinpräparaten                  | 36 |
| 2.2.9 Immunhistochemie der Fibroblasten-Zytospinpräparate | 37 |
| 2.2.10 Mikroskopische Auswertung                          | 40 |

### **3 ERGEBNISSE** **41**

|                                                                               |           |
|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3.1 Ergebnisse der Vorversuche</b>                                         | <b>41</b> |
| <b>3.2 Ergebnisse der Immunhistochemie der Fibroblasten-Zytospinpräparate</b> | <b>43</b> |
| 3.2.1 Anti-eEF1A1                                                             | 43        |
| 3.2.2 Anti-Stathmin                                                           | 46        |
| 3.2.3 Anti-p73                                                                | 48        |
| 3.2.4 Anti-Ogg1                                                               | 50        |
| 3.2.5 Anti-Aktin                                                              | 52        |
| 3.2.6 Anti-Tankyrase                                                          | 54        |

### **4 DISKUSSION** **56**

### **5 ZUSAMMENFASSUNG** **64**

### **6 LITERATURVERZEICHNIS** **66**

|            |    |
|------------|----|
| Danksagung | 82 |
| Lebenslauf | 83 |

**Abkürzungsverzeichnis**

|        |                                                                           |
|--------|---------------------------------------------------------------------------|
| 3' UTR | three prime untranslated region (3' untranslatierter Bereich)             |
| 8-OxoG | 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin                                                   |
| A      | Adenin                                                                    |
| Abb    | Abbildung                                                                 |
| ad     | aqua destillata                                                           |
| ADP    | Adenosindiphosphat                                                        |
| AK     | Antikörper                                                                |
| ANK    | Ankyrin                                                                   |
| ATP    | Adenosintriphosphat                                                       |
| BER    | Basenexzisionsreparatur                                                   |
| C      | Cytosin                                                                   |
| Cdk    | Cyclin-abhängige Proteinkinase                                            |
| DAB    | 3,3-Diaminobenzidin                                                       |
| DBD    | DNA-Bindungsdomäne                                                        |
| DNA    | Desoxyribonukleinsäure                                                    |
| EDTA   | Ethylendiamintetraacetat                                                  |
| ELISA  | enzyme-linked immunosorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest) |
| etc    | et cetera                                                                 |
| FCS    | fetal calf serum (fetales Kälberserum)                                    |
| G      | Guanin                                                                    |
| H      | Wasserstoff                                                               |
| HEK    | human embryonal kidney                                                    |
| IHC    | Immunhistochemie                                                          |
| miRNA  | MicroRNA                                                                  |
| MK     | Mikrowelle                                                                |
| mRNA   | mitochondriale RNA                                                        |
| N      | Stickstoff                                                                |
| O      | Sauerstoff                                                                |

|           |                                                           |
|-----------|-----------------------------------------------------------|
| OD        | Oligomerisationsdomäne                                    |
| PARP      | Poly (ADP-ribose) polymerase                              |
| PBS       | phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PCR       | polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)     |
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin                                   |
| RNA       | Ribonukleinsäure                                          |
| ROS       | reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffverbindungen) |
| rpm       | rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)             |
| RT        | Raumtemperatur                                            |
| Ser       | Serin                                                     |
| SKT       | Schnellkochtopf                                           |
| T         | Thymin                                                    |
| Tab       | Tabelle                                                   |
| TAD       | Transaktivierungsdomäne                                   |
| TRF       | telomeric repeat binding factor                           |
| tRNA      | transfer-RNA                                              |
| TRS       | target retrieval solution                                 |
| UV        | Ultraviolett                                              |

Für sämtliche physikalische Einheiten wurden die international anerkannten Abkürzungen verwendet.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Zusammenhänge zwischen Seneszenz, Geschlecht und Mutationen einzelner Gene

Der Fachbegriff Seneszenz (lateinisch: senescere = altern) steht für das Altern und die damit verbundenen organischen Prozesse, die zwangsläufig irgendwann zum Tod des Organismus führen.

In der Biogerontologie gibt es eine Vielzahl unterschiedlicher Theorien, die die Ursachen und Folgen dieses Alterns erklären wollen. Diese Theorien gehen teilweise fließend ineinander über, so dass die Abgrenzung voneinander nur schwer gelingt. Hayflick wählte eine Einteilung in genombasierte, physiologische und organbasierte Theorien (Hayflick, 1985a), während andere Autoren beispielsweise zwischen Fehler- und Programmtheorien (Blagosklonny, 2007; Dice, 1993) oder zwischen stochastischer, Entwicklungs-, Programm- und Freier-Radikal-Theorie (Knight, 1995) unterscheiden.

Fest steht, dass das Altwerden auf mehreren Ebenen abläuft, angefangen bei Molekülen, über Zellen und Organe, bis hin zum gesamten Organismus eines Lebewesens (Stadtman, 1992; Kirkwood, 2005) und eine einzige Erklärung der Altersvorgänge daher kaum möglich ist.

Diese Promotionsarbeit beschäftigt sich insbesondere mit dem Altern auf Zellebene und untersucht in diesem Kontext die Expression einzelner Proteine und auch mögliche geschlechtsspezifische Unterschiede. Im Folgenden soll deshalb ein Überblick des bisher Bekannten zur zellulären Seneszenz gegeben werden, außerdem Zusammenhänge zwischen Geschlecht und Lebenserwartung sowie zwischen Mutationen einzelner Gene und Lebenserwartung aufgezeigt werden.

### 1.1.1 Zelluläre Seneszenz

1961 entdeckten Hayflick und Moorhead, dass kultivierte Fibroblasten nach einer bestimmten Anzahl an durchgemachten Zellteilungen nicht mehr in der Lage sind, sich erneut zu teilen, aber dennoch über längere Zeit in vitro lebensfähig bleiben. Dieser Teilungsstopp wird seither „Hayflick-Limit“ genannt (Hayflick und Moorhead, 1961).

Während fortschreitender physiologischer Alterung bis hin zum Hayflick-Limit durchleben die Fibroblasten diverse Veränderungen. Der „seneszente Phänotyp“ zeichnet sich schließlich durch drei Kriterien aus: Irreversibler Zellzyklusstillstand in der G1/G0-Phase, Resistenz gegenüber Apoptose sowie veränderte Zellfunktion und -morphologie (Wang, 1995; Campisi, 1996). Letzteres ist mikroskopisch deutlich an der Zellgrößen- und -volumenzunahme (siehe Abb. 1), der Anreicherung von intrazellulären Vesikeln sowie der flachen und irregulären Zellform zu erkennen (Goldstein, 1990).

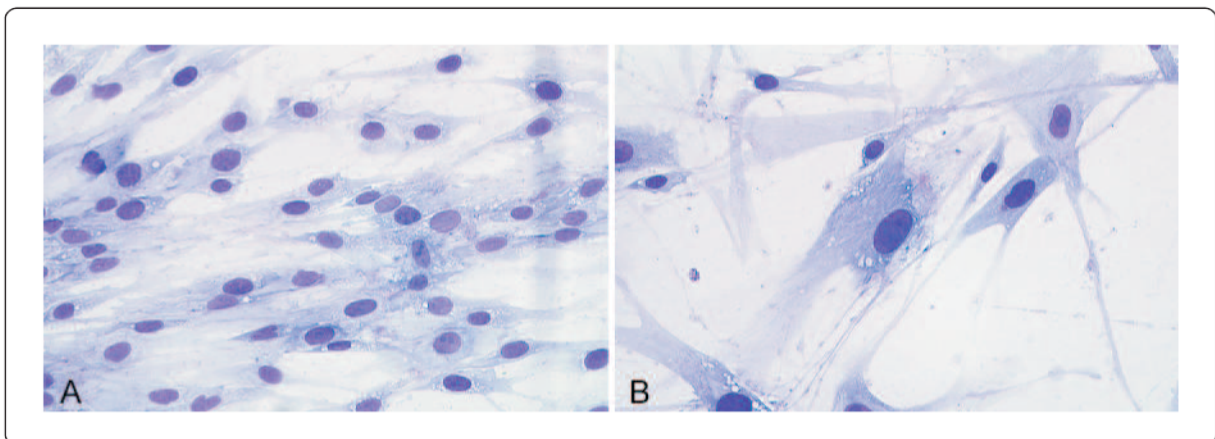


Abb. 1: Mikroskopische Bilder (identischer Vergrößerung (40-faches Objektiv)) junger und seneszenten Fibroblasten. A: junge Fibroblasten; B: seneszente Fibroblasten; Färbung: May-Grünwald-Gimsa;

In der Programmtheorie postulierte Hayflick 1968, dass alle biologischen Entwicklungsphasen von genetischen Programmen gesteuert werden und auch Veränderungen nach abgeschlossener Entwicklung, also Altersveränderungen, molekularen Signalen folgen, die ihre Information der DNA entnehmen. Sie sind, wie die Entwicklungsprozesse, als genetische Information programmiert und müssen nur abgespielt

werden (Hayflick, 1985b). Heute bezeichnen wir dieses „Programm“, das am Hayflick-Limit oder nach irreparablen DNA-Schäden aktiviert wird und weitere Zellteilungen verhindert, als zelluläre Seneszenz.

Diese kann man nach ihren Ursachen in vorzeitige und replikative Seneszenz einteilen:

Letztere kommt durch die Verkürzung der Telomere zustande (Chen et al., 2007). Telomere bestehen beim Menschen aus sich wiederholenden TTAGGG-Sequenzblöcken und befinden sich an den Chromosomenenden schützend vor den kodierenden DNA-Anteilen des Chromosoms (Blackburn, 1997). Bei somatischen Zellen ist die Länge der Telomere proliferationslimitierend. Sie verkürzt sich bei jeder einzelnen Zellteilung, bis nach einer bestimmten Anzahl von Mitosen eine minimale Länge erreicht ist (Harley et al., 1990). Mit dieser Verkürzung verlieren die Telomere ihre schützende Funktion an den Chromosomenenden, ihr Fehlen löst eine DNA-Schadensantwort aus, die über den M1-Checkpoint zum Stillstand des Zellzyklus, also zur Seneszenz, oder über den sogenannten „Crisis-Checkpoint“ zum Zelltod führt (Wright und Shay, 1992). Beide Checkpoints limitieren die replikative Lebensspanne von Zellen, gleichzeitig wirken sie aber auch als Tumorsuppressoren, indem sie eventuell entstandene transformierte Zellen an ihrer weiteren Proliferation hindern (Nalapareddy et al., 2008).

Die vorzeitige Seneszenz tritt aufgrund Erbgutschädigungen durch UV- oder Gammastrahlung und vor allem durch reaktive Sauerstoffradikale (englisch: reactive oxygen species, ROS) ein. Diese entstehen hauptsächlich als Nebenprodukt der zellulären Atmungskette in den Mitochondrien der Zellen (Beckman und Ames, 1998). Aber auch Umwelteinflüsse wie Nahrung, Giftstoffe in Abgasen, Zigarettenrauch etc. können Ursachen der Entstehung sein. Im Normalfall besteht im menschlichen Organismus ein Gleichgewicht zwischen den physiologisch ständig entstehenden ROS und den die Zellen schützenden Antioxidationssystemen. Kippt dieses Gleichgewicht aufgrund äußerer Einflüsse auf die Seite der freien Radikale, spricht man von oxidativem Stress, dessen Folgen unter anderem Proteinoxidationen, Lipidperoxida-

tionen und Nukleinsäure-Mutationen sein können. Es ist erwiesen, dass ROS sowie oxidative Schäden an DNA, Proteinen und Lipiden im Alter zunehmen (Sohal et al., 1994; Lee et al., 2002).

Da das mitochondriale Genom unter anderem für die Enzyme der Atmungskette, die für eine regelrechte Atmungsfunktion verantwortlich sind, kodiert, kommt es bei seiner Schädigung zu Fehlern der oxidativen Phosphorylierung und so zur reduzierten ATP-Synthese und verminderter Energiezufuhr der Zelle (Linnane et al., 1989; Wei, 1992). Auch die anderen Zellkompartimente werden durch oxidativen Stress in Mitleiden-schaft gezogen, so dass dies über den ex- und intrinsischen Apoptoseweg zu Zellverlust, Gewebisdysfunktion und letztendlich zu Alterung führt (Lee und Wei, 2007).

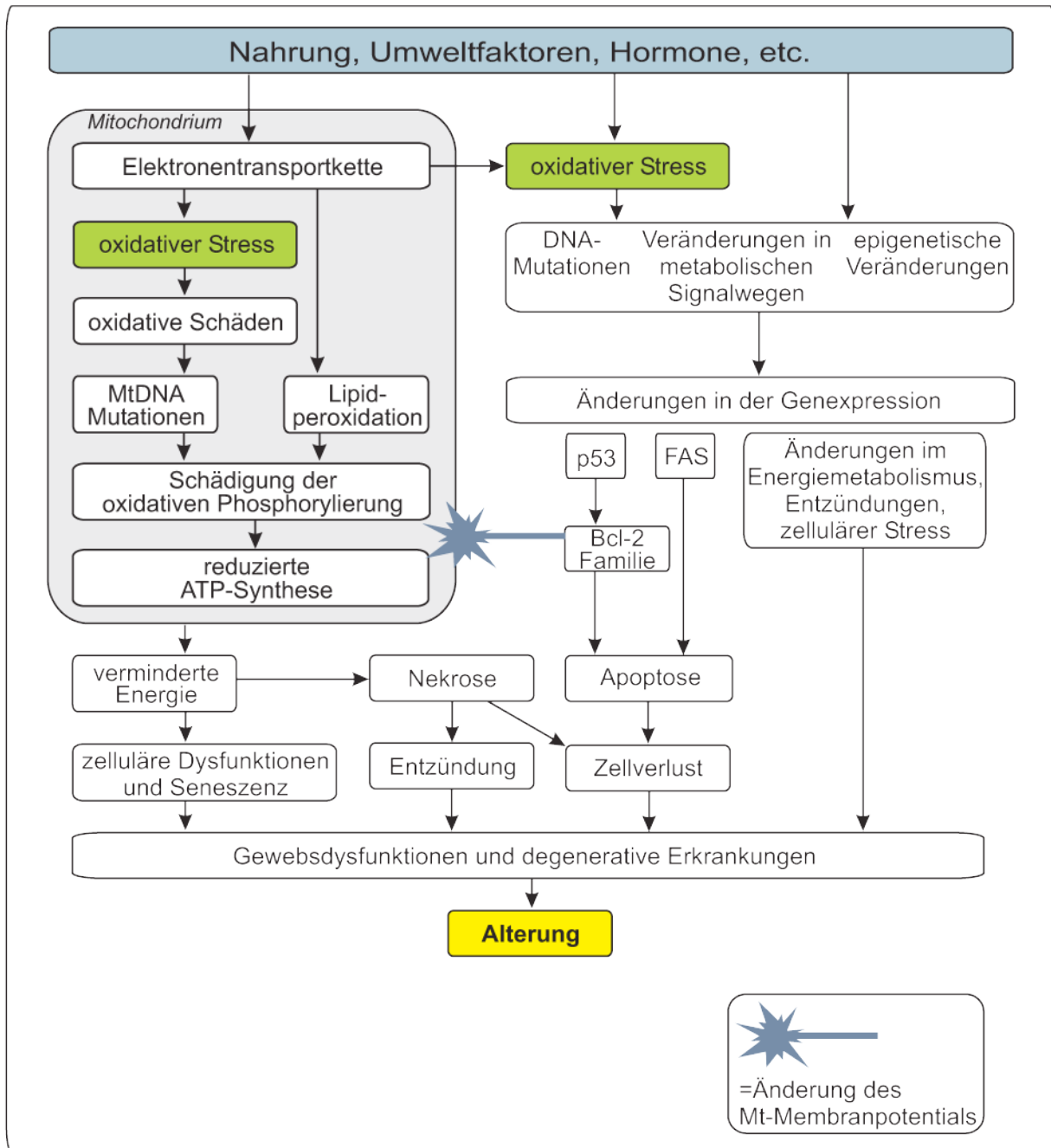


Abb. 2: Seneszenzentstehung durch oxidativen Stress.

MtDNA: mitochondriale Desoxyribonukleinsäure; Mt: mitochondrial; p53: Tumorsuppressorprotein. Stimuliert Freisetzung von Mitgliedern der Bcl-2-Familie. Bcl-2-Familie: Gruppe genetisch ähnlicher Proteine, deren Expression zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt. FAS: Transmembranprotein/ Zelloberflächenrezeptor. Bindung von FAS-Ligand an FAS-Rezeptor löst Apoptose aus.

Alle oben genannten Ursachen der zellulären Seneszenz (Verkürzung der Telomere sowie Erbgutschädigungen durch ROS, UV- oder Gammastrahlung) können in den Zellen neben einem Proliferationsstopp auch zu anderen Phänomenen, wie Apoptose oder, bei reparablen DNA-Schäden, zur Reparatur des Erbgutes führen.

Diese drei Mechanismen (Proliferationsstopp/Seneszenz, Apoptose und Reparatur) werden unter anderem vom Protein p53 signalisiert und sind für die Zelle tumorsuppressiv. In humanen Tumoren konnten Mutationen des p53-Gens nachgewiesen und so gezeigt werden, dass der Verlust dieses Gens einen Schritt in Richtung Malignität bedeutet (Jung et al., 2001). Wann die Zelle welchen der drei Wege einschlägt sowie deren genaue Signaltransduktion bleibt noch zu erforschen.

Tumor-, Keimbahn- und embryonale Stammzellen unterliegen nicht der zellulären Seneszenz. Sie können sich unendlich oft teilen, da sie Telomer-Verlängerungsmechanismen besitzen, die den regelmäßigen Verlust der Telomersequenzen ausgleichen: ein bestimmtes Enzym, die Telomerase, die abgespaltene Telomersequenzblöcke nach jeder Mitose wieder an die Telomere anfügt, und den sogenannten alternativen Weg (alternative pathway), der die Telomere über Rekombination verlängert (Blasco, 2003).

### **1.1.2 Zusammenhang zwischen Geschlecht und Lebenserwartung**

Laut der Pressemitteilung Nr. 336 vom 27.08.2007 des Statistischen Bundesamts Deutschlands betrug die durchschnittliche Lebenserwartung bei Geburt im Jahr 2006 für neugeborene Jungen 76,6 Jahre und für neugeborene Mädchen 82,1 Jahre. Daraus ergibt sich für letztere ein um 5,6 Jahre längeres Leben ([www.destatis.de](http://www.destatis.de)).

Die Frage, die sich nun stellt, ist, ob sich dies in biologischen, also vom Menschen nicht beeinflussbaren, Ursachen begründet oder eher von umwelt- oder verhaltensorientierten Faktoren abhängig ist.

Anzunehmen ist, dass die genannte Lebenserwartungsdifferenz der Geschlechter multiple Ursachen hat.

Sicherlich spielen die unterschiedlichen Lebensstile beider Geschlechter eine wichtige Rolle. Meist arbeiten Männer in risiko- und stressreicheren Berufen, rauchen und trinken mehr als Frauen, ernähren sich ungesünder und sind häufiger übergewichtig (Nathanson, 1984; Waldron, 1985; Vallin J, 1995).

Doch auch biologische, bzw. genetische Faktoren könnten für die männliche Übersterblichkeit mitverantwortlich sein.

So gibt zum Beispiel die Tatsache, dass bereits männliche Säuglinge höhere Sterberaten aufweisen als weibliche, Grund zur Annahme, dass Frauen einen biologischen Überlebensvorteil besitzen (Waldron, 1985; Dinkel, 1984). Und auch bei vielen Tierarten sterben die männlichen Individuen eher als ihre weiblichen Artgenossen (Comfort, 1979).

Ein Überlebensnachteil wird auch von männlichen Androgenen, unter ihnen beispielsweise Testosteron, begründet. Ihre lebensverkürzende Wirkung wird von einer erhöhten Lebenserwartung kastrierter Männern belegt (Hamilton und Mestler, 1969) und ist wahrscheinlich auf schnelleren Verschleiß durch den von diesen Geschlechtshormonen ausgelösten, höheren Grundumsatz im männlichen Organismus zurückzuführen. Im Gegensatz dazu soll bei Frauen das Hormon Östrogen eine lebensverlängernde Wirkung haben. Mit den durch die Menopause bedingten Veränderungen des Östrogenhaushalts steigt die Sterblichkeit in Verbindung mit koronarer Herzkrankheit bei Frauen an (Kannel et al., 1976; Grodstein et al., 1997).

Außerdem gibt es die Theorie, die Frauen aufgrund ihres zusätzlichen X-Chromosoms größere Resistenz gegenüber Störungen X-gebundener Gene zuschreibt, da die Informationen dieser Gene bei Frauen doppelt gespeichert sind (Christensen et al., 2000). Männer sind demgemäß mit ihrem einzelnen X-Chromosom anfälliger gegenüber Störungen dieser Art und somit insgesamt weniger robust (Grodstein et al., 1997; Horiuchi, 1997; Luy, 2002).

Eine der heute am meisten favorisierten Theorien zur unterschiedlichen allgemeinen Lebenserwartung bezieht sich auf die Tatsache, dass bei männlichen Säugetieren ein erhöhter Spiegel an ROS existiert und deren Organismus deshalb oxidativem Stress vermehrt ausgesetzt ist (Vina und Borras, 2010; Ali et al., 2006; Malorni et al., 2007). Eine Studie von 2002 (Proteggente et al., 2002) zeigte z. B. eine signifikant geringere Konzentration der durch ROS modifizierten DNA-Base FAPY-Guanin bei gesunden nichtrauchenden Frauen im Vergleich zu gesunden nichtrauchenden Männern. Ein Trend zu niedrigeren Konzentrationen von 8-OxoG-Läsionen (siehe: 1.2.4) bei Frauen wurde in dieser Studie ebenfalls festgestellt. Der erhöhte Spiegel von ROS kann durchaus auch auf Grund der oben erwähnten Hormone mit verursacht sein. Einschränkend muß aber auch in Betracht gezogen werden, dass diese Hormone mit dem Altern des Individuums abnehmen und deshalb dann nur noch eine verminderte Rolle spielen sollten.

### **1.1.3 Zusammenhang zwischen Mutationen einzelner Gene und Lebenserwartung**

Beim Menschen kennt man sogenannte Progeroid-Syndrome, die aufgrund von Mutationen in nur einem oder wenigen Genen entstehen und Erkrankungen mit vorzeitiger Alterungssymptomatik darstellen. Die betroffenen Gene kodieren meist für Proteine, die an DNA-Reparatur, Apoptose- oder Zellzyklussteuerung beteiligt sind. Daneben gelten durch Mutationen dieser Gene ausgelöste defekte Telomerfunktion oder fehlerhafte Transkriptionskontrolle als Ursachen der Alterserkrankungen (Hirschfeld et al., 2007).

Zu den Progeroid-Syndromen gehört zum Beispiel die Erkrankung Xeroderma pigmentosum und das Cockayne-Syndrom, die beide auf Gendefekten von Proteinen der Nukleotidexzisionsreparatur beruhen (Cleaver, 2005; Andressoo und Hoeijmakers, 2005). Auch beim Werner-Syndrom liegt ein Genfehler vor: hier betrifft er die Helikase WRN, die an Reparaturmechanismen der DNA und an der Stabili-

sierung der Telo-mere beteiligt ist (Hickson, 2003). Ein weiteres Beispiel ist die Ataxia teleangiectatica. Bei diesem Alterungssyndrom ist das Gen, das für die Proteinkinase ATM kodiert, mutiert. Die Kinase sollte nach DNA-Strangbrüchen Proteine wie p53 aktivieren, damit bei Stillstand des Zellzyklus DNA-Reparaturen stattfinden können (Shiloh, 2003).

Die oben genannten, aber auch alle anderen nicht erwähnten Progeroid-Syndrome führen zu vorzeitiger Alterung und verfrühtem Lebensende, was folglich bedeutet, dass durchaus Gene existieren, die die Lebenserwartung negativ beeinflussen können. Obwohl die physiologische Seneszenz in einzelnen Punkten von den Alterungserkrankungen mit vorzeitiger Seneszenz abweicht, kann man dennoch allgemeingültige Erkenntnisse der Alterungsprozesse aus der Erforschung letzterer entnehmen. Auch bei gesund alternden Menschen können Genpolymorphismen, beziehungsweise unterschiedliche Genexpressionen die Lebenserwartung determinieren.

## 1.2 Immunhistologische Biomarker zellulärer Seneszenz

Immunhistologische Biomarker sind mittels Antikörperfärbung nachzuweisende, charakteristische biologische Merkmale, wie beispielsweise bestimmte im Gewebe vorliegende Proteine, die auf einen speziellen Prozess im Organismus, in diesem Fall die zelluläre Seneszenz, hinweisen.

Da sich mit dem Älterwerden seneszente Zellen im Gewebe anreichern, könnte man mit solchen Indikatoren seneszente Individuen eindeutig und besser identifizieren, als durch deren chronologisches Alter. Außerdem trägt die Erforschung solcher Biomarker dazu bei, die molekularen Grundlagen der zellulären Seneszenz besser zu verstehen, so dass man dem Ziel, Interventionsmöglichkeiten im Seneszenzprozess zu entdecken, ein kleines Stück näher käme. Da Tumorzellen immer weiter proliferieren, ohne der replikativen Seneszenz zu unterliegen, wäre beispielsweise eine Seneszenz-Induktion in Krebszellen tumorsuppressiv und damit von größtem Vorteil.

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurden sieben verschiedene Proteine, von denen man vermutet, dass sie in alten und jungen, sowie in männlichen und weiblichen Zellen unterschiedlich exprimiert werden, auf ihre Tauglichkeit als Seneszenzindikatoren untersucht und sollen nun vorgestellt werden.

Diese Proteine sind nicht zufällig ausgewählt, sondern haben entweder mit DNA-Reparatur, Apoptose- oder Zellzykluskontrolle zu tun, denn wie unter 1.1.3 schon erwähnt, sind bei Patienten mit Progeroid-Syndromen meist eben diese Gene defekt, oder sie zogen die Aufmerksamkeit durch aktuelle Forschung und Literatur auf sich.

Außerdem wurde die Auswahl einiger Proteine aufgrund einer im Institut für Pathologie der Universität Ulm von Daniel Baltimore durchgeführten Untersuchung getroffen. In der besagten Arbeit wurden Fibroblasten aus Adenoiden kleiner Kinder beider Geschlechter kultiviert, bis sie mikroskopisch als phänotypisch seneszent eingestuft werden konnten. Nach einer bestimmten Anzahl von Passagen, also bei verschiedenem In-vitro-Alter der Fibroblasten, wurden Zellpellets tiefgefroren und aus ihnen zu einem späteren Zeitpunkt RNA extrahiert. Anschließend wurden die RNAs mit einem „Pathway-focused Oligo GEArray“ der Firma Qiagen (USA - Frederick)

analysiert (Baltimore, 2010). Die Ergebnisse dieser Analyse legten den Grundstein für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Proteine Ogg1, Tankyrase und p73.

### 1.2.1 eEF1A1

Das EEF1A1-Gen kodiert für eine Isoform der  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryontischen Elongationsfaktor-1 $\alpha$  (eEF-1 $\alpha$ ). Dieser zählt zu den G-Proteinen und ist für die Elongationsphase der Proteinbiosynthese verantwortlich. Er kann in seiner aktiven Form Aminoacyl-tRNA-Moleküle binden, um sie an den Ribosomen auf der mRNA zu positionieren, die translatiert werden soll.

In einer Schweizer Veröffentlichung (Shepherd et al., 1989) wurde schon 1989 nicht nur ein Rückgang der Proteinbiosynthese im Zusammenhang mit geringeren Mengen des eEF-1 $\alpha$ -Proteins und dessen mRNA in *Drosophila melanogaster* festgestellt, sondern auch bemerkt, dass eine Überexpression des eEF-1 $\alpha$  bei Fruchtfliegen längeres Leben bewirkt. Des Weiteren verringert sich zum Ende der Lebensspanne von Fibroblasten die eEF-1 $\alpha$ -Menge und auch dessen enzymatische Aktivität (Cavallius et al., 1986).

In einer erst vor kurzem veröffentlichten proteomischen Analyse von Jiang konnten vier Proteine identifiziert werden, die in alternden Mäusen mit Telomerdysfunktion im Vergleich zu jungen Mäusen mit gesunder Telomerfunktion und auch im Blutplasma von alternden Menschen überexprimiert sind. Unter ihnen befindet sich eEF-1 $\alpha$  sowie die unter 1.2.2 und 1.2.7 aufgeführten Proteine Stathmin und Cathelicidin (Jiang et al., 2008).

### 1.2.2 Stathmin

Stathmin ist ein im Zytoplasma vorkommendes Phosphoprotein, das eine wichtige Rolle in der Regulation der Mikrotubulusbildung und damit im Zellzyklus spielt.

Mikrotubuli sind lange hohle Filamente, deren Wand aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulindimeren aufgebaut ist. Sie bilden unter anderem den für die Mitose notwendigen Spindelapparat von sich teilenden Zellen. Das Protein Stathmin besitzt eine aminoterminal regulatorische Domäne, die vier phosphorylierbare Serinreste (Ser16, Ser25, Ser38, Ser63) enthält. Wenn keiner der Reste phosphoryliert ist, lagert sich Stathmin mit zwei Dimeren  $\alpha/\beta$ -Tubulin zu einem sogenannten T2S-Komplex zusammen. Dies macht es den  $\alpha/\beta$ -Tubulindimeren unmöglich, zu polymerisieren und einen Mikrotubulus zu bilden (Curmi et al., 1997). Vor Beginn der Mitosephase des Zellzyklus wird Stathmin durch Proteinkinasen phosphoryliert und damit in seiner T2S-Komplexbindung inaktiviert. Die nun frei zur Verfügung stehenden  $\alpha/\beta$ -Tubulindimere bilden Mikrotubuli, die sich zur Mitosespindel zusammen lagern. Nach der Mitosephase erfolgt die Dephosphorylierung Stathmins, und die Zelle kann in eine neue Interphase übergehen (Rubin und Atweh, 2004). Fehler in der Ausbildung des Spindelapparats können zu numerischen Aberrationen oder Polyploidie und in deren Folge zu Zellzyklusstopp, Apoptose oder auch zu Tumorentstehung führen (Gavet et al., 1998).

### 1.2.3 p73

Das Protein p73 ist Mitglied der sogenannten p53-Familie, bestehend aus den Transkriptionsfaktoren p53, p63 und p73.

Unter ihnen ist der Tumorsuppressor p53 der meist- und bestuntersuchte. Hauptsächlich unterdrückt er das Tumorwachstum, indem er pro-apoptotische Zielgene, wie zum Beispiel Gene der BCL-2-Familie, aktiviert und so Apoptose auslöst (Cory und Adams, 2002). Aber auch der Eintritt in die Seneszenz, die durch die Expression des

Tumorunterdrückers ausgelöst wird, stoppt die Fähigkeit von Krebszellen zur verlängerten Proliferation.

In wieweit p63 und p73 ebenfalls Tumorsuppressor-Funktion besitzen, ist noch nicht ausreichend geklärt. Fest steht jedoch, dass aufgrund genotoxischer Einflüsse auch p73 aktiviert werden und dieses seinerseits über die Aktivierung von p53-Zielgenen Apoptose oder Zellzyklusstillstand auslösen kann (Zaika et al., 2001). Das ist möglich, da die Gene der p53-Familienmitglieder ähnlich organisiert sind. Sie besitzen alle eine aminoterminal Transaktivierungsdomäne (TAD), eine carboxyterminale Oligomerisationsdomäne (OD) sowie eine DNA-Bindungsdomäne (DBD). Letztere stimmt bei allen drei Genen zu 60% überein, was dazu führt, dass auch p63 und p73 in der Lage sind, sich an die Promotoren der p53-Zielgene zu binden und diese zu regulieren (Deyoung und Ellisen, 2007). Außerdem wird p73 bei oxidativem Stress oder DNA-Schädigungen von p53 transkriptionsaktiviert und ist in vielen Tumoren überexprimiert (Moll und Slade, 2004). Diese Überexpression betrifft jedoch oft die inaktiven Isoformen des Proteins (siehe unten), wie zum Beispiel bei Colon- und Mammakarzinomen (Wager et al., 2006). Denn jedes der Gene der p53-Familie kodiert für zwei verschiedene Transkripte, die von unterschiedlichen Promotoren generiert werden: Über den P1-Promotor entstehen Proteine, die alle oben genannten Domänen enthalten und damit die aktiven Isoformen der drei Transkriptionsfaktoren darstellen (TAp53, TAp63, TAp73). Über den P2-Promotor entstehen Transkripte ohne die aminoterminal TAD, also inaktive oder inhibitorische Isoformen der p53-Familienmitglieder ( $\Delta$ Np53,  $\Delta$ Np63,  $\Delta$ Np73). Diese besetzen die DNA-Bindungsplätze, können aber keine Genexpression aktivieren (Pietsch et al., 2008).

Ein anderes Argument, das dafür spricht, dass p73 eine Rolle im Seneszenzprozess spielt, ist, dass es die Transkription von Cdk 1- und Cyclin B- Genen unterdrückt, indem es die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors NF-Y schwächt (Jung et al., 2001), der essentiell für die Transkription dieser Gene ist (Yun et al., 1999). Die Cyclin-abhängigen Proteinkinasen, Cdks, steuern den Zellzyklus, wobei die durch Cyclin B und Cyclin A aktivierte Cdk 1 für den Übergang von der G2-Phase zur Mitose wichtig ist. In seneszenten Fibroblasten ist sowohl NF-Y inaktiviert, als auch

die Transkription von Cdk1- und Cyclin B- Genen irreversibel gehemmt (Jung et al., 2001).

Da NF-Y neben den Promotoren dieser beiden Gene auch noch an viele andere Promotoren bindet, könnte es sein, dass die Hemmung von NF-Y durch Mitglieder der p53-Familie ein genereller Mechanismus für Transkriptionshemmung in replikativer Seneszenz ist (Jung et al., 2001).

#### 1.2.4 Ogg1

Das Kürzel Ogg1 steht für die 8-Oxoguanin-Glykosylase, ein DNA-Glykosylase-Enzym, das für die Basenexzisionsreparatur der häufigen DNA-Mutation 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-OxoG) (siehe Abb. 3) verantwortlich ist (Klungland et al., 1999; Janssen et al., 2001).

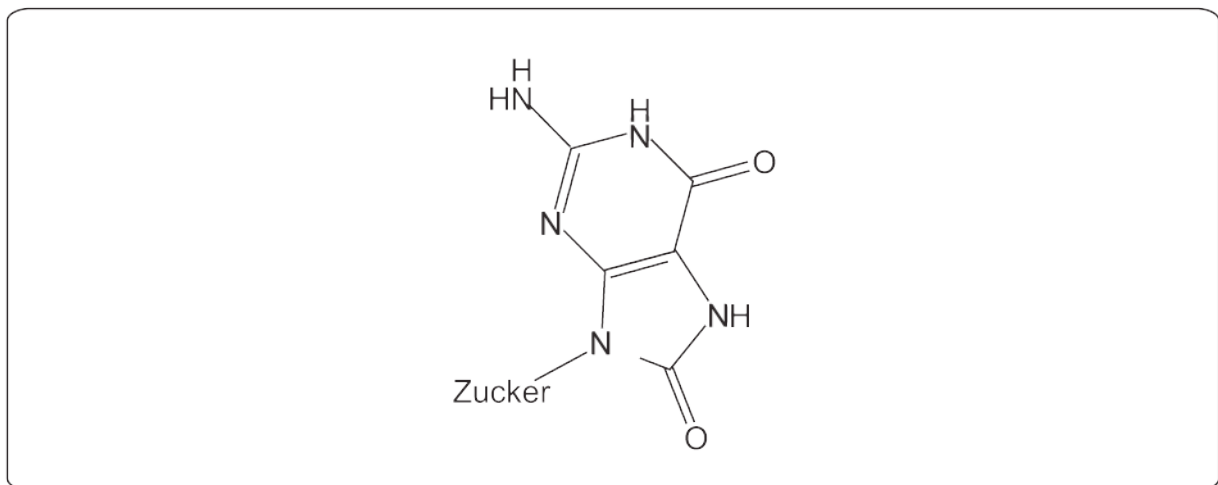


Abb. 3: 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-OxoG).

N: Stickstoff; O: Sauerstoff; H: Wasserstoff.

8-OxoG entsteht aufgrund schädigenden Einflusses von ROS in nukleärer sowie in mitochondrialer DNA und hat hohes mutagenes Potential, da bei der Replikation ihm gegenüber in der Nukleinsäure statt dem normalen Cytosin-Nukleotid auch ein Adenin-Nukleotid eingebaut werden kann. Dadurch entsteht eine GC- nach TA-Transversion (Boiteux und Radicella, 2000). Das Ogg1-Protein schützt das Genom

vor diesen Mutationen, indem es die 8-OxoG –Läsion durch den in Abb. 4 abgebildeten Mechanismus aus der DNA herausschneidet (Nakabeppu et al., 2007).

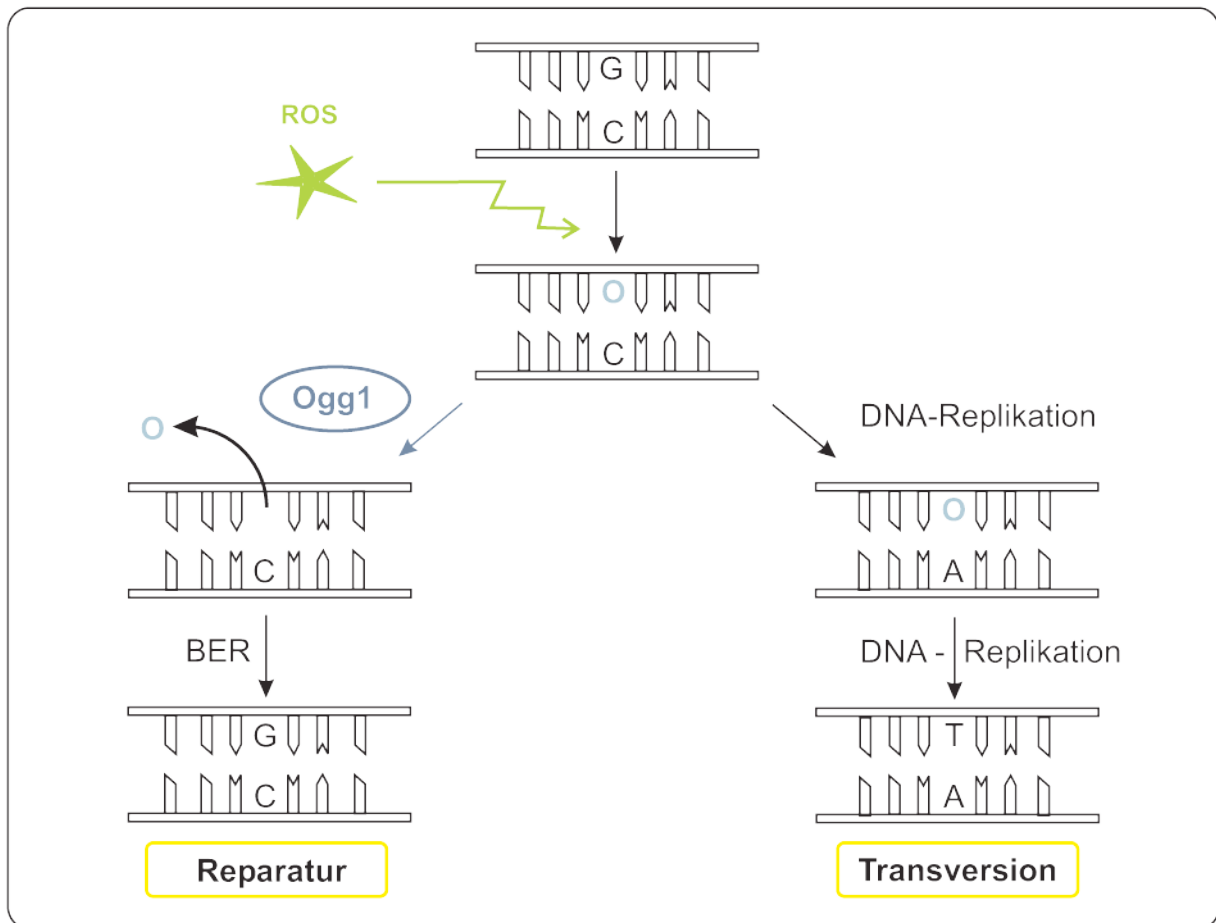


Abb. 4: Wirkung von Ogg1.

G: Guanin; C: Cytosin; O: 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin; A: Adenin; T: Thymin; ROS: reactive oxygen species; Ogg1: 8-Oxoguanin-Glykosylase; DNA: Desoxyribonukleinsäure; BER: base excision repair;

Das OGG1-Gen liegt auf Chromosom 3p25 und besteht aus acht Exons (Lu et al., 1997). Durch alternatives Splicing entstehen mindestens zwei Formen des humanen Ogg1-Proteins: Die  $\alpha$ -Form, aufgebaut aus 345 Aminosäuren und die  $\beta$ -Form, aufgebaut aus 424 Aminosäuren (Nishioka et al., 1999). Die ersten 316 Aminosäuren der beiden Proteine sind völlig identisch. Dennoch ist nur  $\alpha$ Ogg1 sowohl im Zellkern als auch in den Mitochondrien zu finden,  $\beta$ Ogg1 dagegen nur in den Mitochondrien (Minireview: (Boiteux und Radicella, 2000)).

Wie in 1.1.1 beschrieben stellen durch ROS ausgelöste Erbgutschäden die Ursache für die sogenannte „vorzeitige Seneszenz“ dar. Die 8-OxoG-Mutation ist ein solcher

durch ROS entstehender Erbgutschaden, der bei alten Mäusen (Kovtun et al., 2007) und Ratten (Souza-Pinto et al., 1999) im Vergleich zu jungen Tieren vermehrt nachgewiesen werden konnte. Deshalb ist auch anzunehmen, dass die Expression des 8-OxoG-Reparaturenzyms, also des Ogg1-Proteins, in jungen und seneszenten und/oder in männlichen und weiblichen Zellen variiert.

### 1.2.5 Aktin

Aktin ist schon lange in bezug auf seine zytoplasmatischen Funktionen bekannt. Es spielt beispielsweise eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport, als Strukturprotein des Zytoskeletts oder als Bestandteil des Muskelkontraktionsapparates (Franke, 2004).

Seneszente Zellen zeichnen sich in vitro durch eine veränderte Morphologie aus. Bekannte Charakteristika seneszenten Zellen sind unter anderem deutlich größere und flachere Zellkörper sowie vergrößerte Zellkerne (siehe 1.1.1 und Abb.1) (Start et al., 1991). Es wird vermutet, dass diese Veränderungen der Zellmorphologie eng mit der Aktin-Zytoskelett-Organisation zu tun haben (Lin et al., 1998).

Auch bei der Zellteilung spielt Aktin eine wichtige Rolle. Aktin interagiert hierbei zum einen mit den Mitosespindeln des Nukleus, um diese zu positionieren (Woolner et al., 2008), und zum anderen unträgt das Zytoskelett bei einer Zellteilung ebenfalls Umstrukturierungen. Daher ist ein funktionierendes Aktin-Poly- und Depolymerisationssystem essentiell: Aktin kann als einzelnes Molekül, als sogenanntes G-Aktin (=globuläres Aktin), vorliegen, oder aber mit Hilfe von Profilin zu F-Aktin (=filamentäres Aktin) polymerisieren (Pring et al., 1992). Im Gegenzug kann das Protein Cofilin die Dissoziation von G-Aktin vom Aktinpolymer fördern, wenn es sich selbst in seiner aktiven dephosphorylierten Form befindet (Iida et al., 1993). Aktin hat also auch nukleäre Funktionen: Neben der Positionierung der Mitosespindeln übernimmt es wahrscheinlich Aufgaben bei der RNA-Polymerase II-abhängigen Transkription, der post-transkriptionalen Prozessierung von RNA, dem aktiven nukleozytoplasmatischen

Transport an den Kernporen und bei der Chromatinpositionierung (Bettinger et al., 2004; Kiseleva et al., 2004).

Des Weiteren wird angenommen, dass globuläres Aktin eine Rolle bei der Induktion von Wachstumsstillstand während zellulärer Seneszenz spielt. In einer Studie von Kwak (Kwak et al., 2004) konnten in seneszenten diploiden Fibroblasten deutliche Ansammlungen von nukleärem G-Aktin, sowie von dephosphoryliertem Cofilin festgestellt werden. Außerdem stieg nach induziertem nukleärem G-Aktin-Export die DNA-Synthese in seneszenten Zellen signifikant an, worauf der Autor seine Vermutung aufbaut, dass ein Fehler im nukleären Aktin-Export direkt mit zellulärer Seneszenz in Verbindung stehen könnte.

In jedem Fall geben alle genannten Tatsachen und Vermutungen in bezug auf nukleäres Aktin Grund zur Annahme, dass dieses ein potentieller Marker für zelluläre Seneszenz sein könnte.

### **1.2.6 Tankyrase 1**

Das Protein Tankyrase 1 (TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 1) wurde aufgrund seiner Rolle in der Telomer-Replikation ausgewählt. Nach jeder DNA-Replikationsrunde verkürzten sich die Telomere eines Chromosoms ein kleines Stück, bis die Zelle ihre DNA an einem kritischen Punkt als defekt klassifiziert und in die replikative Seneszenz übergeht (D'Adda di Fagagna et al., 2003).

Tankyrase 1 enthält vier charakteristische Domänen (Seimiya, 2006). Zum Verständnis der Funktion des Proteins werden zwei dieser Domänen im Folgenden ausführlicher beschrieben: Die Ankyrin-Domäne stellt eine Plattform für Protein-Protein-Interaktionen dar und besteht wiederum aus fünf Untereinheiten, von denen jede für sich TRF1 (telomeric repeat binding factor 1) binden kann (Seimiya und Smith, 2002; De et al., 2003). TRF1 verhindert das Andocken des Telomer-Rekombinationsenzym Telomerase an das Telomer und hemmt somit dessen Elongation.

Die PARP (poly ADP-ribose polymerase) -Domäne katalysiert die ADP-Ribosylierung von TRF1 und entfernt dieses vom Telomer, damit die Telomerverlängerung stattfinden kann (Cook et al., 2002).

Da Tumorzellen hohe Telomeraseaktivität besitzen und durch ständige Telomerekombination der replikativen Seneszenz entgehen, wird Tankyrase1-, bzw. PARP-Inhibitoren viel Potenzial in der Krebstherapie zugeschrieben (Seimiya et al., 2002). In bezug auf diese Arbeit stellt sich die Frage, ob Tankyrase in alten Zellen vermindert oder kaum exprimiert wird, so dass die Telomerverlängerung zum Erliegen kommt und die Zelle in die Seneszenz übertritt.

### **1.2.7 Cathelicidin**

Die Cathelicidine stellen eine heterogene Familie von antimikrobiellen Polypeptiden dar, deren einzelne Mitglieder sich strukturell stark voneinander unterscheiden (Gennaro und Zanetti, 2000). Aufgrund ihrer N-terminalen Cathelin-Domäne, mit der die Peptide in ihrer inaktiven Speicherform verbunden sind, werden sie jedoch als Familie zusammengefasst.

Trotz der zahlreichen von den Säugetieren bekannten Mitglieder der Familie wurde bisher nur ein humanes Cathelicidin identifiziert: hCAP18 (Zanetti et al., 1995). Dieses wird nach Abspaltung seiner Cathelin-Domäne zum antimikrobiell aktiven Peptid LL-37 (Zanetti, 2004; Gudmundsson et al., 1996). LL-37 wird in neutrophilen Granulozyten gespeichert und von epithelialen Zellen vieler Gewebe freigesetzt. Es ist, wie auch andere antimikrobielle Peptide, Teil des angeborenen Immunsystems und spielt bei Abwehrreaktionen gegen grampositive und -negative Bakterien sowie bei vielen inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle (Benachour et al., 2009; Nagaoka et al., 2006).

Das Cathelicidin ist jedoch nicht nur in vielen entzündlichen Erkrankungen, wie beispielsweise Rosazea, Parodontitis oder Atopisches Ekzem überexprimiert (Yamasaki et al., 2007; Turkoglu et al., 2009), es induziert auch selbst Entzündungen,

indem es auf neutrophile Granulozyten, Monozyten und T-Zellen chemotaktisch wirkt (Yang et al., 2001). Es ist bekannt, dass die zelluläre Seneszenz von einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Faktoren begleitet ist, die die Ursache für speziell im Alter auftretende chronische Entzündungen sein könnte (Freund et al., 2010). Da das Cathelicidin LL-37 Immunzellen anlockt und aktiviert, könnte es ein ebensolcher proinflammatorischer Faktor sein, der nicht nur, wie bereits bekannt, in entzündeten, sondern auch in seneszenten Geweben überexprimiert ist.

Für einen Zusammenhang zwischen der Expression des Cathelicidins und Alterung sprechen weiterhin auch die von LL-37 gesteigerte Bildung von ROS sowie Interleukin 8 (Zheng et al., 2007), die beide in seneszenten Zellen vermehrt nachgewiesen werden können (Davalos et al., 2010; Wei und Lee, 2002).

### **1.3 Zielsetzung**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mögliche Unterschiede in der Expression der sieben unter 1.2 genannten Proteine in alten und jungen humanen Zellen beider Geschlechter immunhistochemisch nachzuweisen. Dazu werden Fibroblastenkulturen aus zehn verschiedenen Probanden untersucht, indem mit den jeweiligen Antikörpern der sieben Proteine immunhistochemische Färbungen durchgeführt und diese später mikroskopisch ausgewertet werden. Ein Unterschied in der Proteinexpression würde bedeuten, dass das betreffende Protein als Biomarker für zelluläre Seneszenz geeignet wäre.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tab. 1: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

| Geräte und Verbrauchsmaterialien                                                   | Firma                                |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Kulturflaschen Easy Flask (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> Kulturfläche) | Nunc GmbH; DE - Wiesbaden            |
| Latexhandschuhe DermaClean® puderfrei                                              | Ansell Healthcare; TH - Bangkok      |
| Schraubrohren für Zentrifuge (15ml, 50ml)                                          | Sarstedt; DE - Nümbrecht             |
| Mini Pap Pen                                                                       | Zytomed Systems; DE - Berlin         |
| Pasteurpipetten (150mm, ungestopft)                                                | Brand GmbH; DE - Wertheim            |
| Pasteurpipetten (230mm, ungestopft)                                                | Brand GmbH; DE - Wertheim            |
| Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips (10µl; 100µl)                                | Eppendorf; DE - Hamburg              |
| Pipettenspitzen Biosphere Filter Tips (1000µl blue)                                | Sarstedt; DE - Nümbrecht             |
| Elektrische Pipettierhilfe Finnpipette                                             | Thermo Scientific; DE - Braunschweig |
| Mikropipetten (10µl, 50µl, 100µl, 1000µl)                                          | Gilson; USA - Middleton              |
| Mikropipette (0,5 - 10µl)                                                          | Eppendorf; DE - Hamburg              |

Fortsetzung ->

Fortsetzung Tab. 1:

| Geräte und Verbrauchsmaterialien                   | Firma                                               |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Pipettierhilfe Pipetus                             | Hirschmann Laborgeräte;<br>DE - Eberstadt           |
| Serologische Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml, 50ml) | Nunc GmbH; DE - Wiesbaden                           |
| Standardreaktionsgefäß (1,5ml und 2,0ml)           | Eppendorf; DE - Hamburg                             |
| Vortexer Reax 2000                                 | Heidolph; DE - Kelheim                              |
| Werkbank                                           | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH; DE - Sonnenbühl |
| Zytospin-Zentrifuge Cytospin 3                     | Shandon/Thermo Sientific;<br>DE - Braunschweig      |
| Minizentrifuge                                     | National Labnet; USA - Woodbridge                   |
| Zentrifuge Megafuge 1.0                            | Heraeus Sepatech; DE - Osterode                     |
| Zentrifugen 5417 C und 5417 R                      | Eppendorf; DE - Hamburg                             |
| Zentrifugenröhren (15 ml, 50 ml)                   | Nunc GmbH; DE - Wiesbaden                           |
| Färbekasten für Objektträger                       | Hecht-Assistent; DE - Sondheim                      |
| Färberahmen für Objektträger                       | Hecht-Assistent; DE - Sondheim                      |
| Objektträger Superfrost plus                       | Thermo Scientific Menzel;<br>DE - Braunschweig      |
| Deckgläser 24mm × 50mm                             | VWR International; DE - Darmstadt                   |
| Heizplatte MR 3001                                 | Heidolph; DE - Kelheim                              |
| Schnellkochtopf Sicomatic-L                        | Silit; DE - Riedlingen                              |
| Steamer Multi Gourmet                              | Braun; DE - Kronberg                                |
| Mikrowelle                                         | Bosch; DE - Stuttgart                               |
| Mikroskop Axiophot                                 | Zeiss; DE - Jena                                    |

Fortsetzung-&gt;

Fortsetzung Tab.1:

| <b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>                       | <b>Firma</b>                       |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Digitale Fotokamera KY-F75U                                   | JVC; A - Wien                      |
| DISKUS 4.50 (Computerprogramm zur mikroskopischen Diskussion) | Carl H. Hilgers; DE - Königswinter |

### 2.1.2 Lösungen und Medien

Tab. 2: Lösungen und Medien.

| <b>Lösungen, Medien und deren Inhaltsstoffe</b>                          | <b>Firma, bzw. bei Selbsterstellung Inhaltsstoffe</b>                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Aceton (100%)                                                            | Roth; DE- Karlsruhe                                                                                                                                                           |
| Ethanol (70 %; 96-100%)                                                  | Merck; DE - Darmstadt                                                                                                                                                         |
| Formalin                                                                 | Roth; DE- Karlsruhe                                                                                                                                                           |
| Kollagenase                                                              | Sigma; USA - St. Louis                                                                                                                                                        |
| Triton X-100                                                             | Serva; DE - Heidelberg                                                                                                                                                        |
| FCS (fetal calf serum)                                                   | Seromed/ Biochrom KG; DE - Berlin                                                                                                                                             |
| Tween 20 (=Polysorbat-20)                                                | Applichem; DE - Darmstadt                                                                                                                                                     |
| L-Glutamin (200 mM)                                                      | Lonza; BE - Verviers                                                                                                                                                          |
| PBS (phosphate buffered saline)                                          | Selbsterstellung 15l-Ansatz:<br>13,8g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , +3,0g KCl, +3,0g<br>KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , +120,0 NaCl und mit a.d. auf<br>15l auffüllen. |
| Pen/ Strep (= Penicillin (10000U/ml) / Streptomycin (10000µg/ml)-Lösung) | Lonza; BE - Verviers                                                                                                                                                          |
| Trypsin/ EDTA (= 200 mg/l EDTA, 170000U Trypsin/l)                       | Lonza; BE - Verviers                                                                                                                                                          |

Fortsetzung -&gt;

Fortsetzung Tab. 2:

| <b>Lösungen, Medien und deren Inhaltsstoffe</b> | <b>Firma, bzw. bei Selbsterstellung Inhaltsstoffe</b>                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Citratpuffer (10mM, pH 6,0)                     | Selbsterstellung 5l-Ansatz:<br>9,6g Zitronensäure/ 5l a.d., pH 6 einstellen.                                                                                                                        |
| Zitronensäure                                   | Roth; DE- Karlsruhe                                                                                                                                                                                 |
| Primärantikörper                                | siehe 2.2.3 Primärantikörper                                                                                                                                                                        |
| Sekundärantikörper Anti Mouse Envision          | Dako; DK - Glostrup                                                                                                                                                                                 |
| Sekundärantikörper Anti Rabbit Envision         | Dako; DK - Glostrup                                                                                                                                                                                 |
| DAB (= 3,3'-Diaminobenzidin)                    | Dako; DK - Glostrup                                                                                                                                                                                 |
| Hämalaun                                        | Selbsterstellung 2l-Ansatz:<br>2g Hämatoxylin in 1800ml a.d. lösen, +0,4g Natriumjodat, +100g Kaliumaluminiumsulfat, +80g Chloralhydrat, +2g Citronensäure und alles auf 2000ml mit a.d. auffüllen. |
| Hämatoxylin                                     | Dako; DK - Glostrup                                                                                                                                                                                 |
| Natriumjodat                                    | Sigma; USA - St. Louis                                                                                                                                                                              |
| Kaliumaluminiumsulfat                           | Sigma; USA - St. Louis                                                                                                                                                                              |
| Chloralhydrat                                   | Meck; DE - Darmstadt                                                                                                                                                                                |
| Microscopy Aquatex                              | Meck; DE - Darmstadt                                                                                                                                                                                |
| Xylol                                           | Meck; DE - Darmstadt                                                                                                                                                                                |
| TRS (target retrieval solution) 10× Konzentrat  | Dako; DK - Glostrup                                                                                                                                                                                 |
| EDTA -Puffer pH 9, 10× Konzentrat               | Zytomed Systems; DE - Berlin                                                                                                                                                                        |
| Pronase                                         | Sigma; USA - St. Louis                                                                                                                                                                              |
| Iscove/ RPMI (Medien für Zellkultur)            | Lonza; BE - Verviers                                                                                                                                                                                |

### 2.1.3 Humanes Gewebe

Das Tonsillengewebe und die Fibroblastenkulturen entstammen der Gewebesammlung der Instituts für Pathologie der Universität Ulm. Das Einverständnis der Patienten zur Verwendung sämtlicher Proben liegt vor.

Die Namengebung der Fibroblastenkulturen gibt schnell über das für diese Arbeit wesentliche Alter und Geschlecht der Zellen Auskunft und setzt sich aus folgenden Kürzeln zusammen: F= Fibroblastenkultur, m= männlich, w= weiblich, j= jung, a= alt.

Es wurde Gewebe von Individuen zwischen 0 und 19 Lebensjahren als „jung“, Gewebe von Individuen zwischen 53 und 72 Jahren als „alt“ klassifiziert.

In der Alters- und Geschlechtsklassifikation identische Zellkulturen sind durch die Ziffern 1 bis 3 zu unterscheiden. So steht zum Beispiel „Fwj1“ für „Fibroblastenkultur: weiblich, jung, 1“ oder „Fma2“ für „Fibroblastenkultur: männlich, alt, 2“.

Es ist darauf zu achten, dass die Fibroblastenkulturen Fwa1 und Fma1, die in vivo nur 5 Jahre alt waren, als alte Zellen geführt werden, da sie in vitro bis zur 23./24. Passage gealtert sind. Ab der 23./24. Passage proliferierten diese Zellen nicht mehr weiter und konnten zu diesem Zeitpunkt mikroskopisch eindeutig als seneszent eingestuft werden.

Die Zelllinien HEK und Jurkat wurden von der Firma DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) aus Braunschweig (DE) bezogen, wobei letztere 1976 aus peripherem Blut eines männlichen Patienten mit akuter lymphoblastischer T-Zell-Leukämie etabliert wurde. Die Abkürzung HEK steht für „human embryonal kidney“ und damit für eine Zelllinie aus menschlichem embryonalen Nierengewebe, die mit Adenovirus Typ 5 transformiert wurde. Sie wächst adhärent und fibroblastoid.

Tab. 3: Zellkulturen und Zelllinien.

Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt; HEK (=human embryonal kidney): Zelllinie aus menschlichem embryonalen Nierengewebe; Jurkat: Zelllinie, gewonnen aus Blut eines Patienten mit T-Zell-Leukämie;

| Zellkulturen/<br>Zelllinien | Beschreibung     |                           | Patientendaten |               |
|-----------------------------|------------------|---------------------------|----------------|---------------|
|                             | Ursprungsgewebe  | Alter in vitro            | Geschlecht     | Alter in vivo |
| Fwj1                        | Haut             | 4. Passage                | weiblich       | 6 Jahre       |
| Fwa1                        | Adenoid          | 23. Passage               | weiblich       | 5 Jahre       |
| Fma1                        | Adenoid          | 26. Passage               | männlich       | 5 Jahre       |
| Fma2                        | Colon            | 3. Passage                | männlich       | 72 Jahre      |
| Fwa2                        | Lymphknoten      | 1. Passage                | weiblich       | 56 Jahre      |
| Fwa3                        | Colon            | 2. Passage                | weiblich       | 66 Jahre      |
| Fmj1                        | Lymphknoten      | 1. Passage                | männlich       | 19 Jahre      |
| Fma3                        | Lunge            | 5. Passage                | männlich       | 53 Jahre      |
| Fmj2                        | Haut             | 4. Passage                | männlich       | 0 Jahre       |
| HEK                         | Niere, embryonal | immortalisierte Zelllinie | weiblich       | -             |
| Jurkat                      | T-Zell-Leukämie  | immortalisierte Zelllinie | männlich       | -             |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeines Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) beruht auf der sogenannten Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der ein bestimmter Antikörper (AK) spezifisch das Epitop eines Antigens/Proteins bindet.

Bei der „direkten Methode“ ist der AK direkt mit einem Detektionssystem gekoppelt, das die Antigen-AK-Bindung sichtbar macht.

In dieser Arbeit wurde die IHC nach der „indirekten-Methode“ und mit Hilfe des DAB (=3,3'-Diaminobenzidin)-Farbnachweissystems durchgeführt. Hierbei wird in einem ersten Schritt ein gegen das zu findende Protein gerichteter Primärantikörper auf das zu untersuchende Präparat aufgetragen. Dieser kann entweder von Maus- oder von Kaninchenhybridomen abgeleitet sein. Als Nächstes wird ein zweiter enzymgekoppelter AK (=Sekundärantikörper) appliziert, der je nach Herkunft des Primärantikörpers entweder gegen Maus- oder Kaninchenimmunglobuline gerichtet ist und deshalb den Primär-AK bindet. Das an ihn gekoppelte Enzym, bei dieser Arbeit die Peroxidase, oxidiert das in einem dritten Schritt aufgetragene farblose Chromogen DAB zu einem farbigen (braunen) Endprodukt, das unter dem Mikroskop sichtbar ist (siehe Abb. 5).

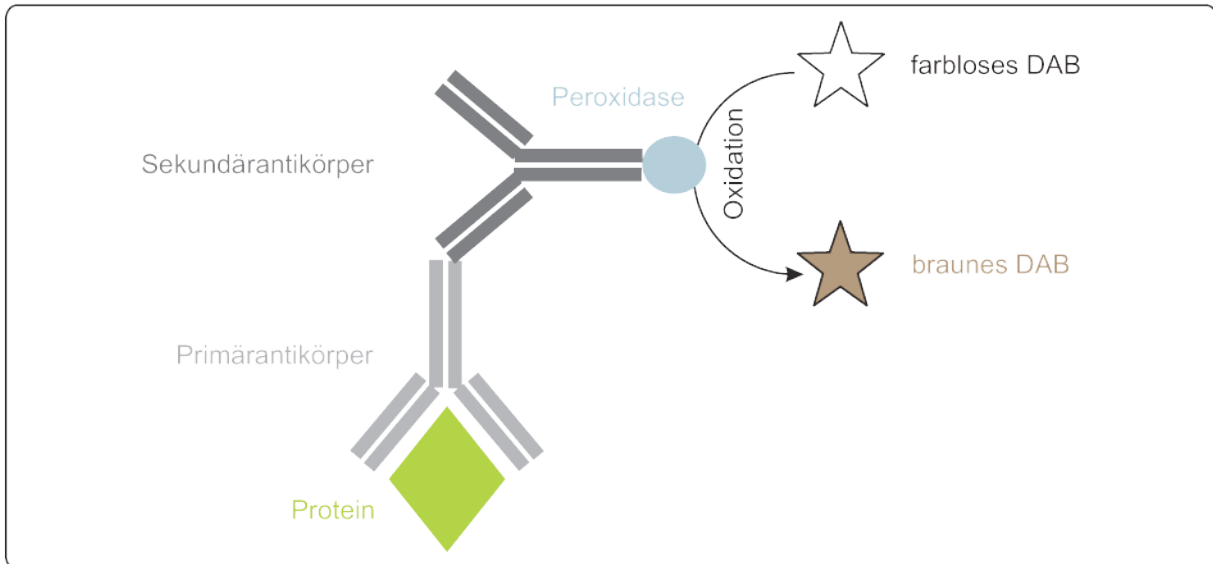


Abb. 5: Immunhistochemie nach „indirekter Methode“ und DAB-Farbnachweissystem.

DAB: 3,3'-Diaminobenzidin.

### 2.2.2 Versuchsreihenfolge

Ein optimales Ergebnis immunhistologischer Färbungen ist unter anderem stark von der Vorbehandlungsmethode der Präparate und der verwendeten Antikörperverdünnung abhängig. Diese wurden, in Vorversuchen an Frischmaterial (Tonsillen, Jurkat, HEK) und an Paraffinmaterial (Tonsillen) ermittelt, um dem immunhistologischen Nachweis der in 1.2 aufgeführten Proteine unter bestmöglichen Bedingungen durchführen zu können. Danach konnte dann mittels IHC in „indirekter-Methode“ die Expression der unter 1.2 benannten Proteine in Cytospinpräparaten alter und junger Fibroblasten beider Geschlechter nachgewiesen werden.

### 2.2.3 Primärantikörper

Tab. 4: Primärantikörper.

| Primär-AK         | Firma                  | mono-/polyklonal | hergestellt aus |
|-------------------|------------------------|------------------|-----------------|
| Anti-eEF1A1       | Abcam; USA - Cambridge | polyklonal       | Kaninchen       |
| Anti-Stathmin     | Abcam; USA - Cambridge | polyklonal       | Kaninchen       |
| Anti-p73          | Leica; DE - Wetzlar    | monoklonal       | Maus            |
| Anti-Ogg1         | Abcam; USA - Cambridge | polyklonal       | Kaninchen       |
| Anti-Aktin        | Sigma; USA - St. Louis | monoklonal       | Maus            |
| Anti-Tankyrase    | Abcam; USA - Cambridge | monoklonal       | Maus            |
| Anti-Cathelicidin | Abcam; USA - Cambridge | polyklonal       | Kaninchen       |

### 2.2.4 Arbeitsabläufe der immunhistochemischen Methoden

#### 2.2.4.1 Arbeitsablauf IHC:

- Cytospin-Objektträger 10min in Aceton (oder gegebenenfalls in Formalin) fixieren, lufttrocknen, mit Mini Pap Pen markieren.
- 50µl Primärantikörper auftragen, 60min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren. In PBS spülen.
- 50µl Sekundärantikörper (Anti Mouse Envision/Anti Rabbit Envision) auftragen, 30min bei RT inkubieren. In PBS spülen.
- 50µl DAB auftragen, 10min bei RT inkubieren. In Leitungswasser abstoppen.
- 3min in Hämalun gegenfärben. 10min in Leitungswasser spülen.

#### 2.2.4.2 Arbeitsablauf IHC mit Permeabilisierung:

- Cytospin-Objektträger 10min bei RT in Formalin fixieren.

- 3× in PBS waschen.
- 30min bei RT mit FCS-Triton X 100-PBS-Lösung (= 5ml FCS + 500µl Triton X 100 + 95ml PBS) blocken.
- 50µl Primärantikörper in PBS-Tween 20-Lösung (= 998ml PBS + 2ml Tween 20) ansetzen, auftragen und 30min bei 37°C inkubieren.
- 3× in PBS-Tween 20-Lösung waschen.
- 50µl Sekundärantikörper auftragen und 30min bei 37°C inkubieren.
- 3× in PBS-Tween 20-Lösung waschen.
- 50µl DAB auftragen, 10min bei RT inkubieren. Mit Leitungswasser abstoppen.
- 3min in Hämalaun gegenfärben. 10min in Leitungswasser spülen.

### 2.2.4.3 Arbeitsablauf IHC mit Schnellkochtopf:

- Cytospin-Objektträger 10min in Formalin fixieren. In a.d. spülen.
- Objektträger in Schnellkochtopf mit kochenden Citratpuffer (10mM, pH 6,0) stellen.
- Bei 150°C 20min inkubieren, herausnehmen und 20min abkühlen.
- Objektträger in a.d. spülen, vorsichtig um das Zellareal herum trocknen und mit Mini Pap Pen markieren.
- Objektträger kurz in PBS stellen.
- Primärantikörper auftragen, 60min bei RT inkubieren. In PBS spülen.
- Sekundärantikörper auftragen, 30min bei RT inkubieren. In PBS spülen.
- DAB auftragen, 10min bei RT inkubieren. Mit Leitungswasser abstoppen.
- 3min in Hämalaun gegenfärben. 10min in Leitungswasser spülen.

### 2.2.4.4 Arbeitsablauf IHC an Paraffinmaterial:

- Entparaffinierung:  
3× je 5min in Xylol stellen. In absolutem Alkohol spülen.  
Präparate durch eine absteigende Ethanolreihe (100% - 90% - 70%) führen und anschließend in a.d. spülen.
- Ggf. Peroxidase Block:  
Schnitte in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> einstellen, 10min bei RT inkubieren.

- Unterschiedliche Vorbehandlungen:

Steamer: Schnitte in den vorgeheizten und mit TRS- (pH 6,1) oder EDTA-Lösung (pH 9,0) befüllten Steamer einstellen und 20min inkubieren. 10min in Eiswasser abkühlen, dann in a.d. spülen.

Mikrowelle (MW): Schnitte 20min in Citratpuffer (10mM, pH 6,0) kochen. 4× 5min in a.d. in MW kochen, nach jeden 5min a.d. auffüllen.

Schnellkochtopf (SKT): Schnitte in SKT mit kochendem Citratpuffer (10mM, pH 6,0) stellen und bei 150°C 20min inkubieren. 20min abkühlen lassen. In a.d. spülen.

- Ggf. Pronase:

100µl Pronase (1mg Pronase/ml a.d.) auftragen und genau 5min inkubieren, dann in a.d. spülen.

- Auftragen des AKs und Färbung:

Schnitte mit Mini Pap Pen markieren und in PBS stellen.

50µl Primär-AK auftragen, 30min bei RT inkubieren. In PBS spülen.

50µl Sekundär-AK auftragen, 30min bei RT inkubieren. In PBS spülen.

50µl DAB auftragen, 10min bei RT inkubieren. Mit Leitungswasser abstoppen.

3min in Hämalun gegenfärben. 10min in Leitungswasser spülen.

### 2.2.4.5 Eindecken:

Alle gefärbten Präparate wurden mit Microscopy Aquatex luftdicht eingedeckelt.

## 2.2.5 Vorversuche

Tab. 5: Vorversuche mit Anti-eEF1A1 und Anti-Stathmin.

IHC: Immunhistochemie; Perm.: Permeabilisierung; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; MW: Mikrowelle; SKT: Schnellkochtopf; TRS: Target Retrieval Solution; pH: pH-Wert; Jurkat: Zelllinie, gewonnen aus Blut eines Patienten mit T-Zell-Leukämie;

| IHC-Methode                | Anti-eEF1A1                    |                           | Anti-Stathmin            |                           |
|----------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                            | Verdünnungen                   | Testgewebe/<br>Testzellen | Verdünnungen             | Testgewebe/<br>Testzellen |
| IHC                        | 1:100<br>1:200<br>1:400        | Jurkat                    | 1:250<br>1:500<br>1:1000 | Tonsille                  |
| IHC mit Perm.              | 1:50                           | Jurkat                    | -                        | -                         |
| Paraffin,<br>EDTA (pH 9,0) | 1:25                           | Jurkat                    | 1:250                    | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>MW            | 1:25                           | Jurkat                    | 1:250                    | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>SKT           | 1:25<br>1:50<br>1:100<br>1:200 | Jurkat                    | 1:250                    | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>TRS (pH 6,0)  | 1:25                           | Jurkat                    | 1:250<br>1:500<br>1:1000 | Tonsille                  |

Tab. 6: Vorversuche mit Anti-p73 und Anti-Ogg1.

IHC: Immunhistochemie; Perm.: Permeabilisierung; EDTA: Ethyldiamintetraacetat; MW: Mikrowelle; SKT: Schnellkochtopf; TRS: Target Retrieval Solution; pH: pH-Wert; Jurkat: Zelllinie, gewonnen aus Blut eines Patienten mit T-Zell-Leukämie;

| IHC-Methode             | Anti-p73                        |                           | Anti-Ogg1               |                           |
|-------------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                         | Verdünnungen                    | Testgewebe/<br>Testzellen | Verdünnungen            | Testgewebe/<br>Testzellen |
| IHC                     | -                               | -                         | 1:100<br>1:200<br>1:400 | Jurkat                    |
| IHC mit Perm.           | 1:50<br>1:100<br>1:200<br>1:400 | Tonsille                  | -                       | -                         |
| Paraffin, EDTA (pH 9,0) | -                               | -                         | 1:100                   | Jurkat<br>+Tonsille       |
| Paraffin, MW            | -                               | -                         | 1:100                   | Jurkat<br>+Tonsille       |
| Paraffin, SKT           | 1:50<br>1:100                   | Tonsille                  | 1:50<br>1:100           | Jurkat<br>+Tonsille       |
| Paraffin, TRS (pH 6,0)  | 1:50<br>1:100                   | Tonsille                  | 1:100                   | Jurkat<br>+Tonsille       |

Tab. 7: Vorversuche mit Anti-Aktin und Anti-Tankyrase.

IHC: Immunhistochemie; Perm.: Permeabilisierung; Formalinfix.: Formalinfixierung; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; MW: Mikrowelle; SKT: Schnellkochtopf; TRS: Target Retrieval Solution; pH: pH-Wert; HEK (=human embryonal kidney): Zelllinie aus menschlichem embryonalen Nierengewebe;

| IHC-Methode                | Anti-Aktin                        |                           | Anti-Tankyrase          |                           |
|----------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                            | Verdünnungen                      | Testgewebe/<br>Testzellen | Verdünnungen            | Testgewebe/<br>Testzellen |
| IHC                        | 1:500<br>1:250                    | Tonsille                  | 1:100<br>1:200<br>1:400 | HEK                       |
| IHC<br>+Formalinfix.       | -                                 | -                         | 1:25                    | Tonsille                  |
| IHC mit Perm.              | -                                 | -                         | 1:100<br>1:200<br>1:400 | HEK                       |
| Paraffin,<br>EDTA (pH 9,0) | 1:100<br>1:250<br>1:500<br>1:1000 | Tonsille                  | 1:50                    | HEK                       |
| Paraffin,<br>MW            | 1:100                             | Tonsille                  | 1:50                    | HEK                       |
| Paraffin,<br>SKT           | 1:100                             | Tonsille                  | 1:50<br>1:25            | HEK +Tonsille             |
|                            |                                   |                           | 1:25                    | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>TRS (pH 6,1)  | 1:100                             | Tonsille                  | 1:50                    | HEK                       |

Tab. 8: Vorversuche mit Anti-Cathelicidin.

IHC: Immunhistochemie; Perox.: Peroxidase; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; MW: Mikrowelle; SKT: Schnellkochtopf; TRS: Target Retrieval Solution; pH: pH-Wert.

| IHC-Methode                                         | Anti-Cathelicidin     |                           |
|-----------------------------------------------------|-----------------------|---------------------------|
|                                                     | Verdünnungen          | Testgewebe/<br>Testzellen |
| IHC                                                 | 1:100                 | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>EDTA (pH 9,0)                          | 1:25<br>1:50<br>1:100 | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>EDTA (pH 9,0)<br>mit Perox. -<br>Block | 1:25<br>1:50<br>1:100 | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>MW                                     | 1:100                 | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>SKT                                    | 1:100                 | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>TRS (pH 6,1)                           | 1:100<br>1:100        | Tonsille                  |
| Paraffin,<br>TRS (pH 6,1)<br>mit Pronase            | 1:100                 | Tonsille                  |

### 2.2.6 Fibroblasten

Siehe 2.1.3 Humanes Gewebe.

### 2.2.7 Zellkultur

Das jeweilige Gewebe wurde mechanisch zerkleinert, mit Kollagenase enzymatisch dissoziiert und in folgendem Medium in Zellkulturflaschen angesetzt: 500ml Iscove/

RPMI 4:1, 50ml FCS, 5ml Glutamin, 5ml Pen/ Strep. Subkulturen wurden mit Trypsin/ EDTA hergestellt.

### **2.2.8 Herstellung von Zytospinpräparaten**

Die in 2.2.6 aufgeführten Fibroblasten wurden mit Trypsin/ EDTA geerntet, zentrifugiert und in PBS aufgenommen. Anschließend wurden je 70-100µl der Fibroblasten-Suspension in der Zytospin-Zentrifuge auf einen Objektträger bei 400rpm drei Minuten zentrifugiert. Die Präparate wurden fünf Minuten in Aceton fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei minus 80°C eingefroren.

### 2.2.9 Immunhistochemie der Fibroblasten-Zytospinpräparate

Tab. 9: IHC der Fibroblasten-Zytospinpräparate mit Anti-eEF1A1 und Anti-Stathmin.

IHC: Immunhistochemie; Perm.: Permeabilisierung; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt;

| Fibroblasten | Anti-eEF1A1   |            | Anti-Stathmin |            |
|--------------|---------------|------------|---------------|------------|
|              | IHC-Methode   | Verdünnung | IHC-Methode   | Verdünnung |
| Fwj1         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |
| Fwa1         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |
| Fma1         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |
| Fma2         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |
| Fwa2         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |
| Fwa3         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |
| Fmj1         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |
| Fma3         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |
| Fmj2         | IHC mit Perm. | 1:50       | IHC           | 1:250      |

Tab. 10: IHC der Fibroblasten-Zytospinpräparate mit Anti-p73 und Anti-Ogg1.

IHC: Immunhistochemie; Perm.: Permeabilisierung; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt;

| Fibroblasten | Anti-p73      |            | Anti-Ogg1   |            |
|--------------|---------------|------------|-------------|------------|
|              | IHC-Methode   | Verdünnung | IHC-Methode | Verdünnung |
| Fmj1         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |
| Fmj2         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |
| Fma1         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |
| Fma2         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |
| Fma3         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |
| Fwj1         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |
| Fwa1         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |
| Fwa2         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |
| Fwa3         | IHC mit Perm. | 1:100      | IHC         | 1:100      |

Tab. 11: IHC der Fibroblasten-Zytospinpräparate mit Anti-Aktin und Anti-Tankyrase.

IHC: Immunhistochemie; Formalinfix.: Formalinfixierung; SKT: Schnelkochtöpf; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt;

| Fibroblasten | Anti-Aktin  |            | Anti-Tankyrase            |            |
|--------------|-------------|------------|---------------------------|------------|
|              | IHC-Methode | Verdünnung | IHC-Methode               | Verdünnung |
| Fmj1         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |
| Fmj2         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |
| Fma1         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |
| Fma2         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |
| Fma3         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |
| Fwj1         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix.      | 1:25       |
|              |             |            | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |
| Fwa1         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |
| Fwa2         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |
| Fwa3         | IHC         | 1:400      | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25       |

Mit dem Antikörper Anti-Cathelicidin wurde keine Immunhistochemie an den Fibroblasten-Zytospinpräparaten durchgeführt, da die in den Vorversuchen getesteten IHC-Methoden zu keinem positiven Ergebnis führte.

### 2.2.10 Mikroskopische Auswertung

Die Vorversuche, sowie die IHC der Fibroblasten-Zytospinpräparate wurden am Zeiss Axiophot Mikroskop ausgewertet. Bei letzterer wurde das Ergebnis, also die Intensität der Braunfärbung, die die Expression des untersuchten Proteins widerspiegelt, folgendermaßen beurteilt: 0= keine sichtbare Anfärbung, (+)= schwache Anfärbung, += mäßig starke Anfärbung, ++= sehr starke Anfärbung.

Außerdem wurden die mit demselben Primärantikörper immunhistochemisch gefärbten Fibroblasten-Zytospinpräparate nach dem Schema der Abbildung 6 miteinander verglichen.

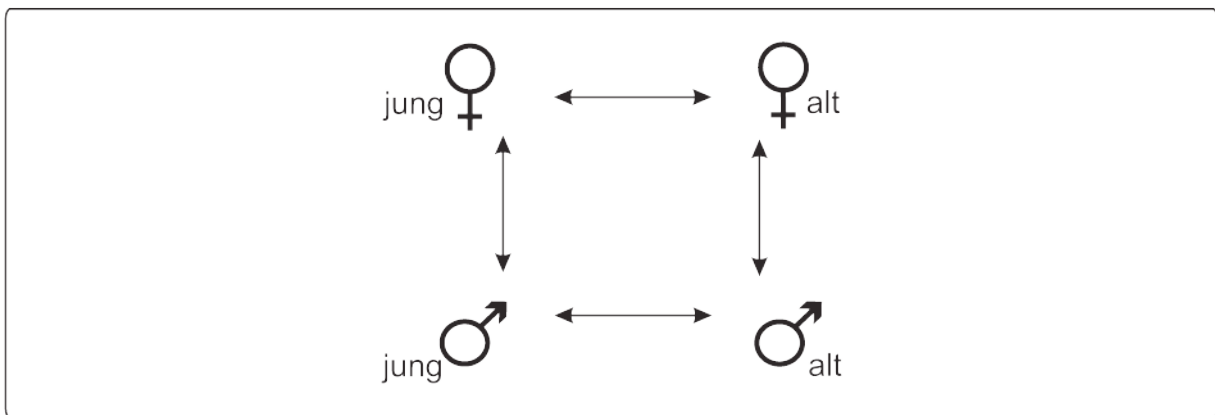


Abb. 6: Schema der mikroskopischen Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen der Fibroblasten-Zytospinpräparate.

Fotografien der mit vierzigfachem Objektiv mikroskopierten Präparate wurden mit einer JVC-Digitalkamera (Typ: KY-F75U) und der DISKUS 4.50 -Software zur mikroskopischen Diskussion, Bild-Aufnahme und -Dokumentation angefertigt.

Vor jeder neuen Fotografie wurde ein Weißabgleich der Kamera durchgeführt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Ergebnisse der Vorversuche

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Vorversuche, also die für den jeweiligen Antikörper anzuwendende immunhistochemische Methode und Verdünnung, die zu einer mikroskopisch eindeutig erkennbaren spezifischen Anfärbung führte, schriftlich aufgelistet. Anschließend sind Photographien der mit ebendiesen Methoden und Verdünnungen behandelten Präparate abgebildet.

Mit Anti-Cathelicidin war mit keinem immunhistologischen Versuchsprotokoll eine eindeutig spezifische Antikörperfärbung zu erzielen. Deshalb wurden mit diesem Antikörper später keine Färbungen an Fibroblastenpräparaten durchgeführt.

Tab. 12: Ergebnisse der Vorversuche.

IHC: Immunhistochemie; Perm.: Permeabilisierung; SKT: Schnellkochtopf; TRS: Target Retrieval Solution; EDTA: Ethylendiamintetraacetat; Formalinfix.: Formalinfixierung; pH: pH-Wert; Jurkat: Zelllinie, gewonnen aus Blut eines Patienten mit T-Zell-Leukämie;

| Antikörper        | IHC-Methode                                                | Verdünnung, gefärbtes Material |
|-------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Anti-eEF1A1       | IHC mit Perm.                                              | 1:50, Jurkat                   |
|                   | Paraffin, SKT                                              | 1:25, Jurkat                   |
| Anti-Stathmin     | IHC                                                        | 1:250, Tonsille                |
|                   | Paraffin, TRS (pH 6)                                       | 1:500, Tonsille                |
| Anti-p73          | IHC mit Perm.                                              | 1:100, Tonsille                |
|                   | Paraffin, SKT                                              | 1:50, Tonsille                 |
| Anti-Ogg1         | IHC                                                        | 1:100, Jurkat                  |
|                   | Paraffin, SKT                                              | 1:50, Jurkat                   |
| Anti-Aktin        | IHC                                                        | 1:500, Tonsille                |
|                   | Paraffin, EDTA                                             | 1:500, Tonsille                |
| Anti-Tankyrase    | IHC mit Formalinfix.                                       | 1:50, Tonsille                 |
|                   | Paraffin, SKT                                              | 1:25, Tonsille                 |
| Anti-Cathelicidin | Keine IHC-Methode und Verdünnung erwies sich als geeignet. |                                |

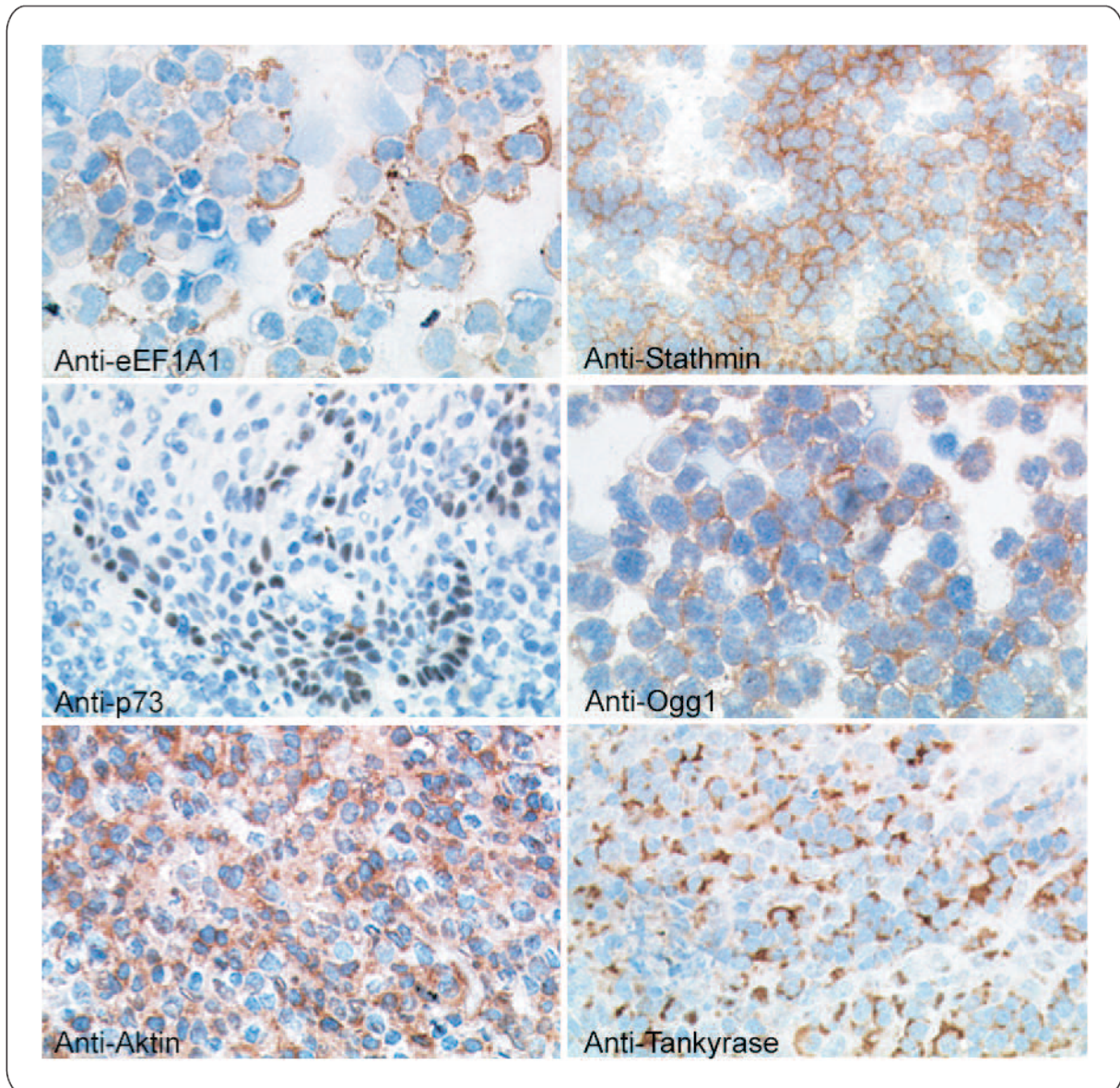


Abb. 7: Mikroskopischen Bilder (identischer Vergrößerung (40-faches Objektiv)) der Ergebnisse der Frischmaterial-Färbungen. Anti-eEF1A1: IHC mit Permeabilisierung an Jurkat, Antikörperverdünnung 1:50; Anti-Stathmin: IHC an Tonsille, Antikörperverdünnung 1:250; Anti-p73: IHC mit Permeabilisierung an Tonsille, Antikörperverdünnung 1:100; Anti-Ogg1: IHC an Jurkat, Antikörperverdünnung 1:100; Anti-Aktin: IHC an Tonsille, Antikörperverdünnung 1:500; Anti-Tankyrase: IHC mit Formalinfixierung an Tonsille, Antikörperverdünnung 1:50; Alle Präparate wurden mit dem DAB-Farbnachweissystem und Hämalaun-Gegenfärbung gefärbt. DAB: 3,3'-Diaminobenzidin; IHC: Immunhistochemie; Jurkat: Zelllinie, gewonnen aus Blut eines Patienten mit T-Zell-Leukämie;

## **3.2 Ergebnisse der Immunhistochemie der Fibroblasten-**

### **Zytospinpräparate**

#### **3.2.1 Anti-eEF1A1**

Anti-eEF1A1 konnte das Protein eEF1A1 in den Fibroblastenkulturen, ausgenommen der Kultur Fmj2, nicht nachweisen. Die Fibroblastenkultur Fmj2 zeigt, wie in Abbildung 8 ersichtlich, eine schwache Zytoplasmaanfärbung am Rand der Zellen.

Es ergaben sich weder signifikante Unterschiede bezüglich der Expression des Proteins in jungen, verglichen mit seneszenten, noch in männlichen, verglichen mit weiblichen, Fibroblasten.

Tab. 13: Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-eEF1A1.

IHC: Immunhistochemie; AK: Antikörper; Perm.: Permeabilisierung; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt; Bewertungsskala der Färbung: 0= keine sichtbare Anfärbung, (+)= schwache Anfärbung, += mäßig starke Anfärbung, ++= sehr starke Anfärbung.

| Anti-eEF1A1  |               |               |                      |
|--------------|---------------|---------------|----------------------|
| Fibroblasten | IHC-Methode   | AK-Verdünnung | Ergebnis der Färbung |
| Fmj1         | IHC mit Perm. | 1:50          | 0                    |
| Fmj2         | IHC mit Perm. | 1:50          | (+)                  |
| Fma1         | IHC mit Perm. | 1:50          | 0                    |
| Fma2         | IHC mit Perm. | 1:50          | 0                    |
| Fma3         | IHC mit Perm. | 1:50          | 0                    |
| Fwj1         | IHC mit Perm. | 1:50          | 0                    |
| Fwa1         | IHC mit Perm. | 1:50          | 0                    |
| Fwa2         | IHC mit Perm. | 1:50          | 0                    |
| Fwa3         | IHC mit Perm. | 1:50          | 0                    |

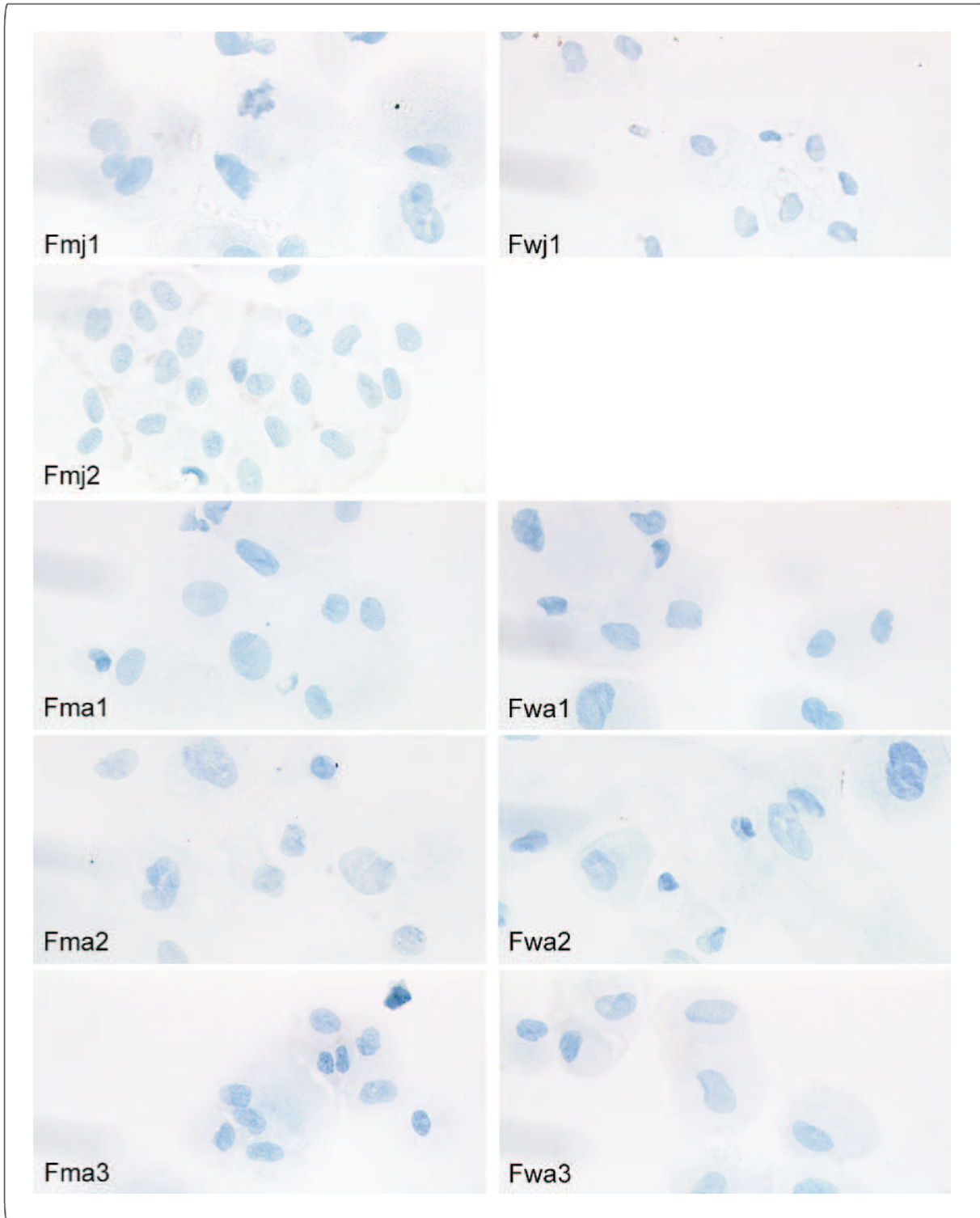


Abb. 8: Mikroskopische Bilder (identischer Vergrößerung (40-faches Objektiv)) der Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-eEF1A1. Immunhistochemie mit Permeabilisierung; Antikörperverdünnung 1:50; DAB-Farbnachweissystem; Hämalaun-Gegenfärbung; DAB: 3,3'-Diaminobenzidin; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt;

### 3.2.2 Anti-Stathmin

Die mikroskopische Auswertung der Immunhistochemie mit dem Antikörper Anti-Stathmin in einer Verdünnung 1:250 konnte nur bei dem Zytospinpräparat der Fibroblastenkultur Fwj1 eine schwache Braunfärbung des Zytoplasmas und somit ein geringes Vorkommen von Stathmin zeigen. Bei allen anderen Präparaten ließ sich Stathmin nicht nachweisen. Unterschiede in der Stathminexpression junger und alter Fibroblasten beider Geschlechter konnten durch diese Versuchsmethode nicht nachgewiesen werden.

Tab. 14: Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-Stathmin.

IHC: Immunhistochemie; AK: Antikörper; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt; Bewertungsskala der Färbung: 0= keine sichtbare Anfärbung, (+)= schwache Anfärbung, += mäßig starke Anfärbung, += sehr starke Anfärbung.

| Fibroblasten | Anti-Stathmin |               |                      |
|--------------|---------------|---------------|----------------------|
|              | IHC-Methode   | AK-Verdünnung | Ergebnis der Färbung |
| Fmj1         | IHC           | 1:250         | 0                    |
| Fmj2         | IHC           | 1:250         | 0                    |
| Fma1         | IHC           | 1:250         | 0                    |
| Fma2         | IHC           | 1:250         | 0                    |
| Fma3         | IHC           | 1:250         | 0                    |
| Fwj1         | IHC           | 1:250         | (+)                  |
| Fwa1         | IHC           | 1:250         | 0                    |
| Fwa2         | IHC           | 1:250         | 0                    |
| Fwa3         | IHC           | 1:250         | 0                    |

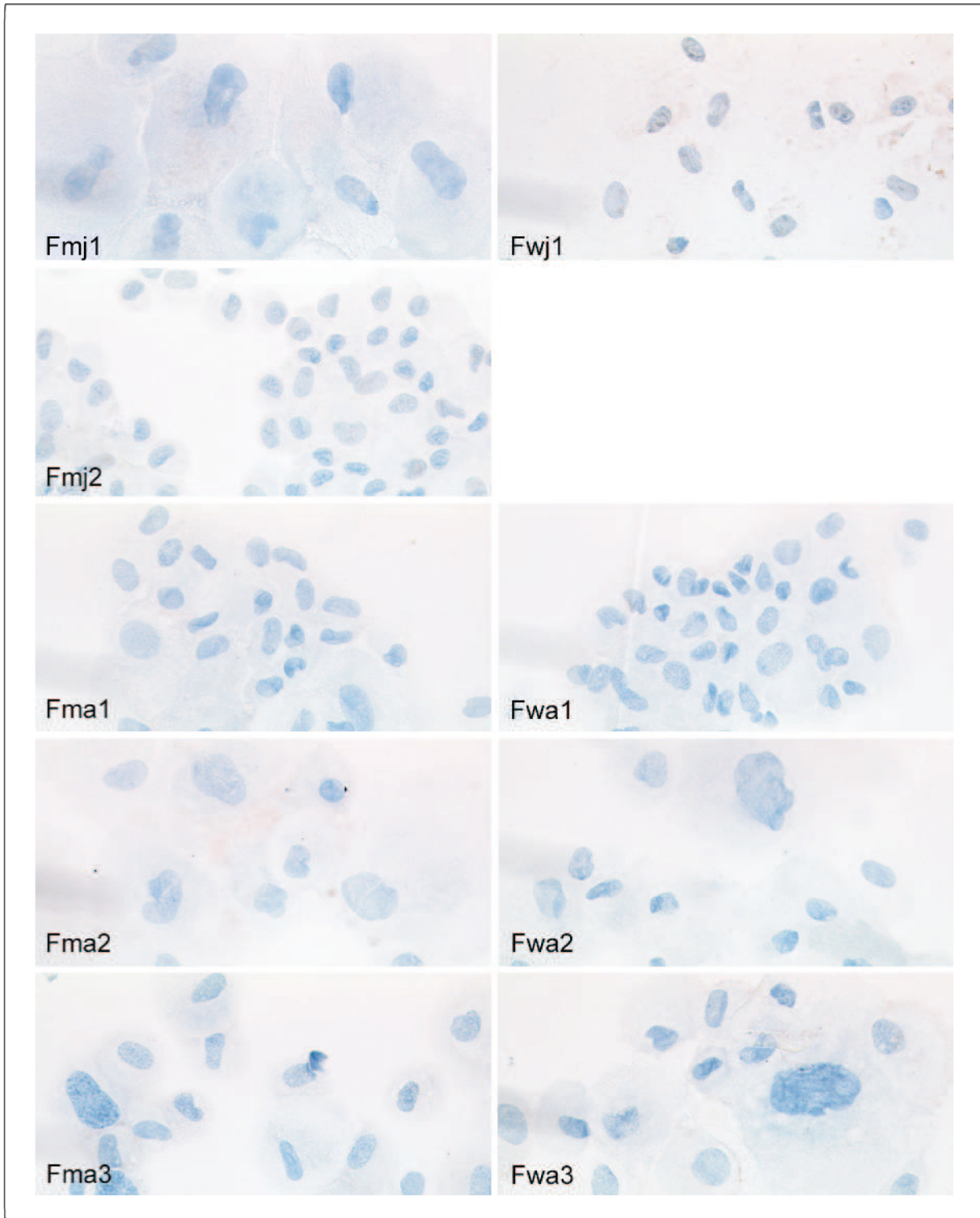


Abb. 9: Mikroskopische Bilder (identischer Vergrößerung (40-faches Objektiv)) der Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-Stathmin. Immunhistochemie; Antikörperverdünnung 1:250; DAB-Farbnachweissystem; Hämalaun-Gegenfärbung; DAB: 3,3'-Diaminobenzidin; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt;

### 3.2.3 Anti-p73

Alle mit dem Antikörper Anti-p73 behandelten Präparate zeigten eine mäßig starke bis sehr starke Braunfärbung, die das Vorhandensein des Proteins p73 in allen Zellkulturen belegt.

Leider konnten keine eindeutigen Unterschiede in der Proteinexpression in alten und jungen, noch in männlichen und weiblichen Fibroblasten festgestellt werden.

Tab. 15: Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-p73.

IHC: Immunhistochemie; Perm.: Permeabilisierung; AK: Antikörper; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt; Bewertungsskala der Färbung: 0= keine sichtbare Anfärbung, (+)= schwache Anfärbung, += mäßig starke Anfärbung, ++= sehr starke Anfärbung.

| Anti-p73     |               |               |                      |
|--------------|---------------|---------------|----------------------|
| Fibroblasten | IHC-Methode   | AK-Verdünnung | Ergebnis der Färbung |
| Fmj1         | IHC mit Perm. | 1:100         | ++                   |
| Fmj2         | IHC mit Perm. | 1:100         | ++                   |
| Fma1         | IHC mit Perm. | 1:100         | +                    |
| Fma2         | IHC mit Perm. | 1:100         | ++                   |
| Fma3         | IHC mit Perm. | 1:100         | ++                   |
| Fwj1         | IHC mit Perm. | 1:100         | +                    |
| Fwa1         | IHC mit Perm. | 1:100         | +                    |
| Fwa2         | IHC mit Perm. | 1:100         | +                    |
| Fwa3         | IHC mit Perm. | 1:100         | ++                   |

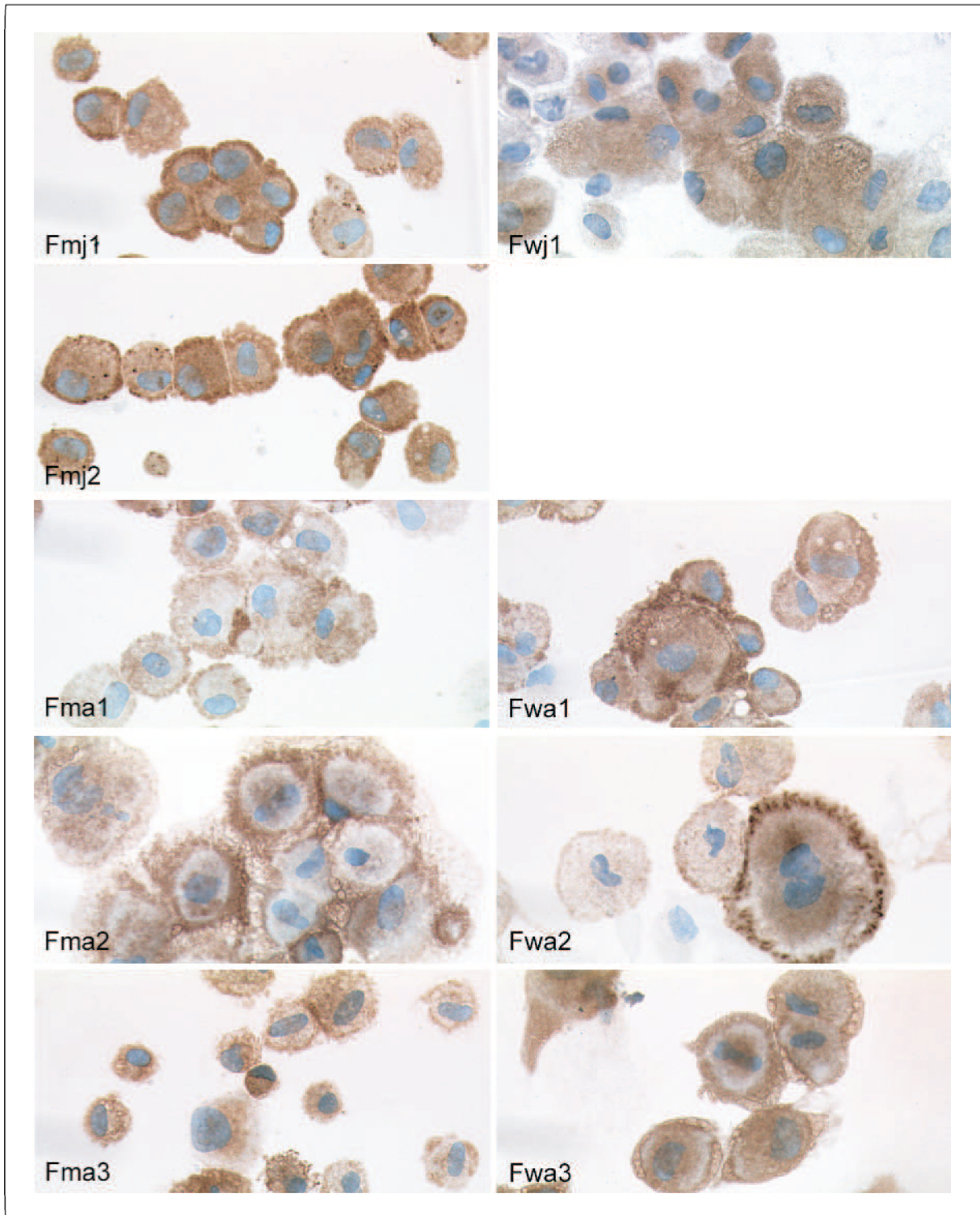


Abb. 10: Mikroskopische Bilder (identischer Vergrößerung (40-faches Objektiv)) der Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-p73. Immunhistochemie mit Permeabilisierung; Antikörperversdünung 1:100; DAB-Farbnachweissystem; Hämaalaun-Gegenfärbung; DAB: 3,3'- Diaminobenzidin; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt.

### 3.2.4 Anti-Ogg1

Bei den immunhistochemischen Färbungen mit Anti-Ogg1 ließ sich Ogg1 in allen Fibroblastenkulturen eindeutig nachweisen.

Mikroskopisch waren keine Unterschiede in der Ogg1-Expression zwischen alten und jungen Fibroblasten zu erkennen, jedoch zeigt die schwache Braunfärbung der Fibroblastenpräparate weiblicher Individuen und die starke Braunfärbung der Präparate männlicher Individuen eindeutig, dass Ogg1 in letzteren Zellen stärker exprimiert wird.

Tab. 16: Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-Ogg1.

IHC: Immunhistochemie; AK: Antikörper; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt; Bewertungsskala der Färbung: 0= keine sichtbare Anfärbung, (+)= schwache Anfärbung, += mäßig starke Anfärbung, +++ sehr starke Anfärbung.

| Anti-Ogg1    |             |               |                      |
|--------------|-------------|---------------|----------------------|
| Fibroblasten | IHC-Methode | AK-Verdünnung | Ergebnis der Färbung |
| Fmj1         | IHC         | 1:100         | ++                   |
| Fmj2         | IHC         | 1:100         | ++                   |
| Fma1         | IHC         | 1:100         | ++                   |
| Fma2         | IHC         | 1:100         | ++                   |
| Fma3         | IHC         | 1:100         | ++                   |
| Fwj1         | IHC         | 1:100         | (+)                  |
| Fwa1         | IHC         | 1:100         | (+)                  |
| Fwa2         | IHC         | 1:100         | (+)                  |
| Fwa3         | IHC         | 1:100         | (+)                  |

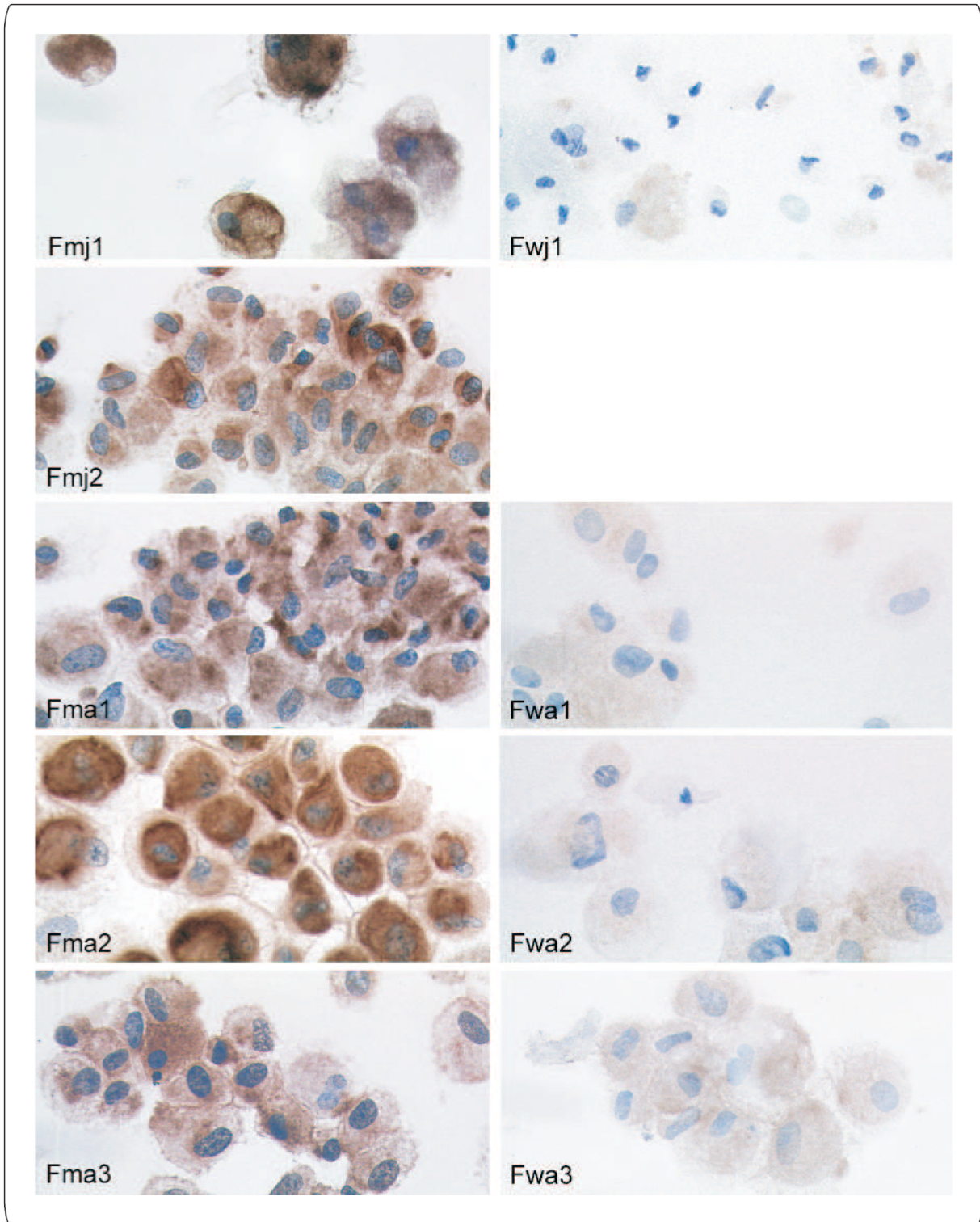


Abb. 11: Mikroskopische Bilder (identischer Vergrößerung (40-faches Objektiv)) der Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-Ogg1. Immunhistochemie; Antikörperverdünnung 1:100; DAB-Farbnachweissystem; Hämalan-Gegenfärbung; DAB: 3,3'-Diaminobenzidin; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt;

### 3.2.5 Anti-Aktin

In allen gefärbten Präparaten wurde das Protein Aktin eindeutig nachgewiesen. Das Anti-Aktin und das DAB-Farbnachweissystem markierten einige Fibroblastenkulturen besonders, andere weniger stark. Interessant ist, dass die Intensität der Färbung einzelner Zellen innerhalb derselben Fibroblastenkultur variiert, dass also Zellen derselben Kultur Aktin unterschiedlich stark exprimieren. Leider folgt die Expression in den hier durchgeführten Versuchen keinem erkennbaren Muster. Daher konnte die Annahme einer unterschiedlichen Expression Aktins in alten und jungen sowie männlichen und weiblichen Zellen nicht bestätigt werden.

Tab. 17: Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-Aktin.

IHC: Immunhistochemie; AK: Antikörper; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt; Bewertungsskala der Färbung: 0= keine sichtbare Anfärbung, (+)= schwache Anfärbung, += mäßig starke Anfärbung, += sehr starke Anfärbung.

| Fibroblasten | Anti-Aktin  |               |                                        |
|--------------|-------------|---------------|----------------------------------------|
|              | IHC-Methode | AK-Verdünnung | Ergebnis der Färbung                   |
| Fmj1         | IHC         | 1:400         | einige Zellen (+),<br>einige Zellen ++ |
| Fmj2         | IHC         | 1:400         | einige Zellen (+),<br>einige Zellen ++ |
| Fma1         | IHC         | 1:400         | einige Zellen 0,<br>einige Zellen (+)  |
| Fma2         | IHC         | 1:400         | ++                                     |
| Fma3         | IHC         | 1:400         | einige Zellen (+),<br>einige Zellen ++ |
| Fwj1         | IHC         | 1:400         | einige Zellen (+),<br>einige Zellen +  |
| Fwa1         | IHC         | 1:400         | (+)                                    |
| Fwa2         | IHC         | 1:400         | einige Zellen (+),<br>einige Zellen ++ |
| Fwa3         | IHC         | 1:400         | einige Zellen +,<br>einige Zellen ++   |

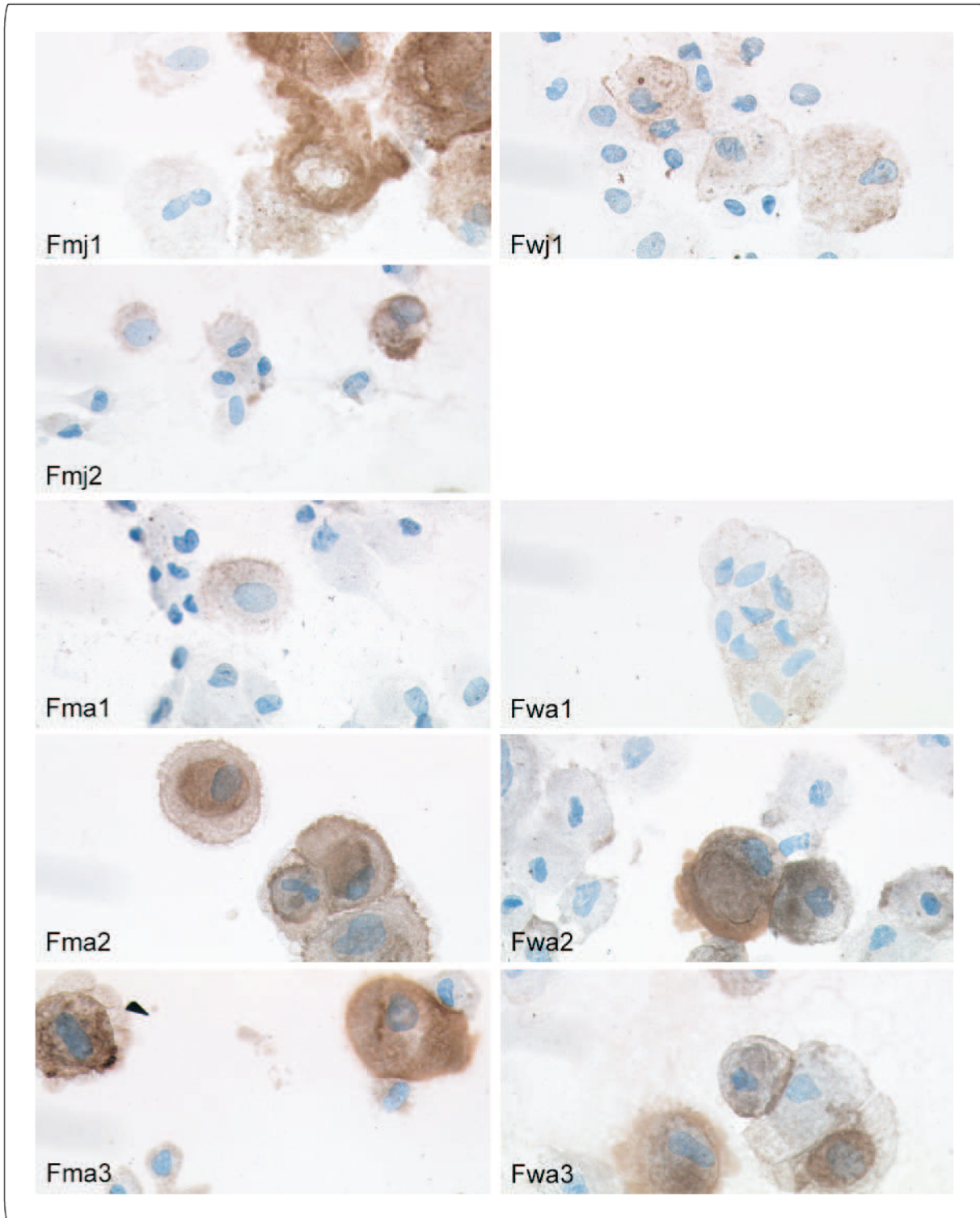


Abb. 12: Mikroskopische Bilder (identischer Vergrößerung (40-faches Objektiv)) der Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-Aktin. Immunhistochemie; Antikörpervedünnung 1:400; DAB-Farbnachweissystem; Hämalun-Gegenfärbung; DAB: 3,3'- Diaminobenzidin; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt;

### 3.2.6 Anti-Tankyrase

Das Protein Tankyrase konnte in allen verschiedenen Fibroblasten-Zytospinpräparaten mit dem Antikörper Anti-Tankyrase immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Das Vorkommen des Proteins stellte sich mikroskopisch in allen Präparaten relativ gleichmäßig dar. Signifikante Differenzen, die der Fragestellung dieser Arbeit nach unterschiedlicher Expression in jungen und seneszenten Zellen beider Geschlechter entsprechen, waren nicht zu erkennen.

Tab. 18: Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-Tankyrase.

IHC: Immunhistochemie; AK: Antikörper; SKT: Schnellkochtopf; Formalinfix.: Formalinfixierung; Fwj: Fibroblastenzelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt; Bewertungsskala der Färbung: 0= keine sichtbare Anfärbung, (+)= schwache Anfärbung, += mäßig starke Anfärbung, ++= sehr starke Anfärbung.

| Fibroblasten | Anti-Tankyrase            |               |                      |
|--------------|---------------------------|---------------|----------------------|
|              | IHC-Methode               | AK-Verdünnung | Ergebnis der Färbung |
| Fmj1         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |
| Fmj2         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |
| Fwj1         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |
| Fma1         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |
| Fma2         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |
| Fma3         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |
| Fwa1         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |
| Fwa2         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |
| Fwa3         | IHC mit Formalinfix. +SKT | 1:25          | ++                   |

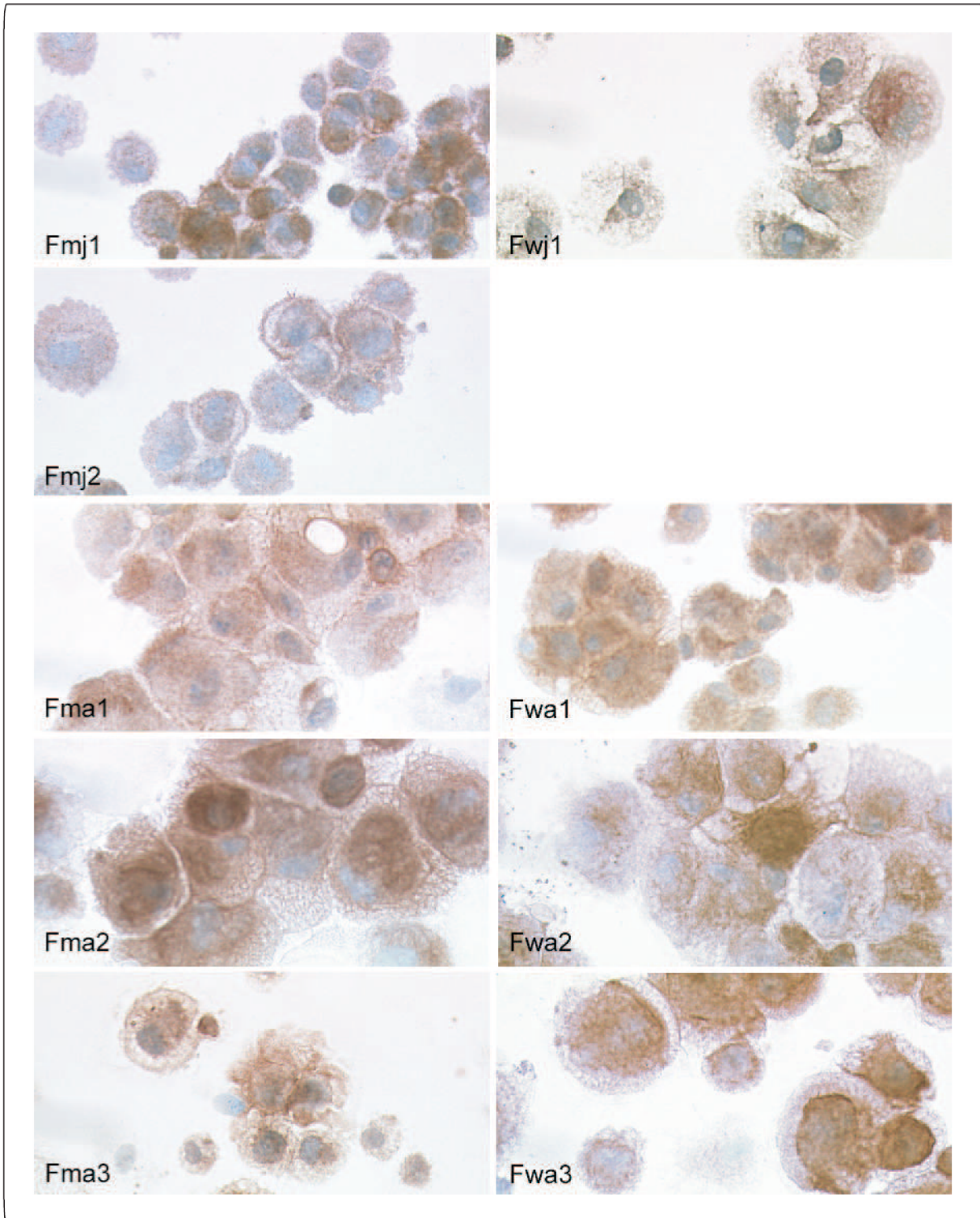


Abb. 13: Mikroskopische Bilder (identischer Vergrößerung (40-faches Objektiv)) der Ergebnisse der Immunhistochemie mit Anti-Tankyrase. Immunhistochemie mit Formalifixierung und Vorbehandlung im Schnellkochtopf; Antikörpervedünnung 1:25; DAB-Farbnachweissystem; Hämalaun-Gegenfärbung; DAB: 3,3'-Diaminobenzidin; Fwj: Fibroblasten-zelllinie weiblich jung; Fwa: Fibroblastenzelllinie weiblich alt; Fmj: Fibroblastenzelllinie männlich jung; Fma: Fibroblastenzelllinie männlich alt;

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Proteine eEF1A1, Stathmin, p73, Ogg1, Aktin, Tankyrase und Cathelicidin in alten und jungen Fibroblasten beider Geschlechter untersucht.

Da man davon ausgeht, dass diese sieben Proteine in engem Zusammenhang mit Seneszenzprozessen stehen (siehe Einleitung) wurde erwartet, dass sie in Zellen verschiedenen Alters oder/und, aufgrund des Zusammenhangs zwischen Geschlecht und Lebenserwartung (siehe 1.1.2), in männlichen und weiblichen Zellen unterschiedlich stark exprimiert werden und somit als Biomarker zellulärer Seneszenz angesehen werden können.

Zur Prüfung dieser Hypothese wurden immunhistochemische Methoden angewandt, die für die Untersuchung von Proteinen in Gewebeschnitten sowie in Zytospinpräparaten gut etabliert und bewährt sind.

Leider konnte für den Nachweis des Proteins Cathelicidin mit dem Antikörper Anti-Cathelicidin kein immunhistochemisches Versuchsprotokoll entwickelt werden, dass eine eindeutig spezifische Antikörperfärbung möglich machte. Deshalb konnte die Expression von Cathelicidin an den Fibroblasten nicht untersucht werden.

Warum Cathelicidin mit keinem der getesteten Versuchsprotokolle erfolgreich nachzuweisen war, ist unklar, denn der Hersteller des Antikörpers beschreibt dessen erfolgreichen Einsatz sowohl an Paraffin- als auch an Frischmaterial.

In anderen Studien wurde hCAP18 (siehe 1.2.7) mit ähnlichen immunhistochemischen Protokollen (indirekte IHC-Methode, Mikrowellen-Vorbehandlung, DAB-Farbnachweissystem) in Paraffin-fixierten Plattenepithelien von Zunge, Mundschleimhaut, Ösophagus oder Vagina (Frohm et al., 1999) sowie in neutophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten von Paraffin-fixiertem Aortengewebe nachgewiesen (Ciornei et al., 2006). Da das in dieser Arbeit für die Vorversuche mit Cathelicidin verwendete Tonsillenmaterial verschiedene Gewebearten und Zellen, wie

beispielsweise Plattenepithel und Lymphozyten enthält, sollte das antimikrobielle Peptid auf jeden Fall im Gewebe vorliegen.

Für die Antikörper der anderen Proteine konnten geeignete Verfahren ermittelt werden, die entweder an der Zelllinie Jurkat oder an Tonsillenschnitten zur Detektion der Proteine führten und die zumindest p73, Ogg1, Aktin und Tankyrase auch in den Fibroblastenpräparaten eindeutig nachweisen konnten.

Die wohl interessantesten Ergebnisse dieser Arbeit lieferten die Färbungen mit Anti-Ogg1, die ein vermehrtes Vorhandensein des Proteins Ogg1 in männlichen im Vergleich zu weiblichen Fibroblasten, aber keine Unterschiede in alten, verglichen mit jungen Fibroblasten aufzeigten.

Aus diesen Resultaten und dem in der Einleitung vermitteltem Vorwissen zu Ogg1 lassen sich folgende Annahmen ableiten:

1. Die Ogg1-Expression ist in männlichen gegenüber weiblichen Fibroblasten erhöht, weil männliche Individuen ROS und durch ROS entstehenden 8-OxoG-Läsionen (Dizdaroglu et al., 2002) vermehrt ausgesetzt sind.
2. Umgekehrt ist die Ogg1-Expression in weiblichen gegenüber männlichen Fibroblasten erniedrigt, weil weibliche Individuen ROS und durch ROS entstehenden 8-OxoG-Läsionen vermindert ausgesetzt sind.
3. Es existiert kein Unterschied in der Ogg1-Expression junger und alter Fibroblasten.

Die ersten beiden Vermutungen werden gestützt von der Annahme, dass männliche Säugetiere vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt sind (Vina und Borras, 2010) und die 8-OxoG-Läsion bei Frauen seltener vorhanden ist (Proteggente et al., 2002).

Haben mehr oder weniger oxidativer Stress und mehr oder weniger 8-OxoG-Läsionen auch eine Expressionssteigerung beziehungsweise -senkung von Ogg1 zur Folge? Dies sollte zumindest die logische Schlussfolgerung aus der Tatsache sein, dass Ogg1 das BER-Enzym der DNA-Läsion 8-OxoG ist, die einen durch ROS entstehenden Erbgutschaden darstellt (Klungland et al., 1999; Janssen et al., 2001).

Yi-Yu Tsai et al. führten 2005 eine immunhistochemische Untersuchung mit monoklonalen Antikörpern gegen 8-OxoG und gegen humanes Ogg1 an Pterygium (= dreieckige, gefäßreiche Bindegewebehaut zwischen innerem, seltener dem äußeren

Augenwinkel und Hornhaut) sowie an normaler Konjunktiva durch. Dabei entdeckten sie eine signifikante Assoziation der Ogg1-Expression mit positiver 8-OxoG-Anfärbung und belegten somit, dass ein gesteigerter 8-OxoG-Level in Pterygium die Expression von humanem Ogg1 induziert (Tsai et al., 2005). Auch Jankowska stellte in seiner Studie von 2008 die Korrelation von vermehrt auftretenden 8-OxoG-Läsionen mit einer gesteigerten humanen OGG1-mRNA-Expression und -Aktivität fest (Jankowska et al., 2008).

Demnach spricht also einiges dafür, dass die zuvor genannten Annahmen eins und zwei zutreffen. Diese decken sich im Gegensatz zu Annahme drei (es besteht kein Unterschied in der Ogg1-Expression junger und alter Fibroblasten) mit der zu Anfang dieser Studie erwarteten unterschiedlichen Ogg1-Expression der Zellen aus verschiedenen Fibroblastenkulturen. Da ROS und oxidative Schäden wie 8-OxoG im Alter zunehmen (Lee et al., 2002; Hayakawa et al., 1993; de Souza-Pinto et al., 2009), während die DNA-Reparaturaktivität im allgemeinen (Souza-Pinto et al., 1999) und im speziellen auch die Aktivität der BER (Xu et al., 2008) im Alter abnimmt, wurde eine geringere Expression des BER-Enzyms Ogg1 in seneszenten Zellen erwartet. Auch Chen macht 2002 die Aussage, dass der im Alter erniedrigten BER-Aktivität eine geringere Expression von Reparaturenzymen wie Ogg1 zugrunde liegt (Chen et al., 2002). Doch verminderte DNA-Reparatur muss ja nicht zwangsläufig durch eine Abnahme von Reparaturenzymen ausgelöst sein, sondern könnte auch auf eine schwächere enzymatische Aktivität bei gleicher Menge an exprimierten Enzymen zurückgeführt werden.

Dies würde die Ergebnisse der Färbungen mit Ogg1 dieser Arbeit, nämlich keinen Expressionsunterschied des Proteins in jungen und alten Zellen, erklären.

Choi et al. stellten 1999 an einem Mausmodell für Seneszenz fest: Ogg1 wird in gleicher Menge, aber aufgrund einer Mutation bei Aminosäure 304 mit verminderter enzymatischer Aktivität und als thermolabiles Protein exprimiert (Choi et al., 1999). Einige In-vitro-Studien, wie beispielsweise die von Chen et al. (Chen et al., 2003), der bei in-vitro Versuchen 8-OxoG mit nukleärem Extrakt peripherer Blutlymphozyten von Probanden verschiedenen Alters inkubierte, sprechen ebenfalls von einer niedrigeren Aktivität des humanen Ogg1 bei älteren Individuen. Jedoch sind die immunhisto-

chemischen Untersuchungen an intakten Zellen der vorliegenden Arbeit mit diesen reinen In-vitro-Studien nicht unbedingt vergleichbar.

Das Protein eEF1A1, eine Untereinheit des Elongationsfaktors  $1\alpha$  (eEF1 $\alpha$ ), ist an der Proteinbiosynthese beteiligt und wurde aufgrund der Vermutung, es könnte in alten Zellen vermindert exprimiert sein, untersucht.

Diese Vermutung wird von der Tatsache, dass die Proteinsynthese und auch die Menge der Elongationsfaktoren im Alter abnimmt (Rattan, 1991; Rattan, 1996; Johannsen und Ravussin, 2010), gestützt. Cavallius beschreibt in seiner Arbeit eine verminderte eEF1 $\alpha$ -Menge und -Aktivität bei alten Fibroblasten (Cavallius et al., 1986), Shepherd eine altersbedingte Abnahme der eEF1 $\alpha$ -mRNA und des eEF1 $\alpha$ -Proteins bei *Drosophila melanogaster* (Shepherd et al., 1989).

In der vorliegenden Dissertation konnte weder eine erniedrigte (wie vermutet), noch eine erhöhte oder unveränderte eEF1A1-Expression bestätigt werden, da das Protein durch den Antikörper Anti-eEF1A1 nur in den Vorversuchen in der Zelllinie Jurkat, aber nicht in den Fibroblasten-Zytospinpräparaten eindeutig nachzuweisen war.

Dies ist eigentlich schwer verständlich, denn der Elongationsfaktor  $1\alpha$  kommt ubiquitär vor, er wurde bereits in vielen Gewebearten und auch in humanen Fibroblasten identifiziert (Knudsen et al., 1993). Zwar variiert sein Expressionslevel in den verschiedenen Geweben (Sanders et al., 1992), doch ist es aufgrund der hier verwendeten, aus verschiedenen Geweben stammenden Fibroblastenkulturen sehr unwahrscheinlich, dass die eEF1A1-Expression in allen so gering ist, dass man sie immunhistochemisch nicht nachweisen kann.

Da eEF1A1 pH-Wert-abhängig entweder tRNA- oder Aktin-gebunden vorliegt (Liu et al., 1996), ist es möglich, dass der Antikörper Anti-eEF1A1 sein Antigen nur bei einem bestimmten pH-Wert, d.h. in einem bestimmten Zustand, entweder Aktin- oder tRNA-gebunden, erkennt. Dies wäre eine denkbare Erklärung für die fehlende Farbreaktion der immunhistochemischen Versuche mit Anti-eEF1A1 an Fibroblasten.

Genau wie eEF1A1 konnte auch Stathmin nicht eindeutig in den Fibroblasten nachgewiesen werden, obwohl mit dem Antikörper Anti-Stathmin in den Vorver-

suchen positive Ergebnisse zu verzeichnen waren. Aus diesem Grund konnte die für die Untersuchung Stathmins verantwortliche Vermutung, das Protein könnte wegen seiner Rolle in der Mikrotubulusbildung und damit bei der Zellteilung in jungen und seneszenten Zellen unterschiedlich exprimiert sein, weder bestätigt noch widerlegt werden.

Es gibt viele Studien die das Vorhandensein Stathmins in Tumorzellen (Ogino et al., 2009; Jeon et al., 2010; Kuo et al., 2009) und auch eine erhöhte Stathminexpression in malignen Zellen nachweisen konnten (Gan et al., 2010). Mistry stellte sogar eine vier mal höhere Stathminexpression in stark proliferierenden immortalisierten Fibroblasten im Vergleich zu schwächer proliferierenden nicht immortalisierten Fibroblasten fest (Mistry und Atweh, 1999). Es wäre also vorstellbar, dass die Stathminexpression mit der Dedifferenzierung von Zellen korreliert und das Protein deshalb in malignen, stark proliferierenden, undifferenzierten Zellen hoch reguliert und gut nachweisbar ist, während es in normal differenzierten Zellen, wie den getesteten Fibroblasten, nur schwach exprimiert wird und zu keiner erkennbaren Farbreaktion in den immunhistologischen Tests führte.

Die Proteine Aktin, p73 und Tankyrase konnten durch die jeweiligen Antikörper sowohl in Tonsillengewebe als auch in den Fibroblastenpräparaten erfolgreich nachgewiesen werden. Jedoch waren keine Expressionsunterschiede der Proteine zwischen jungen und alten oder zwischen männlichen und weiblichen Zellen erkennbar.

Da Tankyrase TRF1 bindet und somit als positiver Regulator der Telomereelongation wirkt (Gelmini et al., 2007), wurde in seneszenten, verglichen mit jungen Zellen eine geringere Tankyrase-Expression vermutet, die durch immunhistochemische Untersuchungen der verschieden alten Fibroblasten-Zytospinpräparate bestätigt werden sollte.

In Tumorgeweben ist die Telomereelongation deutlich erhöht, die meisten Krebszellen unterliegen somit nicht der replikativen Seneszenz. Und die Tankyrase-Aktivität sowie das Vorkommen von Tankyrase-mRNA ist in vielen humanen Tumoren hochreguliert

(Gelmini et al., 2007; Gelmini et al., 2004). Warum sollte es also bei seneszenten, teilungsunfähigen Zellen nicht umgekehrt sein?

Vom Transkriptionsfaktor p73 wurde, aufgrund seiner Fähigkeit, Seneszenz auszulösen und über die NF- $\kappa$ B-Hemmung den Übergang von der G2-Phase in die Mitose zu verhindern (Zaika et al., 2001; Jung et al., 2001), angenommen, er könnte in seneszenten Zellen vermehrt exprimiert sein.

Die Theorien unterschiedlicher p73- und Tankyrase-Expressionen unterstützend kommt hinzu, dass bei beiden Proteinen durch RNA-Analyse mittels Pathway-focused Oligo GEArray von Daniel Baltimore Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen jungen und alten sowie zwischen männlichen und weiblichen Fibroblasten festgestellt wurden (persönliche Mitteilung von Daniel Baltimore, seine Dissertation ist noch nicht veröffentlicht).

Weil mit den für diese Doktorarbeit durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen aber keine Unterschiede in der p73- und Tankyrase-Expression auf Proteinebene gezeigt werden konnten, wäre es einerseits möglich, dass ein Expressionsunterschied nur auf RNA- und nicht auf Proteinebene besteht oder andererseits der Unterschied auf Proteinebene so gering ist, dass er mit immunhistochemischen Methoden alleine nicht nachzuweisen ist. Um Letzteres auszuschließen, könnte durch weiterführende Untersuchungen, wie durch ELISA (= enzyme-linked immunosorbent assay), die Proteinexpression in den verschiedenen Zellen quantitativ bestimmt werden.

Ein Unterschied der nur auf mRNA-Ebene existiert, wäre durch die in den letzten Jahren entdeckten MicroRNAs (miRNAs) zu erklären: miRNAs sind kleine, nicht kodierende RNAs, die die Translation posttranskriptional regulieren (Bartel, 2004), indem sie an die 3' UTR (=three prime untranslated region; stellt einen Bereich der mRNA dar, der nicht für Proteine kodiert.) ihrer Ziel-mRNA binden und entweder deren Zerfall fördern oder deren Translation inhibieren (Davidson-Moncada et al., 2010).

Beim Menschen sind inzwischen sehr viele miRNAs bekannt, allein für die mRNA des Tankyrase-Gens TNKS gibt es mehr als 300, für die des p73-Gens TP73 über 30 und

für die des Aktin-Gens ACTA1 17 verschiedene miRNAs (<http://www.microrna.org/>), die die Translation dieser mRNAs zum Protein negativ beeinflussen könnten.

Auch für die mRNA des OGG1-Gens existieren nach den Untersuchungen Daniel Baltimores Expressionsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen sowie zwischen jungen und alten Fibroblasten. Diese Unterschiede konnten in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf die Fibroblasten verschiedener Geschlechter auch auf Proteinebene nachgewiesen werden, leider jedoch nicht für die Fibroblasten verschiedenen Alters. Laut [www.microrna.com](http://www.microrna.com) gibt es mindestens 20 MicroRNAs für die Translationsregulierung von OGG1. Eventuell könnte dies auch bei diesem Gen die Ursache dafür sein, dass sich der auf RNA-Ebene festgestellte Expressionsunterschied zwischen alten und jungen Fibroblasten nicht auf Proteinebene bestätigt.

Abschließend kann man die Ergebnisse und die mögliche Konsequenz der durchgeführten Untersuchungen wie folgt beurteilen:

Immunhistochemisch ließ sich keines der untersuchten Proteine als Biomarker für zelluläre Seneszenz identifizieren. Ob Expressionsunterschiede der Proteine eEF1A1, Stathmin und Cathelicidin in alten und jungen Zellen beider Geschlechter existieren, ist weiterhin unklar und bleibt zu erforschen. Bei Tankyrase, p73 und Ogg1 könnten weiterführende Untersuchungen, wie ELISA, klären, ob der von Daniel Baltimore auf RNA-Ebene gezeigte Expressionsunterschied zwischen jungen und alten Zellen wirklich nicht auf Proteinebene besteht, wie in dieser Studie signalisiert wird, oder ob eventuell doch geringfügige, immunhistochemisch nicht nachweisbare Differenzen auch auf Proteinebene vorhanden sind.

Auch der nachgewiesene Expressionsunterschied von Ogg1 in männlichen, verglichen mit weiblichen Fibroblasten macht Ogg1 nicht zu einem Seneszenz-Biomarker, da die gesteigerte Ogg1-Freisetzung in männlichen Zellen unabhängig vom Alter der untersuchten Fibroblastenkulturen vorliegt. Dennoch ist dieser Nachweis wichtig, da er die Theorie unterstützt, dass Männer ROS und oxidativen Schäden wie 8-oxoG vermehrt ausgesetzt sind.

Im Übrigen erscheint es sinnvoll, eine Gewebeabhängigkeit der Ogg1-Expression zu prüfen, zum Beispiel mit einer Real Time PCR mit Ogg1-Primern an verschiedenen

Normalgeweben: Sollte nämlich Ogg1 in allen Geweben aus männlichen Spendern erhöht sein, würde dies das Ergebnis der vorliegenden Arbeit untermauern.

## 5 Zusammenfassung

Bei der zellulären Seneszenz handelt es sich um das Phänomen, dass Zellen nach einer bestimmten Anzahl von durchlebten Mitosen in ihrem Zellzyklus verharren und sich nicht weiter teilen. Dennoch bleiben die Zellen über lange Zeiträume lebensfähig. Ursache für dieses Phänomen ist einerseits die Verkürzung der Telomere, andererseits sind es Erbgutschäden, die durch Gamma- oder ultraviolette Strahlung, aber vor allem durch den Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) entstehen.

Da weibliche, verglichen mit männlichen Individuen aufgrund umwelt- und verhaltensorientierter, aber auch aufgrund biologischer, nicht beeinflussbarer Ursachen eine höhere Lebenserwartung haben, ist es wahrscheinlich, dass auch die Vorgänge der zellulären Alterung Unterschiede bei Männern und Frauen aufweisen.

Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit sieben Proteine (eEF1A1, Stathmin, p73, Ogg1, Aktin, Tankyrase1 und Cathelicidin), von denen man vermutet, dass sie in engem Zusammenhang mit Seneszenzprozessen stehen, mit dem Ziel, mögliche Expressionsunterschiede zwischen jungen und alten Zellen nachzuweisen und so Biomarker für Seneszenz zu identifizieren, auch geschlechtsspezifisch untersucht.

Dazu wurden die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper in Zytospinpräparaten aus neun Fibroblastenkulturen verschiedenen Alters und Geschlechts mit indirekter immunhistochemischer Methode und DAB-Farbnachweissystem (DAB: 3,3'-Diaminobenzidin) detektiert.

Das für die Anwendung des jeweiligen Antikörpers benötigte, die Vorbehandlung der Gewebepreparate sowie die Verdünnung des Antikörpers beinhaltende individuelle Versuchsprotokoll, wurde in Vorversuchen ermittelt.

Für Cathelicidin konnte kein geeignetes immunhistochemisches Versuchsprotokoll entwickelt werden, mit dem das Protein eindeutig nachzuweisen war. Deshalb wurden die Fibroblasten-Zytospinpräparate nicht auf Cathelicidin untersucht.

Die Proteine eEF1A1 und Stathmin wurden in den Vorversuchen durch die jeweiligen Antikörper zwar eindeutig dargestellt, konnten in den Fibroblasten-Zytospinprä-

paraten jedoch nicht nachgewiesen werden. Daher bleibt das Expressionsverhalten dieser drei Proteine im Seneszenzprozess nach wie vor ungeklärt.

Für Ogg1 war kein Expressionsunterschied zwischen jungen und alten Zellen, aber eine erhöhte Expression in männlichen gegenüber weiblichen Zellen zu verzeichnen.

Mikroskopisch wurden keine Expressionsunterschiede von Aktin, p73 und Tankyrase zwischen alten und jungen Zellen beider Geschlechter ermittelt.

In der vorliegenden Arbeit bestätigte sich keines der Proteine als Biomarker für Seneszenz, wobei die Expression von Cathelicidin, eEF1A1 und Stathmin im Hinblick auf Unterschiede weiter untersucht werden sollte.

Die erhöhte Ogg1-Expression in männlichen Fibroblasten unterstützt die Theorie, dass Männer ROS und oxidativen Schäden vermehrt ausgesetzt sind, und stellt eine mögliche Ursache für die kürzere Lebenserwartung männlicher Individuen dar.

Dieses Ergebnis wäre durch eine Real Time PCR (= polymerase chain reaction) mit Ogg1-Primern an verschiedenen Normalgeweben beider Geschlechter zu untermauern beziehungsweise zu widerlegen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Ali,S.S., Xiong,C., Lucero,J., Behrens,M.M., Dugan,L.L., and Quick,K.L. (2006). Gender differences in free radical homeostasis during aging: shorter-lived female C57BL6 mice have increased oxidative stress. *Aging Cell* 5, 565-574.
2. Andressoo,J.O., Hoeijmakers,J.H. (2005). Transcription-coupled repair and premature ageing. *Mutat Res* 577, 179-194.
3. Baltimore, D. (2010). Persönliche Mitteilung.
4. Bartel,D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
5. Beckman,K.B. and Ames,B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
6. Benachour,H., Zaiou,M., Samara,A., Herbeth,B., Pfister,M., Lambert,D., Siest,G., and Visvikis-Siest,S. (2009). Association of human cathelicidin (hCAP-18/LL-37) gene expression with cardiovascular disease risk factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19, 720-728.
7. Bettinger,B.T., Gilbert,D.M., and Amberg,D.C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 410-415.

8. Blackburn,E.H. (1997). The telomere and telomerase: nucleic acid-protein complexes acting in a telomere homeostasis system. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62, 1196-1201.
9. Blagosklonny,M.V. (2007). Program-like aging and mitochondria: instead of random damage by free radicals. *J Cell Biochem* 102, 1389-1399.
10. Blasco,M.A. (2003). Mammalian telomeres and telomerase: why they matter for cancer and aging. *Eur J Cell Biol* 82, 441-446.
11. Boiteux,S., Radicella,J.P. (2000). The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 377, 1-8.
12. Campisi,J. (1996). Replicative senescence: an old lives' tale? *Cell* 84, 497-500.
13. Cavallius,J., Rattan,S.I., and Clark,B.F. (1986). Changes in activity and amount of active elongation factor 1 alpha in aging and immortal human fibroblast cultures. *Exp Gerontol* 21, 149-157.
14. Chen,D., Cao,G., Hastings,T., Feng,Y., Pei,W., O'Horo,C., and Chen,J. (2002). Age-dependent decline of DNA repair activity for oxidative lesions in rat brain mitochondria. *J Neurochem* 81, 1273-1284.
15. Chen,J.H., Hales,C.N., and Ozanne,S.E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic Acids Res* 35, 7417-7428.
16. Chen,S.K., Hsieh,W.A., Tsai,M.H., Chen,C.C., Hong,A.I., Wei,Y.H., and Chang,W.P. (2003). Age-associated decrease of oxidative repair enzymes,

- human 8-oxoguanine DNA glycosylases (hOgg1), in human aging. *J Radiat Res (Tokyo)* 44, 31-35.
17. Choi,J.Y., Kim,H.S., Kang,H.K., Lee,D.W., Choi,E.M., and Chung,M.H. (1999). Thermolabile 8-hydroxyguanine DNA glycosylase with low activity in senescence-accelerated mice due to a single-base mutation. *Free Radic Biol Med* 27, 848-854.
  18. Christensen,K., Kristiansen,M., Hagen-Larsen,H., Skytthe,A., Bathum,L., Jeune,B., ndersen-Ranberg,K., Vaupel,J.W., and Orstavik,K.H. (2000). X-linked genetic factors regulate hematopoietic stem-cell kinetics in females. *Blood* 95, 2449-2451.
  19. Ciornei,C.D., Tapper,H., Bjartell,A., Sternby,N.H., and Bodelsson,M. (2006). Human antimicrobial peptide LL-37 is present in atherosclerotic plaques and induces death of vascular smooth muscle cells: a laboratory study. *BMC Cardiovasc Disord* 6, 49.
  20. Cleaver,J.E. (2005). Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat Rev Cancer* 5, 564-573.
  21. Comfort,A. (1979). *The biology of senescence*. Elsevier, New York.
  22. Cook,B.D., Dynek,J.N., Chang,W., Shostak,G., and Smith,S. (2002). Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Mol Cell Biol* 22, 332-342.
  23. Cory,S., Adams,J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.

24. Curmi,P.A., Andersen,S.S., Lachkar,S., Gavet,O., Karsenti,E., Knossow,M., and Sobel,A. (1997). The stathmin/tubulin interaction in vitro. *J Biol Chem* 272, 25029-25036.
25. D'Adda di Fagagna,F., Reaper,P.M., Clay-Farrace,L., Fiegler,H., Carr,P., Von,Z.T., Saretzki,G., Carter,N.P., and Jackson,S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
26. Davalos,A.R., Coppe,J.P., Campisi,J., and Desprez,P.Y. (2010). Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 29, 273-283.
27. Davidson-Moncada,J., Papavasiliou,F.N., and Tam,W. (2010). MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1183, 183-194.
28. De Souza-Pinto,N.C., Maynard,S., Hashiguchi,K., Hu,J., Muftuoglu,M., and Bohr,V.A. (2009). The recombination protein RAD52 cooperates with the excision repair protein OGG1 for the repair of oxidative lesions in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 29, 4441-4454.
29. De,R.M., Venkatesan,R.N., Wei,C., and Price,C.M. (2003). Vertebrate tankyrase domain structure and sterile alpha motif (SAM)-mediated multimerization. *Biochem J* 372, 87-96.
30. Deyoung,M.P., Ellisen,L.W. (2007). p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* 26, 5169-5183.
31. Dice,J.F. (1993). Cellular and molecular mechanisms of aging. *Physiol Rev* 73, 149-159.

32. Dinkel,R.H. (1984). Sterblichkeit in der Perioden- und Kohortenbetrachtung. Zeitschrift für Bevölkerungswissenschaft, 477-500.
33. Dizdaroglu,M., Jaruga,P., Birincioglu,M., and Rodriguez,H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. Free Radic Biol Med 32, 1102-1115.
34. Franke,W.W. (2004). Actin's many actions start at the genes. Nat Cell Biol 6, 1013-1014.
35. Freund,A., Orjalo,A.V., Desprez,P.Y., and Campisi,J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. Trends Mol Med 16, 238-246.
36. Frohm,N.M., Sandstedt,B., Sorensen,O., Weber,G., Borregaard,N., and Stahle-Backdahl,M. (1999). The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. Infect Immun 67, 2561-2566.
37. Gan,L., Guo,K., Li,Y., Kang,X., Sun,L., Shu,H., and Liu,Y. (2010). Up-regulated expression of stathmin may be associated with hepatocarcinogenesis. Oncol Rep 23, 1037-1043.
38. Gavet,O., Ozon,S., Manceau,V., Lawler,S., Curmi,P., and Sobel,A. (1998). The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. J Cell Sci 111 ( Pt 22), 3333-3346.
39. Gelmini,S., Poggesi,M., Distante,V., Bianchi,S., Simi,L., Luconi,M., Raggi,C.C., Cataliotti,L., Pazzagli,M., and Orlando,C. (2004). Tankyrase, a positive

regulator of telomere elongation, is over expressed in human breast cancer. *Cancer Lett* 216, 81-87.

40. Gelmini,S., Quattrone,S., Malentacchi,F., Villari,D., Travaglini,F., Giannarini,G., Della,M.A., Pazzagli,M., Nicita,G., Selli,C., and Orlando,C. (2007). Tankyrase-1 mRNA expression in bladder cancer and paired urine sediment: preliminary experience. *Clin Chem Lab Med* 45, 862-866.
41. Gennaro,R., Zanetti,M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* 55, 31-49.
42. Goldstein,S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249, 1129-1133.
43. Grodstein,F., Stampfer,M.J., Colditz,G.A., Willett,W.C., Manson,J.E., Joffe,M., Rosner,B., Fuchs,C., Hankinson,S.E., Hunter,D.J., Hennekens,C.H., and Speizer,F.E. (1997). Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med* 336, 1769-1775.
44. Gudmundsson,G.H., Agerberth,B., Odeberg,J., Bergman,T., Olsson,B., and Salcedo,R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem* 238, 325-332.
45. Hamilton,J.B., Mestler,G.E. (1969). Mortality and survival: comparison of eunuchs with intact men and women in a mentally retarded population. *J Gerontol* 24, 395-411.
46. Harley,C.B., Futcher,A.B., and Greider,C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.

47. Hayakawa,M., Sugiyama,S., Hattori,K., Takasawa,M., and Ozawa,T. (1993). Age-associated damage in mitochondrial DNA in human hearts. *Mol Cell Biochem* 119, 95-103.
48. Hayflick,L. (1985a). The aging process: current theories. *Drug Nutr Interact* 4, 13-33.
49. Hayflick,L. (1985b). Theories of biological aging. *Exp Gerontol* 20, 145-159.
50. Hayflick,L., Moorhead,P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
51. Hickson,I.D. (2003). RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat Rev Cancer* 3, 169-178.
52. Hirschfeld,G., Berneburg,M., von Arnim,C., Iben,S., Ludolph,A.C., and Scharffetter-Kochanek,K. (2007). Progeroid-Syndrome. *Dtsch Ärztebl* 104, 346-353.
53. Horiuchi,S. (1997). Postmenopausal acceleration of age-related mortality increase. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 52, B78-B92.
54. Iida,K., Moriyama,K., Matsumoto,S., Kawasaki,H., Nishida,E., and Yahara,I. (1993). Isolation of a yeast essential gene, COF1, that encodes a homologue of mammalian cofilin, a low-M(r) actin-binding and depolymerizing protein. *Gene* 124, 115-120.
55. Jankowska,A.M., Gondek,L.P., Szpurka,H., Nearman,Z.P., Tiu,R.V., and Maciejewski,J.P. (2008). Base excision repair dysfunction in a subgroup of patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 22, 551-558.

56. Janssen,K., Schlink,K., Gotte,W., Hippler,B., Kaina,B., and Oesch,F. (2001). DNA repair activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 (OGG1) in human lymphocytes is not dependent on genetic polymorphism Ser326/Cys326. *Mutat Res* 486, 207-216.
  
57. Jeon,T.Y., Han,M.E., Lee,Y.W., Lee,Y.S., Kim,G.H., Song,G.A., Hur,G.Y., Kim,J.Y., Kim,H.J., Yoon,S., Baek,S.Y., Kim,B.S., Kim,J.B., and Oh,S.O. (2010). Overexpression of stathmin1 in the diffuse type of gastric cancer and its roles in proliferation and migration of gastric cancer cells. *Br J Cancer* 102, 710-718.
  
58. Jiang,H., Schiffer,E., Song,Z., Wang,J., Zurbig,P., Thedieck,K., Moes,S., Bantel,H., Saal,N., Jantos,J., Brecht,M., Jeno,P., Hall,M.N., Hager,K., Manns,M.P., Hecker,H., Ganser,A., Dohner,K., Bartke,A., Meissner,C., Mischak,H., Ju,Z., and Rudolph,K.L. (2008). Proteins induced by telomere dysfunction and DNA damage represent biomarkers of human aging and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11299-11304.
  
59. Johannsen,D.L. and Ravussin,E. (2010). Obesity in the elderly: is faulty metabolism to blame? *Aging health* 6, 159-167.
  
60. Jung,M.S., Yun,J., Chae,H.D., Kim,J.M., Kim,S.C., Choi,T.S., and Shin,D.Y. (2001). p53 and its homologues, p63 and p73, induce a replicative senescence through inactivation of NF-Y transcription factor. *Oncogene* 20, 5818-5825.
  
61. Kannel,W.B., Hjortland,M.C., McNamara,P.M., and Gordon,T. (1976). Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 85, 447-452.

62. Kirkwood,T.B. (2005). Time of our lives. What controls the length of life? EMBO Rep 6 *Spec No*, S4-S8.
  
63. Kiseleva,E., Drummond,S.P., Goldberg,M.W., Rutherford,S.A., Allen,T.D., and Wilson,K.L. (2004). Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J Cell Sci* 117, 2481-2490.
  
64. Klungland,A., Rosewell,I., Hollenbach,S., Larsen,E., Daly,G., Epe,B., Seeberg,E., Lindahl,T., and Barnes,D.E. (1999). Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13300-13305.
  
65. Knight,J.A. (1995). The process and theories of aging. *Ann Clin Lab Sci* 25, 1-12.
  
66. Knudsen,S.M., Frydenberg,J., Clark,B.F., and Leffers,H. (1993). Tissue-dependent variation in the expression of elongation factor-1 alpha isoforms: isolation and characterisation of a cDNA encoding a novel variant of human elongation-factor 1 alpha. *Eur J Biochem* 215, 549-554.
  
67. Kovtun,I.V., Liu,Y., Bjoras,M., Klungland,A., Wilson,S.H., and McMurray,C.T. (2007). OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* 447, 447-452.
  
68. Kuo,M.F., Wang,H.S., Kuo,Q.T., Shun,C.T., Hsu,H.C., Yang,S.H., and Yuan,R.H. (2009). High expression of stathmin protein predicts a fulminant course in medulloblastoma. *J Neurosurg Pediatr* 4, 74-80.

69. Kwak,I.H., Kim,H.S., Choi,O.R., Ryu,M.S., and Lim,I.K. (2004). Nuclear accumulation of globular actin as a cellular senescence marker. *Cancer Res* 64, 572-580.
70. Lee,H.C., Wei,Y.H. (2007). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med* (Maywood) 232, 592-606.
71. Lee,H.C., Yin,P.H., Chi,C.W., and Wei,Y.H. (2002). Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci* 9, 517-526.
72. Lin,A.W., Barradas,M., Stone,J.C., van,A.L., Serrano,M., and Lowe,S.W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 12, 3008-3019.
73. Linnane,A.W., Marzuki,S., Ozawa,T., and Tanaka,M. (1989). Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet* 1, 642-645.
74. Liu,G., Tang,J., Edmonds,B.T., Murray,J., Levin,S., and Condeelis,J. (1996). F-actin sequesters elongation factor 1alpha from interaction with aminoacyl-tRNA in a pH-dependent reaction. *J Cell Biol* 135, 953-963.
75. Lu,R., Nash,H.M., and Verdine,G.L. (1997). A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr Biol* 7, 397-407.
76. Luy,M. (2002). Sex differences in mortality - time to take a second look. *Z Gerontol Geriatr* 35, 412-429.

77. Malorni,W., Campesi,I., Straface,E., Vella,S., and Franconi,F. (2007). Redox features of the cell: a gender perspective. *Antioxid Redox Signal* 9, 1779-1801.
78. Mistry,S.J., Atweh,G.F. (1999). Stathmin expression in immortalized and oncogene transformed cells. *Anticancer Res* 19, 573-577.
79. Moll,U.M. and Slade,N. (2004). p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2, 371-386.
80. Nagaoka,I., Tamura,H., and Hirata,M. (2006). An antimicrobial cathelicidin peptide, human CAP18/LL-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and P2X7. *J Immunol* 176, 3044-3052.
81. Nakabeppu,Y., Tsuchimoto,D., Yamaguchi,H., and Sakumi,K. (2007). Oxidative damage in nucleic acids and Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 85, 919-934.
82. Nalapareddy,K., Jiang,H., Guachalla Gutierrez,L.M., and Rudolph,K.L. (2008). Determining the influence of telomere dysfunction and DNA damage on stem and progenitor cell aging: what markers can we use? *Exp Gerontol* 43, 998-1004.
83. Nathanson,C.A. (1984). Sex differences in mortality. *Annu Rev Sociol* 10, 191-213.
84. Nishioka,K., Ohtsubo,T., Oda,H., Fujiwara,T., Kang,D., Sugimachi,K., and Nakabeppu,Y. (1999). Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* 10, 1637-1652.

85. Ogino,S., Noshok,K., Baba,Y., Kure,S., Shima,K., Irahara,N., Toyoda,S., Chen,L., Kirkner,G.J., Wolpin,B.M., Chan,A.T., Giovannucci,E.L., and Fuchs,C.S. (2009). A cohort study of STMN1 expression in colorectal cancer: body mass index and prognosis. *Am J Gastroenterol* 104, 2047-2056.
  
86. Pietsch,E.C., Sykes,S.M., McMahon,S.B., and Murphy,M.E. (2008). The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 27, 6507-6521.
  
87. Pring,M., Weber,A., and Bubb,M.R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* 31, 1827-1836.
  
88. Proteggente,A.R., England,T.G., Rehman,A., Rice-Evans,C.A., and Halliwell,B. (2002). Gender differences in steady-state levels of oxidative damage to DNA in healthy individuals. *Free Radic Res* 36, 157-162.
  
89. Rattan,S.I. (1991). Protein synthesis and the components of protein synthetic machinery during cellular aging. *Mutat Res* 256, 115-125.
  
90. Rattan,S.I. (1996). Synthesis, modifications, and turnover of proteins during aging. *Exp Gerontol* 31, 33-47.
  
91. Rubin,C.I., Atweh,G.F. (2004). The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem* 93, 242-250.
  
92. Sanders,J., Maassen,J.A., and Moller,W. (1992). Elongation factor-1 messenger-RNA levels in cultured cells are high compared to tissue and are not drastically affected further by oncogenic transformation. *Nucleic Acids Res* 20, 5907-5910.

93. Seimiya,H. (2006). The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy. *Br J Cancer* 94, 341-345.
94. Seimiya,H., Oh-hara,T., Suzuki,T., Naasani,I., Shimazaki,T., Tsuchiya,K., and Tsuruo,T. (2002). Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthetic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-1991. *Mol Cancer Ther* 1, 657-665.
95. Seimiya,H., Smith,S. (2002). The telomeric poly(ADP-ribose) polymerase, tankyrase 1, contains multiple binding sites for telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) and a novel acceptor, 182-kDa tankyrase-binding protein (TAB182). *J Biol Chem* 277, 14116-14126.
96. Shepherd,J.C., Walldorf,U., Hug,P., and Gehring,W.J. (1989). Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 alpha live longer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7520-7521.
97. Shiloh,Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.
98. Sohal,R.S., Ku,H.H., Agarwal,S., Forster,M.J., and Lal,H. (1994). Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev* 74, 121-133.
99. Souza-Pinto,N.C., Croteau,D.L., Hudson,E.K., Hansford,R.G., and Bohr,V.A. (1999). Age-associated increase in 8-oxo-deoxyguanosine glycosylase/AP lyase activity in rat mitochondria. *Nucleic Acids Res* 27, 1935-1942.
100. Stadtman,E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.

101. Start,R.D., Loomes,R.S., and Shortland,J.R. (1991). The relationship between donor age and the growth characteristics of human smooth muscle cultures of aorta and stomach. *Int J Exp Pathol* 72, 647-654.
102. Tsai,Y.Y., Cheng,Y.W., Lee,H., Tsai,F.J., Tseng,S.H., Lin,C.L., and Chang,K.C. (2005). Oxidative DNA damage in pterygium. *Mol Vis* 11, 71-75.
103. Turkoglu,O., Emingil,G., Kutukculer,N., and Atilla,G. (2009). Gingival crevicular fluid levels of cathelicidin LL-37 and interleukin-18 in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 80, 969-976.
104. Vallin J: Can sex differentials in mortality be explained by socio-economic mortality differentials? In: Alan D. Lopez, Graziella Caselli, Tapani Valkonen (Hrsg) *Adult mortality in developed countries: from description to explanation*. Oxford, England, Clarendon Press, 179-200 (1995)
105. Vina,J. and Borras,C. (2010). Women live longer than men: understanding molecular mechanisms offers opportunities to intervene by using estrogenic compounds. *Antioxid Redox Signal*.
106. Wager,M., Guilhot,J., Blanc,J.L., Ferrand,S., Milin,S., Bataille,B., Lapierre,F., Denis,S., Chantereau,T., Larsen,C.J., and Karayan-Tapon,L. (2006). Prognostic value of increase in transcript levels of Tp73 DeltaEx2-3 isoforms in low-grade glioma patients. *Br J Cancer* 95, 1062-1069.
107. Waldron,I. (1985). What do we know about causes of sex differences in mortality? A review of the literature. *Popul Bull UN* 59-76.
108. Wang,E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res* 55, 2284-2292.

109. Wei,Y.H. (1992). Mitochondrial DNA alterations as ageing-associated molecular events. *Mutat Res* 275, 145-155.
  
110. Wei,Y.H., Lee,H.C. (2002). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 227, 671-682.
  
111. Woolner,S., O'Brien,L.L., Wiese,C., and Bement,W.M. (2008). Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *J Cell Biol* 182, 77-88.
  
112. Wright,W.E., Shay,J.W. (1992). The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp Gerontol* 27, 383-389.
  
113. Xu,G., Herzig,M., Rotrekl,V., and Walter,C.A. (2008). Base excision repair, aging and health span. *Mech Ageing Dev* 129, 366-382.
  
114. Yamasaki,K., Di,N.A., Bardan,A., Murakami,M., Ohtake,T., Coda,A., Dorschner,R.A., Bonnart,C., Descargues,P., Hovnanian,A., Morhenn,V.B., and Gallo,R.L. (2007). Increased serine protease activity and cathelicidin promotes skin inflammation in rosacea. *Nat Med* 13, 975-980.
  
115. Yang,D., Chertov,O., and Oppenheim,J.J. (2001). Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol* 69, 691-697.
  
116. Yun,J., Chae,H.D., Choy,H.E., Chung,J., Yoo,H.S., Han,M.H., and Shin,D.Y. (1999). p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor. *J Biol Chem* 274, 29677-29682.

117. Zaika,A., Irwin,M., Sansome,C., and Moll,U.M. (2001). Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem* 276, 11310-11316.
118. Zanetti,M. (2004). Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 75, 39-48.
119. Zanetti,M., Gennaro,R., and Romeo,D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 374, 1-5.
120. Zheng,Y., Niyonsaba,F., Ushio,H., Nagaoka,I., Ikeda,S., Okumura,K., and Ogawa,H. (2007). Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils. *Br J Dermatol* 157, 1124-1131.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. Peter Möller für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut und die Überlassung des Promotionsthemas ganz herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Silke Brüderlein, die mich während der gesamten Arbeit hervorragend betreute. Ihre große Hilfsbereitschaft bei allen Problemen und die jederzeit freundlich erteilten Ratschläge trugen zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des pathologischen Instituts, die mich geduldig in die Laborarbeiten einführten.

## Lebenslauf

**Persönliche Daten:** Lena Dietrich  
Geboren: 23.03.1984 in Erlangen  
Eltern: Dr. Hans Georg Dietrich,  
Christiane Dietrich, geb. Brüderlein  
Geschwister: Patrick Dietrich  
Familienstand: ledig

## Schulbildung:

1990 - 1994: Greutschule, Aalen  
1994 - 2000: Theodor-Heuss-Gymnasiums, Aalen  
2000 - 2003: Technisches Gymnasium, Aalen  
Schulabschluss mit Abitur im Sommer 2003

## Studium:

Frühjahr 2004: Immatrikulation an der Universität Ulm,  
Beginn des Zahnmedizinstudiums  
Frühjahr 2005: Naturwissenschaftliche Vorprüfung  
Frühjahr 2007: Zahnmedizinische Vorprüfung  
Winter 2009: Staatsexamen

## Beruflicher Werdegang:

23.12.2009: Approbation als Zahnärztin  
01.01. – 31.12.2010: Weiterbildungsassistentin zur Fachzahnärztin für  
Oralchirurgie, Praxis Dr. Dietrich in Aalen  
Seit 01.01.2011: Weiterbildungsassistentin zur Fachzahnärztin für  
Oralchirurgie, MKG-Chirurgie des Klinikums Saarbrücken

Aalen, den 25.05.2011

---

Lena Dietrich