

AUS DER ABTEILUNG
FÜR UNFALLCHIRURGIE
LEITER: PROF. DR. M. NERLICH
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ZELLULÄRE SENESZENZ VON CHONDROZYTEN UNTER
OXIDATIVEM STRESSEINFLUSS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Hartmann

2012

AUS DER ABTEILUNG
FÜR UNFALLCHIRURGIE
LEITER: PROF. DR. M. NERLICH
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

ZELLULÄRE SENESZENZ VON CHONDROZYTEN UNTER
OXIDATIVEM STRESSEINFLUSS

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Andreas Hartmann

2012

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Peter Angele

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

Tag der mündlichen Prüfung:

16. Oktober 2012

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Therapie von (osteo-)chondralen Defekten.....	2
1.2 Das Phänomen der zellulären Seneszenz und ihre Bedeutung	3
1.3 Signalwege der zellulären Seneszenz.....	5
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und Seneszenz.....	10
2 Fragestellung	13
3 Material und Methoden	14
3.1 Material.....	14
3.1.1 Geräte und Hilfsmittel	14
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien	16
3.1.3 Medien, Puffer und Lösungen.....	19
3.2 Biologisches Untersuchungsmaterial.....	22
3.3 Methoden	23
3.3.1 Zellbiologische Methoden.....	23
3.3.1.1 Gewinnung und Kultivierung humaner Chondrozyten..	23
3.3.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellproliferation.....	24
3.3.2 Bestimmung der letalen H ₂ O ₂ -Dosis.....	25
3.3.3 Seneszenznachweis mittels X-Gal-Färbung	26
3.3.4 Bestimmung der Telomerlänge (TRF-Assay)	26
3.3.4.1 DNA-Isolation	26
3.3.4.2 Bestimmung der DNA-Konzentration	27
3.3.4.3 Agarosegelelektrophorese.....	27
3.3.4.4 Restriktion.....	28
3.3.4.5 Southern Blot.....	30

3.3.4.6	Hybridisierung.....	32
3.3.4.7	Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente.....	33
3.3.4.8	Auswertung und Berechnung der mittleren Restriktionsfragmentlängen	34
3.3.5	Analyse der Genexpression	36
3.3.5.1	RNA-Isolation.....	36
3.3.5.2	DNase-Verdau.....	36
3.3.5.3	Messung der RNA-Konzentration.....	37
3.3.5.4	Agarosegelelektrophorese.....	37
3.3.5.5	cDNA-Synthese	37
3.3.5.6	PCR	38
3.3.6	Statistische Auswertung	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Optimierung des TRF-Assays.....	40
4.1.1	DNA-Isolation.....	40
4.1.2	Hybridisierung und Detektion	41
4.2	Bestimmung der letalen H ₂ O ₂ -Dosis	41
4.3	Analyse der Zellproliferation.....	43
4.3.1	Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter Kontrollbedingungen	43
4.3.2	Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter chronisch oxidativem Stress	44
4.3.3	Proliferationsverhalten nach akut oxidativem Stress	45
4.4	Analyse der Zellmorphologie	46
4.5	Analyse der SA β-Galaktosidase Expression.....	48
4.6	Analyse der Telomerlänge.....	50
4.6.1	Telomerlänge zunehmend seneszenten Chondrozyten unter Kontrollbedingungen und chronisch oxidativem Stress	50
4.6.2	Einfluss von akut oxidativem Stress auf die Telomerlänge junger und alter Chondrozyten	52

4.7 Analyse der Genexpression	53
4.7.1 Expression von TRF1 und TRF2	53
4.7.2 Expression von XRCC5	55
4.7.3 Expression von SIRT1	56
4.7.4 Expression von p21	57
5 Diskussion	59
5.1 Diskussion der Zellproliferation	60
5.2 Diskussion der Zellmorphologie	62
5.3 Diskussion der SA- β -Galaktosidase-Aktivität	63
5.4 Diskussion der Telomerlänge	65
5.5 Diskussion der Genexpression	68
5.6 Perspektiven	72
6 Zusammenfassung	73
Literaturverzeichnis	75
Danksagung	89
Erklärung zur Dissertation	90

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1—1:	Biologische Bedeutung der zellulären Seneszenz.....	5
Abbildung 1—2:	Telomerstruktur	6
Abbildung 1—3:	Einfluss der Telomerdysfunktion auf Krebs und Alterung	9
Abbildung 1—4:	Verschiedene Auslöser enden in zellulärer Seneszenz	10
Abbildung 1—5:	ROS als Vermittler zellulärer Seneszenz.....	12
Abbildung 3—1:	Integritätsüberprüfung der DNA	28
Abbildung 3—2:	Kontrollgel der DNA-Restriktion mit Hinfl	30
Abbildung 3—3:	Transferringel für den Southern Blot	31
Abbildung 3—4:	Aufbau des Southern Blots.....	32
Abbildung 3—5:	Aufbau der Hybridisierungsvorrichtung	33
Abbildung 3—6:	Gescannte Filmaufnahme eines Southern Blots.....	34
Abbildung 3—7:	Beispiel der Auswertung eines Southern Blots	35
Abbildung 3—8:	RNA-Kontrollgel.....	37
Abbildung 4—1:	Zellviabilität von Chondrozyten nach 2 stündiger Inkubation mit ansteigenden H ₂ O ₂ -Konzentrationen	42
Abbildung 4—2:	Zellviabilität von Chondrozyten nach chronisch oxidativer Stressexposition.....	43
Abbildung 4—3:	Individuelles Proliferationsverhalten der 5 untersuchten Chondrozytenkulturen unter Kontrollbedingungen.....	43
Abbildung 4—4:	Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter Kontrollbedingungen	44
Abbildung 4—5:	Vergleich des Proliferationsverhaltens von Kontrollgruppe und chronischer Gruppe	45
Abbildung 4—6:	Proliferationsverhalten von Chondrozyten unter oxidativem Stress.....	46
Abbildung 4—7:	Typische Morphologie junger und alter Chondrozyten	47
Abbildung 4—8:	Seneszenz-typische morphologische Veränderungen nach akuter subletaler oxidativer Stressexposition.....	48
Abbildung 4—9:	Vergleich der SA β-Galaktosidase Expression junger und alter Chondrozyten	49

Abbildung 4—10: Veränderung der SA β -Galaktosidase Expression nach akuter subletaler oxidativer Stressexposition	50
Abbildung 4—11: Telomerlängenentwicklung von Chondrozyten unter Kontrollbedingungen und chronisch oxidativem Stress.....	51
Abbildung 4—12: Relative Telomerlängenentwicklung von Chondrozyten unter Kontrollbedingungen und chronisch oxidativem Stress.....	51
Abbildung 4—13: Relative Telomerverkürzung junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 24 h und 4 Wochen nach akut oxidativer Stresseinwirkung.....	52
Abbildung 4—14: Relative TRF1-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition.....	54
Abbildung 4—15: Relative TRF2-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition.....	55
Abbildung 4—16: Relative XRCC5-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition.....	56
Abbildung 4—17: Relative SIRT1-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition.....	57
Abbildung 4—18: Relative p21-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition.....	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3—1:	Allgemein genutzte Geräte und Hilfsmittel	15
Tabelle 3—2:	Material für zellbiologische Arbeiten	15
Tabelle 3—3:	Material für Telomer-Analytik (TRF-Assay)	15
Tabelle 3—4:	Material für die Analyse der RNA-Expression	16
Tabelle 3—5:	Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien	16
Tabelle 3—6:	Chemikalien und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten ..	17
Tabelle 3—7:	Chemikalien und Reagenzien für β -Galaktosidase-Nachweis.....	17
Tabelle 3—8:	Chemikalien und Reagenzien für Telomeranalytik (TRF-Assay)	18
Tabelle 3—9:	Chemikalien und Reagenzien zur Analyse der RNA-Expression.....	19
Tabelle 3—10:	Medien für zellbiologische Arbeiten	19
Tabelle 3—11:	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen	20
Tabelle 3—12:	Lösungen und Puffer für β -Galaktosidase Nachweis	21
Tabelle 3—13:	Puffer für Elektrophorese	21
Tabelle 3—14:	Puffer für Photometrie	21
Tabelle 3—15:	Lösung für DNA-Isolation.....	21
Tabelle 3—16:	Lösungen für Southern Blot	21
Tabelle 3—17:	Lösungen und Puffer für Hybridisierung und Detektion.....	22
Tabelle 3—18:	Zusammensetzung Master-Mix.	39

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

λ	Wellenlänge
A	Absorption
A/C/G/T/N	Adenosin/Cytosin/Guanin/Thymin/Nukleotide
ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
ALT	Alternative lengthening of telomeres
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
Calcein-AM	Calceinacetoxymethylester
cDNA	Complementary DNA
cpd	Populationsverdopplung (cell population doubling)
CTP	Cytidintriphosphat
DDR	DNA-Damage Response
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DSB	Doppelstrangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EthD1	Ethidiumhomodimer 1
FCS	Fötales Kalbsserum (fetal calf serum)
FP	Frühe Passage
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDF	Humane diploide Fibroblasten
HDR	Homology directed repair
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
Hinf	Haemophilus influenzae
hTERT	Human telomere reverse transcriptase (katalytische Untereinheit der Telomerase)
kD	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
kpb	Kilobasenpaare
LN	Labornummer
M, mM, µM	Molar, Millimolar, Mikromolar
mbar	Millibar
min	Minute
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
mRNA	Messenger-RNA
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	Gesamtzellzahl
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NHEJ	Non-homologous end joining
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
p16	Protein 16
p21	Protein 21
p53	Protein 53
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	Potentia Hydrogenii

<i>r</i>	Korrelationskoeffizient
R ²	Bestimmtheitsmaß
Rb	Retinoblastom-Protein
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Real Time PCR
s	Sekunde
SA	Seneszenz-assoziiert
SASP	Seneszenz-assoziiierter sekretorischer Phänotyp (senescence-associated secretory phenotype)
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
SIPS	Stress-induzierte prämatüre Seneszenz (stress-induced premature senescence)
Sir2	Silent information regulator 2
SIRT1	Sirtuin 1
SP	Späte Passage
SSC	Natriumhydroxid-Citrat-Lösung
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TIN2	TRF1-interacting nuclear factor 2
TPP1	tripeptidyl peptidase 1
TRF	Telomer-Restriktionsfragmente
TRF1/2	Telomeric-repeat binding factor 1/2
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett

V	Volt
V	Volumen in ml
VT	Volumenteil
X	Verdünnungsfaktor
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5
Z	Mittelwert aller 4 Quadranten

1 Einleitung

Hyaliner Knorpel ist für die Homöostase von Gelenken von zentraler Bedeutung. Er besitzt einzigartige mechanische Eigenschaften und gewährleistet bei Unversehrtheit eine nahezu reibungs- und schmerzlose Bewegungsfreiheit. Hochspezialisierte, ortsansässige Chondrozyten produzieren die Knorpelmatrix bestehend aus Kollagenen, Proteoglykanen und weiteren nichtkollagenen Proteinen und sorgen für einen lebenslangen Ersatz degradierter Matrixmoleküle. Mit zunehmendem Lebensalter sinkt die Fähigkeit der Chondrozyten das Knorpelgewebe funktionstüchtig zu halten und das Risiko der Degeneration der für die Funktionalität wichtigen Knorpeloberfläche steigt.¹ Klinischer Endpunkt dieses Prozesses – der Arthrose – sind Schmerzen und Bewegungseinschränkung.² Als letzte Therapieoption steht bei komplettem Knorpelverlust heutzutage häufig lediglich der endoprothetische Oberflächenersatz zur Verfügung.³

Neben der dargestellten altersabhängigen primären Arthrose, der eine multifaktorielle Genese zugesprochen wird – darunter auch die Seneszenz von Chondrozyten⁴ – existiert eine sekundäre Form der Arthrose, die auf Fehlbelastungen bzw. unphysiologisch hoher Belastung der Gelenke beruht. Neben Übergewicht als wichtigem Risikofaktor entsteht sie meist nach traumatischen oder seltener atraumatischen (osteo-)chondralen Defekten.² Denn trotz der komplexen Struktur zeichnet sich Knorpelgewebe durch fehlende vaskuläre, lymphatische und nervale Versorgung aus – eine häufig angeführte Ursache für die fehlende oder unbefriedigende Selbstheilungsfähigkeit von Knorpel.^{5, 6} Untherapiert führen (osteo-)chondrale Defekte zu einer veränderten Biomechanik und unphysiologischen Belastungen, die weiteren Knorpelverlust zur Folge haben und nach einer mehrjährigen Latenz in das Endstadium der Arthrose münden.

Die Arthrose ist dabei unabhängig von der Ätiologie die häufigste Gelenkerkrankung weltweit und die verursachten volkswirtschaftlichen Kosten sind enorm.⁷ Allein in Deutschland beliefen sich die direkten Gesundheitskosten 2008 auf 7,6 Milliarden Euro, was einem Anstieg von fast 10% seit 2002 entspricht.⁸ Dazu kommen die sozioökonomischen Belastungen durch beispielsweise Arbeitsunfähigkeit oder Frühverrentung. Neben der drastisch eingeschränkten Lebensqualität der betroffenen Patienten erfordern somit auch gesundheitsökonomische Überlegungen verbesserte Therapieoptionen,

um die Progredienz der sekundären Arthrose nach traumatischen oder andersartigen Knorpeldefekten zu verhindern und zukünftig auch die Genese der primären Arthrose in frühen Stadien mit zellbasierten Methoden zu behandeln, um einen künstlichen Gelenkersatz möglichst zu verhindern oder zumindest zu verzögern.

1.1 Therapie von (osteo-)chondralen Defekten

In den letzten 60 Jahren wurden verschiedene Techniken entwickelt, um dem Problem der fehlenden Selbstheilung von (Knochen-)Knorpeldefekten zu begegnen. Im Gegensatz zu palliativen Techniken wie der arthroskopischen Lavage oder Debridement, die oft nur eine Schmerzreduktion und kurzfristige Wiederherstellung der Beweglichkeit erzielen,⁹⁻¹¹ ist das Ziel von reparativen und regenerativen Verfahren eine Knorpelheilung, um die Progression der Arthrose zu verhindern.⁵

Markraumeröffnende Verfahren wie die Abrasionsarthroplastik,¹² die Pridie-Bohrung¹³ oder die Technik der Mikrofrakturierung¹⁴ zählen zu den reparativen Methoden und basieren alle auf dem gleichen Heilungsprinzip: eine artifizielle Verletzung der subchondralen Platte führt zu einer Blutung aus dem Knochenmark in den Defekt des sonst avaskulären Knorpelgewebes. Das entstehende Blutgerinnsel enthält neben Wachstumsfaktoren und Entzündungsmediatoren mesenchymale Stammzellen, die in der Lage sind zu differenzieren und im Verlauf über Monate Reparaturknorpel zu bilden. Die kurz- und mittelfristigen Ergebnisse bezüglich Schmerzreduktion und Beweglichkeit über einen Zeitraum von etwa 3-5 Jahren sind gut, etwa 80% der Patienten zeigen eine signifikante klinische Besserung.^{5, 15} Der durch die MSCs gebildete Reparaturknorpel ist allerdings nicht hyaliner Knorpel, sondern minderwertiger Faserknorpel, der im Vergleich vermehrt aus Kollagen I anstelle von Kollagen II besteht. Es wird deshalb eine akzelerierte Degeneration des Ersatzknorpels angenommen, weshalb die markraumeröffnenden Verfahren auf lange Sicht nicht vor einer Progression der Arthrose schützen.⁵

Um dem Problem des minderwertigen Reparaturknorpels – das allen reparativen Verfahren eigen ist – zu lösen, wurden regenerative Methoden entwickelt mit dem Ziel, die originale hyaline Knorpelstruktur wiederherzustellen. Bei dem ersten regenerativen Verfahren, der autologen osteochondralen Transplantation oder Mosaikplastik nach *Hangody*, werden je nach Größe des Knorpeldefekts eine oder mehrere osteochondrale Zylinder aus

Minderbelastungszonen des Gelenks entnommen und in den Defekt transplantiert.¹⁶ Dadurch wird der Defekt umgehend mit hyalinem Gelenkknorpel repariert. Andererseits kann die Transplantatgewinnung Ursache von signifikanter Morbidität an den Entnahmestellen sein, die vom Körper lediglich mit minderwertigem Faserknorpel gefüllt werden.^{17, 18} Die Anwendung der Methode ist darüber hinaus aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von transplantierbaren osteochondralen Zylindern auf kleinere (bis zu 4 cm²) Defekte beschränkt.

Die aktuellste und vielversprechendste Entwicklung in der Therapie von osteochondralen Defekten ist die autologe Chondrozytentransplantation (ACT).¹⁹ Bei diesem regenerativen Verfahren mit dem Ziel der hyalinen Defektreparatur werden Chondrozyten per Knorpelbiopsie isoliert, *in vitro* vermehrt und in den mit einem Periostlappen abgedeckten Knorpeldefekt eingebracht. Stetige Weiterentwicklungen des Verfahrens bedienten sich an Erkenntnissen des Tissue Engineering, so dass heutzutage meist matrixassoziierte Verfahren zur Anwendung kommen: Die Chondrozyten werden in unterschiedlichen Träger-substanzen (scaffolds) ausgesät, die zusammen mit Wachstumsfaktoren, optimierter Perfusion und mechanischer Stimulation die Differenzierung fördern und zu einer Vereinfachung der Operationstechnik führen.^{20, 21} Während sich die kurz- bis mittelfristigen Ergebnisse zwischen den verfügbaren Therapiemöglichkeiten kaum unterscheiden, scheint die autologe Chondrozytentransplantation vor allem langfristig und histologisch bessere Erfolge zu erzielen.^{5, 22, 23}

Voraussetzung für die autologe Chondrozytentransplantation – die wohl zu den ersten klinischen Anwendungen des Tissue Engineering zu zählen ist – ist die erhebliche *in vitro* Vermehrung von aus Knorpelbiopsien isolierter Chondrozyten. Die meisten somatischen Zellen besitzen allerdings nur ein beschränktes Teilungspotential und zeigen das Phänomen der zellulären Seneszenz mit begleitenden positiven und negativen Effekten.

1.2 Das Phänomen der zellulären Seneszenz und ihre Bedeutung

Bereits vor etwa 50 Jahren zeigte *Leonard Hayflick*, dass aus fetalem Lungengewebe isolierte humane Fibroblasten (HDF) nach einer begrenzten Anzahl von Zellverdopplungen (etwa 50 ± 10 cpd) *in vitro* ihr Proliferationspotential

ausgeschöpft hatten und die Replikation irreversibel einstellten.²⁴ *Hayflick* prägte hierfür den Begriff der zellulären replikativen Seneszenz (lat.: senex = alter Mann, Greis) und die maximale Anzahl von Zellverdopplungen diploider humaner Zellen bis zum Verlust des Proliferationspotentials ist auch heute noch als Hayflick-Limit bekannt. Bereits damals wurde das Phänomen der *in vitro* beobachteten Seneszenz sowohl mit dem Alterungsprozess bzw. altersassoziierten Erkrankungen *in vivo*, als auch als Mechanismus der Tumorsuppression in Verbindung gebracht.²⁵

Wurde die zelluläre Seneszenz von vielen lange Zeit als Artefakt der *in vitro* Kultivierung angesehen oder zumindest ihre Bedeutung *in vivo* angezweifelt,²⁶ bestätigten neuere Forschungsergebnisse die ursprünglich geäußerten Vermutungen nicht nur, sondern zeigten mit der Gewebeheilung und der Tumorprogression weitere, teilweise paradoxe Gebiete auf, in denen die Seneszenz von Zellen mit einhergehenden Veränderungen involviert ist.²⁷ Seneszente Zellen bleiben metabolisch aktiv und unterscheiden sich in einigen teils charakteristischen – aber nicht hundertprozentig spezifischen – Veränderungen von terminal differenzierten oder teilungsfähigen Zellen. So zeichnen sich seneszente Zellen durch einen durch physiologische Reize irreversiblen Zellzyklusarrest in sonst promitogener Umgebung aus, der lediglich in manchen Zellen durch artifizielle genmanipulative Inaktivierung des p53 Tumorsuppressorgens überwunden werden kann.²⁸ Dieser Zellzyklusarrest wird als wichtige Hürde in der Kanzerogenese angesehen, kann aber auch zu einer Depletion verfügbarer Stammzellen führen, die für die Gewebsreparatur und –homöostase essentiell sind.^{29, 30} Seneszente Zellen sind morphologisch bis auf das doppelte ihrer nichtseneszenten Ausgangsgröße vergrößert²⁵ und exprimieren die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase.³¹ Darüber hinaus zeigten vor allem Studien der letzten Jahre, dass signifikante Genexpressionsänderungen zu einem veränderten Muster an sezernierten Proteinen führen (Seneszenz-assoziiertes sekretorisches Phänotyp, SASP).³² Zu den sezernierten Proteinen zählen u.a. Wachstumsfaktoren, (proinflammatorische) Zytokine, extrazelluläre Matrixkomponenten und matrixdegradierende Proteasen. Diese Proteine führen zu einer Veränderung der Mikroumgebung und werden durch ihre auto- und parakrine Wirkungen als Ursache für die schädlichen Effekte seneszenten Zellen in Bezug auf erleichtertes Tumorstadium³³ oder altersassoziierten Erkrankungen³⁴ wie Arthrose^{35, 36} angesehen. Andererseits scheinen die sezernierten Proteine seneszenten Zellen auch protektive Effekte

zu haben, indem sie bei der Wundheilung vor überschießender Fibrosierung schützen.³⁷

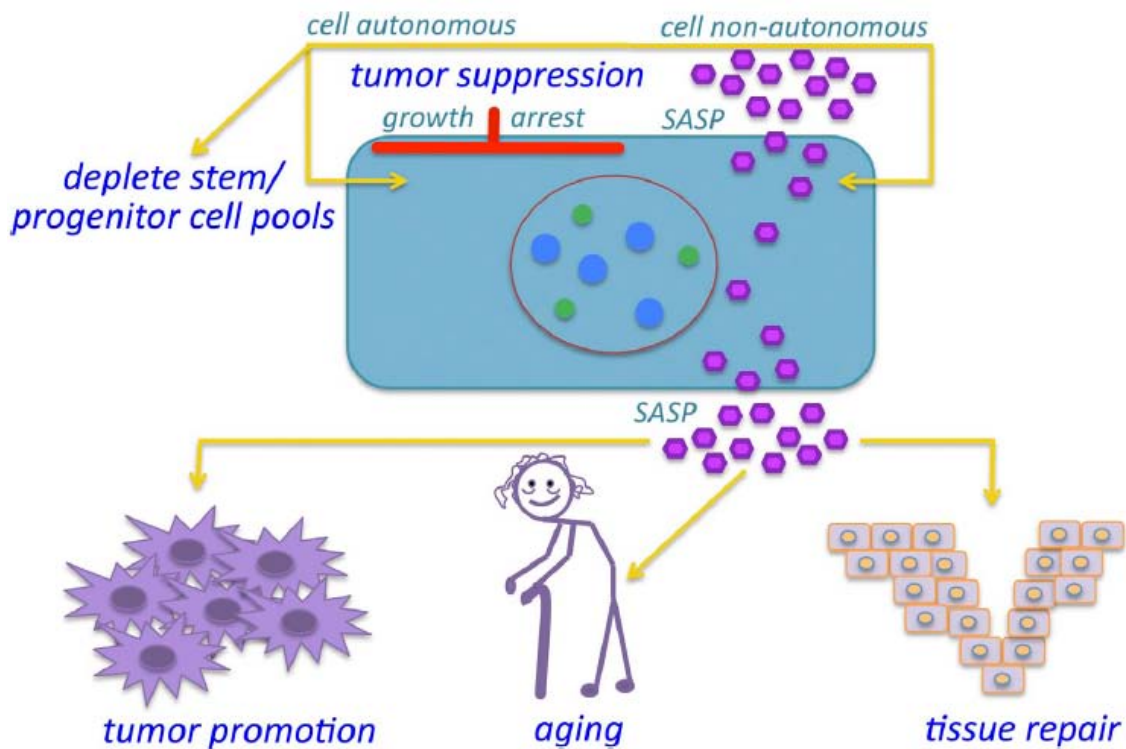


Abbildung 1—1: Biologische Bedeutung der zellulären Seneszenz.²⁷

Baker et al. konnten darüber hinaus mit Hilfe eines transgenen Mausmodells, in dem durch Medikamentenzufuhr selektiv seneszente Zellen abgetötet werden konnten, eine ursächliche Beteiligung seneszenten Zellen an altersassoziierten Krankheiten *in vivo* nachweisen.³⁸ Durch spezifische Elimination seneszenten Zellen *in vivo* konnte das Auftreten altersassoziierten Krankheiten verzögert werden.

Nachdem die komplexen Interaktionen seneszenten Zellen in unterschiedlichsten Bereichen aufgezeigt wurden – darunter auch die Beteiligung seneszenten Chondrozyten an der Pathogenese der Arthrose – bleibt die Frage zu klären, welche Mechanismen zur zellulären Seneszenz führen. Nur durch fundamentale Kenntnisse auf diesem Gebiet ist eine Beeinflussung und somit Protektion vor schädlichen Einflüssen seneszenten Zellen möglich.

1.3 Signalwege der zellulären Seneszenz

Bereits die Versuche von Hayflick ließen vermuten, dass Zellen eine Art „inneren Zähler“ haben mussten: die Fibroblasten traten stets nach etwa 50

bilden und weitere assoziierte Proteine, darunter Proteine der DNA-Reparatur wie XRCC5, sind maßgeblich beteiligt.⁴⁵ Zwei Untereinheiten des Shelterin, TRF1 und TRF2 (telomeric-repeat binding factor 1 und 2), binden spezifisch an die doppelsträngigen telomerischen TTAGGG-Wiederholungen und führen zusammen mit dem dritten DNA-bindenden Protein POT1 (protection of telomeres 1), das eine Spezifität für die Telomersequenz in Einzelstrangform aufweist, zu einer selektiven Akkumulation der restlichen Shelterin Proteine (TIN2, TPP1 und Rap1) im Bereich der Telomerregion.^{46, 47} Diese komplexe Struktur der Telomere in Verbindung mit den assoziierten Proteinen sorgt dafür, dass die Enden linearer Chromosomen von den Zellen nicht als DNA-Doppelstrangbruch (DSB) erkannt werden. Die in diesem Fall normalerweise aktivierten Reparaturmechanismen – homology-directed repair (HDR) und nonhomologous end joining (NHEJ) – werden unterdrückt und die Telomere sorgen auf diese Weise für genomische Stabilität und Schutz der Chromosomen.^{42, 48} Umso erstaunlicher ist es, dass Ku70/80 – eine Komponente des NHEJ Signalweges – ebenfalls in der Telomerregion akkumuliert. Ku70/80, dessen Ku80 Untereinheit durch das von uns untersuchte XRCC5 Gen kodiert wird,⁴⁹ unterstützt in der Reparatur von DSB den Annäherungsprozess der beiden Enden.^{50, 51} Im Bereich der Telomere wird vermutlich durch Interaktionen mit Proteinen des Shelterin-Komplexes dieser Signalweg blockiert, Ku70/80 scheint hier ganz im Gegenteil sogar an der Unterdrückung des zweiten Reparaturmechanismus von DSB, dem HDR, beteiligt zu sein.^{52, 53}

Olovnikov und *Watson* entdeckten Anfang der 1970er Jahre die abnehmende Telomerlänge als molekularbiologisches Korrelat zu *Hayflicks* beobachteter limitierter Teilungskapazität diploider Zellen und beschrieben das End-Replikationsproblem.^{54, 55} DNA-Polymerasen synthetisieren neue DNA lediglich in 5' → 3'-Richtung und können lineare Chromosomen nicht komplett replizieren, da ein für den Initiierungsprozess notwendiger RNA-Primer auf jedem DNA-Tochterstrang verbleibt. Die letzten Primer werden durch eine 5' → 3'-Exonuklease entfernt, allerdings kann die DNA-Polymerase die entstehenden Lücken aufgrund einer fehlenden 3'-OH-Bindungsstelle nicht auffüllen. Als Konsequenz muss die Replikationsmaschinerie ein kleines Stück am Ende der Chromosomen (Telomere) unkopiert lassen. Die repetitiven, nichtkodierenden Telomere schützen auf diese Weise die kodierende genomische DNA, allerdings führt das End-Replikationsproblem mit jeder Zellteilung zu kürzer werdenden

Chromosomen. Manche Zellen wie Tumor- oder Keimbahnzellen, die nicht der replikativen Seneszenz unterliegen, umgehen das End-Replikationsproblem durch Expression des Enzyms Telomerase. Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der TTAGGG Wiederholungen *de novo* an die Enden von Chromosomen synthetisiert und die Telomere verlängern kann.^{56, 57}

In der Tat konnte eine abnehmende Telomerlänge in verschiedensten mitotisch aktiven Zellen mit zunehmenden Zellverdopplungen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden, für Chondrozyten *in vivo* beispielsweise etwa 22bp pro Jahr.⁵⁸⁻⁶¹ Zudem vermindert sich mit abnehmender Telomerlänge die replikative Kapazität von Zellen: Fibroblasten mit kurzen Ausgangstelomeren zeigten eine geringere replikative Kapazität im Vergleich zu Fibroblasten mit längeren Telomeren.⁶² Die beobachteten Verkürzungsraten der Telomere pro Zellverdopplungen mit einer Spannbreite von etwa 20 – 200bp je nach Zelle und untersuchender Gruppe und die nicht immer vorhandene Korrelation der replikativen Kapazität mit dem chronologischen Alter des Donors legen allerdings schon nahe, dass das End-Replikationsproblem lediglich einen Teil zum kontinuierlichen Telomerverlust beiträgt.

Unterschreitet die Telomerlänge eine gewisse Grenze, tritt die Zelle zum Schutz vor genomischer Instabilität in das Stadium der zellulären replikativen Seneszenz ein oder begeht Apoptose. Zwar ist die kritische Telomerlänge – sofern sie denn überhaupt existiert – auch heute noch nicht bekannt, doch zeigen neuere Studien, dass kurze Telomere aufgrund geringer werdender Interaktionen den Schutz des Shelterin-Komplexes verlieren und in der Folge als DSB erkannt werden.⁶³ Dies führt zu einer Aktivierung der DNA-Damage Response (DDR) Signalwege,⁶⁴ die schlussendlich das Tumorsuppressorprotein p53 – den „Wächter des Genoms“ – involvieren.⁶⁵

Der p53 Signalweg ist neben dem pRB/p16INK4a Tumorsuppressorsignalweg die zentrale Voraussetzung für den Eintritt in die zelluläre Seneszenz.^{26-29, 65} p53 vermittelt über p21 den für die Seneszenz charakteristischen irreversiblen Zellzyklusarrest, unterliegt selbst allerdings auch anderen regulatorischen Proteinen: SIRT1 – eins von sieben beim Menschen bekannten Sirtuinen – fungiert mit seiner NAD-abhängigen Deacetylase unter anderem als negativer Regulator von p53.⁶⁶ Sirtuinen konnte ein positiver Effekt auf die Lebensspanne unterschiedlicher Organismen nachgewiesen werden^{67, 68} und durch den hemmenden Einfluss auf p53 scheint es auch vor einem Eintritt in die Seneszenz zu schützen.^{69, 70}

Die Bedeutung sowohl des p53 als auch des pRB/p16INK4a Signalweges für die zelluläre Seneszenz zeigt sich an der Tatsache, dass viele – wenn nicht sogar alle – maligne Zellen Mutationen in mindestens einem der beiden Signalwege haben. Dadurch umgehen diese Zellen die zelluläre Seneszenz und haben in Verbindung mit der Telomeraseexpression ein unbegrenztes replikatives Teilungspotential.^{27, 71}

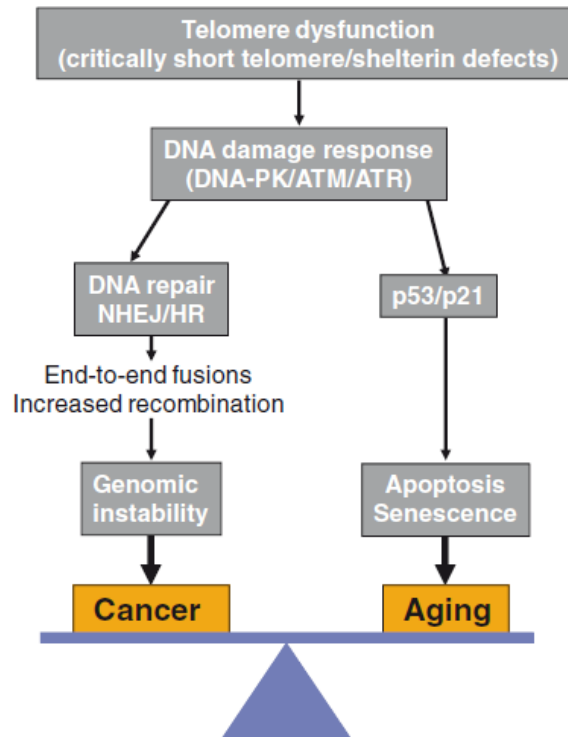


Abbildung 1–3: Einfluss der Telomerdysfunktion auf Krebs und Alterung⁷²

Kürzer werdende Telomere sind allerdings nicht der einzige Grund für den Eintritt in die zelluläre Seneszenz. Neben der replikativen zellulären Seneszenz zeigen diverse Studien auch die Existenz einer prämaturnen zellulären Seneszenz, die durch unterschiedliche exogene oder endogene Stressreize initiiert wird und ohne signifikanten Telomerverlust einhergeht. Zuerst in humanen Fibroblasten nach Expression einer onkogenen Form von RAS – einem zyttoplasmatischen Vermittler mitogener Signale – entdeckt,⁷³ wurde diese Form der zellulären Seneszenz als onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) bezeichnet. Allerdings konnte vielen weiteren Stressoren – darunter auch Wasserstoffperoxid H_2O_2 ^{74, 75} – ebenfalls eine prämaturne, Seneszenz-induzierende Wirkung nachgewiesen werden, so dass die OIS von vielen als Spezialform der Stress-induzierten prämaturnen Seneszenz (SIPS) gesehen wird.²⁹ Die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Signalwege in Bezug auf

den auslösenden Seneszenzmechanismus sind komplex und Gegenstand intensiver Forschung, eine Beteiligung von DNA-Damage Response (DDR) und den zentralen Tumorsuppressor-Signalwegen p53 und pRB/p16INK4a in unterschiedlicher Bedeutung scheint aber größtenteils unumstritten.^{27, 29, 76}

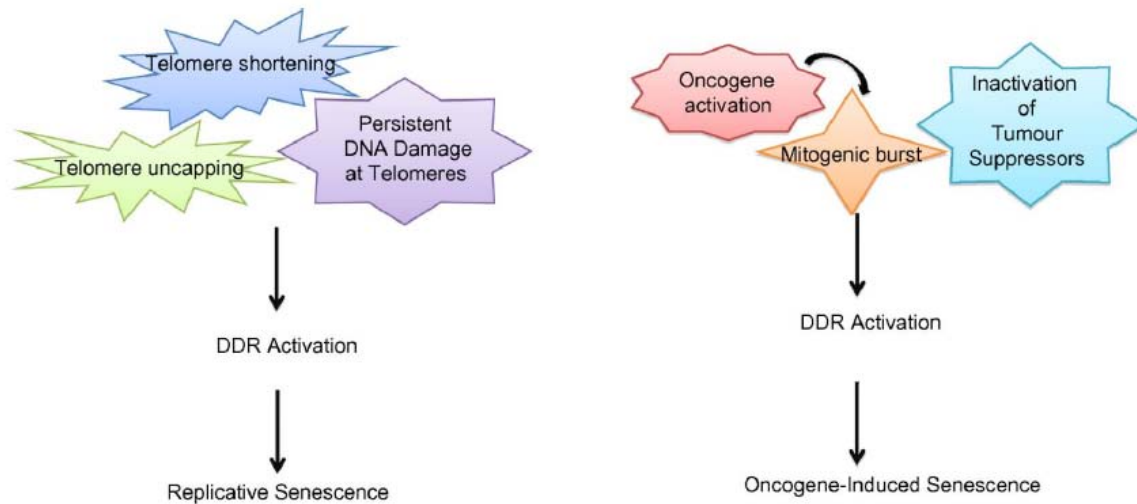


Abbildung 1—4: Verschiedene Auslöser enden in zellulärer Seneszenz⁷⁶

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und Seneszenz

Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) werden seit der „Free Radical Theory of ageing“ 1956 mit dem Alterungsprozess und somit indirekt mit zellulärer Seneszenz in Verbindung gebracht.^{77, 78} Freie Radikale üben demnach schädliche Einflüsse auf verschiedene Zellbestandteile (Proteine, Lipide, Mitochondrien, DNA) aus, deren Akkumulation zur Entwicklung von Krebs und Alterserscheinungen beiträgt. Oxidativem Stress konnte in der Folge eine zentrale Rolle in der Pathogenese vieler unterschiedlicher Erkrankungen zugesprochen werden. Das weite Spektrum von neurologischen Erkrankungen wie der amyotrophen Lateralsklerose,⁷⁹ Alzheimer⁸⁰ und Parkinson⁸¹ über ophthalmologische Krankheitsbilder wie Katarakt⁸² bis zur Atherosklerose⁸³ und – von besonderem Interesse – der Arthrose^{84, 85} zeigen das große Interesse an und die Bedeutung von Sauerstoffradikalen.⁸⁶

Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wie dem anionischen Superoxidradikal $\cdot\text{O}_2^-$, Wasserstoffperoxid H_2O_2 oder dem Hydroxylradikal $\cdot\text{OH}^-$ ist eine unausweichliche biochemische Konsequenz des aeroben Metabolismus. Neben den physiologischen Quellen wie Mitochondrien, Peroxisomen oder dem Cytochrom P450 wird ein Anstieg intrazellulärer ROS auch durch

externe Faktoren wie ionisierende Strahlen, Zytostatika, Umweltgifte oder hohe O₂-Umgebungskonzentrationen induziert. Demgegenüber steht ein zell-immanentes antioxidatives System, das mit Hilfe eines enzymatischen Teils (Superoxiddismutase, Katalase, Peroxidase) und eines nicht-enzymatischen Teils (Glutathion, Vitamine A, C, E) an der Aufrechterhaltung eines physiologischen Gleichgewichts beteiligt ist. Steigt die Konzentration an ROS über das physiologische Maß, befindet sich die Zelle im Zustand des oxidativen Stresses und der damit einhergehenden Schädigung unterschiedlichster Zellbestandteile.^{86, 87}

Wie bereits in Kapitel 1.3 angedeutet, ist der Telomerverlust mitotisch aktiver Zellen nicht allein durch das End-Replikationsproblem determiniert. Bereits 1977 konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten ein höheres replikatives Potential besitzen als das Hayflick-Limit voraussagt, wenn sie in einer Umgebung mit einer Sauerstoffkonzentration von 10% anstatt der normalen atmosphärischen 20% kultiviert werden.⁸⁸ Später konnte dieses Ergebnis mit der Telomerlänge in Verbindung gebracht werden: Die Kultivierung humaner Fibroblasten in einer 40%-O₂-Umgebung führte zu einer drastischen Reduktion des replikativen Potentials, das mit einer mehr als 300-prozentigen Zunahme des Telomerverlusts pro Zellverdopplung einherging.⁸⁹ Der Telomerverlust mitotisch aktiver Zellen mit direktem Einfluss auf den Eintritt in die replikative Seneszenz ist somit eine Kombination aus dem End-Replikationsproblem und dem Einfluss externer Stressoren – im Speziellen O₂ bzw. ROS – und Protektoren (Antioxidantien), so dass auch der replikativen Seneszenz eine Stresskomponente zugesprochen wird.^{90–94} Doch die Interaktionen von ROS und Seneszenz sind noch vielschichtiger: Neben dem negativen Effekt von ROS niedriger Konzentration auf die Telomerlänge und die replikative Seneszenz, induzieren subletale Dosen reaktiver Sauerstoffspezies die Form der zellulären Seneszenz, die ohne Abnahme der Telomerlänge auftritt (SIPS, vgl. Kapitel 1.3).^{74, 95, 96} Ursächlich für diese Form wird der direkte telomerische und genomische DNA-Schaden angesehen, der über den DDR-Signalweg und p53 → p21 (teilweise auch p16) die Seneszenz vermittelt. Darüber hinaus wurde eine Beteiligung der ROS an der Aufrechterhaltung der OIS nachgewiesen⁹⁷ – ein Beispiel für die Rolle der ROS als physiologisch auftretende Signalmoleküle, die die Transkription unterschiedlicher Zielgene reguliert und die ehemals allzu negative bzw. einseitig schädigende Rolle der ROS in Frage stellt.^{76, 98–100}

Die Interaktionen und Zusammenhänge von zellulärer Seneszenz und ROS waren und sind Untersuchungsgegenstand vieler Studien und weit davon entfernt, komplett verstanden zu werden. Chondrozyten sind spezialisierte Zellen eines avaskulären Gewebes mit einhergehender hypoxischer *in vivo* Umgebung und unterscheiden sich daher von den meisten somatischen Zellen.¹⁰¹ Neue Erkenntnisse bezüglich der Effekte oxidativen Stresses auf kultivierte humane Chondrozyten bilden die Basis, in Zukunft die Qualität von *in vitro* hergestelltem Knorpelgewebe im Rahmen des Tissue Engineering zu verbessern.

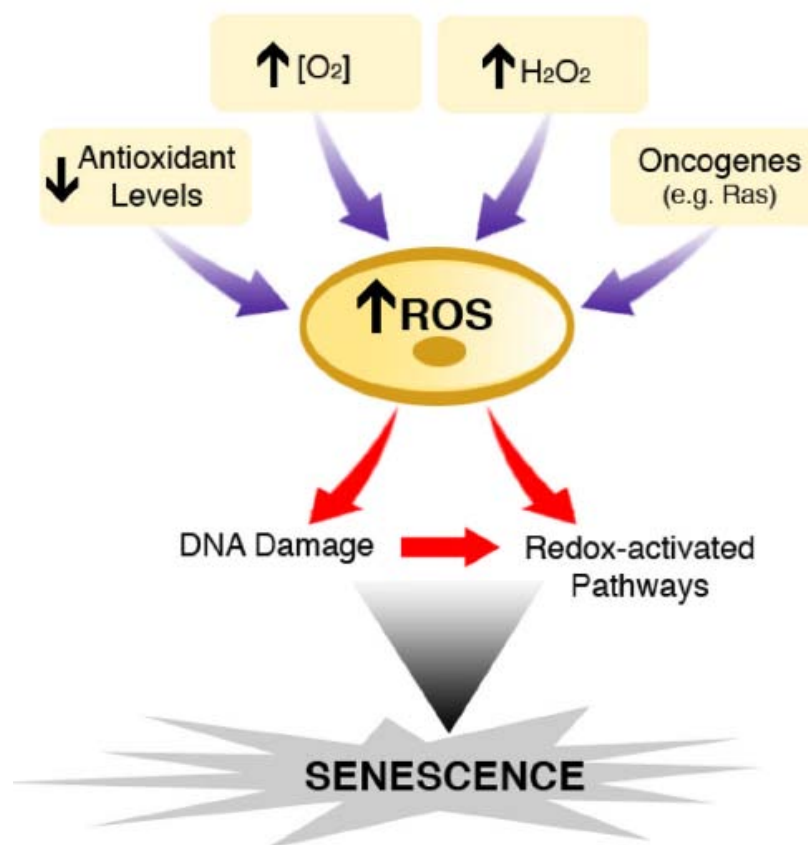


Abbildung 1—5: ROS als Vermittler zellulärer Seneszenz¹⁰²

2 Fragestellung

Die klinische Anwendung des Tissue Engineering im Rahmen der autologen Chondrozytentransplantation erfordert eine mehrwöchige *in vitro* Kultivierung isolierter Chondrozyten, um eine suffiziente Zellzahl vor der Implantation zu erreichen. Chondrozyten verfügen nur über ein begrenztes replikatives Potential und treten in das Stadium der Seneszenz ein. Senescente Zellen ändern durch sezernierte Proteine die lokale Mikroumgebung und ihre kausale Beteiligung an altersassoziierten Erkrankungen wie Arthrose scheint gesichert. Oxidativer Stress wird dabei seit Jahrzehnten mit dem Alterungsprozess und zellulärer Seneszenz in Verbindung gebracht.

Chondrozyten unterscheiden sich von vielen somatischen Zellen durch die Tatsache, dass Knorpel ein avaskuläres Gewebe und die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff eingeschränkt ist. Ziel dieser Arbeit war es, die Einflüsse von oxidativem Stress in chronischer und akuter Form auf die Zellbiologie *in vitro* kultivierter Chondrozyten zu untersuchen und neue Erkenntnisse für ein verbessertes Tissue Engineering zu gewinnen.

Nach Etablierung und Anpassung des H₂O₂-Modells an Chondrozyten als anerkanntes Stressmodell zur Induktion von zellulärer Seneszenz wurden verschiedene Aspekte akut und chronisch oxidativer Stresseinwirkung auf kultivierte Chondrozyten untersucht:

- Proliferationsverhalten der Chondrozyten
- zellmorphologische Veränderungen
- Expression der SA- β -Galaktosidase
- Bestimmung der Telomerlänge
- Expression Telomer-assoziiierter Shelterin-Proteine (TRF1, TRF2)
- Expression von DNA-Reparaturgenen (XRCC5)
- Expression von Zellzyklusregulatoren/-modulatoren (p21, SIRT1)

Für die Versuche wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Methoden im Tissue Engineering Labor der Unfallchirurgie Regensburg etabliert und optimiert:

- β -Galaktosidase Färbung
- DNA-Isolierung
- TRF-Assay
- Primer für die RT-PCR

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Hilfsmittel

Brutschrank:	HERAcell 240	Heraeus, Hanau
Gefriertrockner: (Speed Vac)	Alpha RVC	Christ, Osterode
Geldokumentation:	UV-Photosystem	MWG Biotech, Ebersberg
Gelelektrophorese:	Consort E834 (Elektrophoresegerät)	Peqlab, Erlangen
	EasyCast TM (Gelkammer 7x7 cm)	Peqlab, Erlangen
	SubCell GT (Gelkammer 15x15 cm)	BioRad, München
Heizofen:	Heraeus function line	Heraeus, Hanau
Mikroskope:	Fluovort	Leitz, Weimar
	Dialux 20 EB	Leitz, Weimar
Mikroskopkamera:	DMC 2	Polaroid, Offenbach
Pasteur-Pipetten:	Glas 230 mm	VWR Int., Darmstadt
pH-Messgerät:	Labor-pH-Meter 766	Knick, Berlin
Photometer:	BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
	Picodrop 100	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipetten :	5, 10, 25, 50 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Pipettierhilfe:	Pipetboy acu	Integra, Fernwald
Pipettenspitzen:	epTips filter 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reinraumwerkbank: (Laminar Flow)	M18	Schulz Lufttechnik GmbH, Sprockhövel
Schüttler:	Vortex Genie 2	Roth, Karlsruhe
Taumler:	Polymax2040	Heidolph, Schwabach
Verschlussfolie:	Parafilm	American National Can

Waage:	EG 600-2M	Kern, Balingen-Frommern
Wärmeblock:	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Wärmeplatte:	Medax	Nagel GmbH
Wasserbad:	WB 10	Memmert, Schwabach
Zentrifugen:	Multifuge 3s	Heraeus, Hanau
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
	Centrifuge/Vortex	Kisker, Steinfurt
Zentrifugenröhrchen:	15ml, 50ml	BD Falcon, Heidelberg

▲ **Table 3–1:** Allgemein genutzte Geräte und Hilfsmittel

Filter:	Sterilfilter 40 µm	BD Falcon, Heidelberg
Gefäße:	Zellkulturflaschen 75 cm ²	Sarstedt, Newton, NC
	6-Well-Platten	BD Falcon, Heidelberg
	96-Well-Platten	BD Falcon, Heidelberg
	Kryoröhrchen	Nunc, Rochester, NY
Zellschaber:	Cell Scraper	Nunc, Rochester, NY
Zellzählung:	Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen

▲ **Table 3–2:** Material für zellbiologische Arbeiten

Detektion:	Hyperfilm Amersham	Amersham Biosciences, Freiburg
	M35 X-OMAT Processor (Filmentwickler)	Kodak, Rochester, NY
	Kodak X-OMAT Kassette	Kodak, Rochester, NY
	Telometric 1.2 (Software)	Fox Chace Cancer Center
Southern Blot:	Nylonmembran, positiv geladen	Osmonics Inc., Minnetonka, MN
Spezielle Reaktionsgefäße:	Safe-Lock 1,5 ml (Eppendorf)	Eppendorf, Hamburg
	SafeSeal-Tips (DNase-, RNase-, pyrogenfrei)	Biozym, Hessisch Oldendorf

▲ **Table 3–3:** Material für Telomer-Analytik (TRF-Assay)

Spezielle Reaktionsgefäße:	Safe-Lock 1,5 ml (Eppendorf)	Eppendorf, Hamburg
	SafeSeal-Tips (DNase-, RNase-, pyrogenfrei)	Biozym, Hessisch Oldendorf
	LightCycler Capillaries	Roche, Mannheim
PCR-Gerät:	LightCycler	Roche, Mannheim

▲ **Tabelle 3—4:** Material für die Analyse der RNA-Expression

3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Borsäure		Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau		Sigma, Taufkirchen
DEPC		Sigma, Taufkirchen
EDTA		Sigma, Taufkirchen
Ethanol		Merck, Darmstadt
Formamid		Merck, Darmstadt
HCl 37%		Merck, Darmstadt
Maleinsäure		Sigma, Taufkirchen
MgCl ₂		Sigma, Taufkirchen
NaCl		Merck, Darmstadt
NaOH		Merck, Darmstadt
SDS		Roth, Karlsruhe
Tris-Acetat		Sigma, Taufkirchen
Tris-Base		Roth, Karlsruhe
Tris-HCl		Merck, Darmstadt
Tween 20 (Polyoxy-ethylenesorbitan-mono-laureat)		Sigma, Taufkirchen

▲ **Tabelle 3—5:** Allgemein verwendete Chemikalien und Reagenzien

Medium:	RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
	FCS (nicht hitzeinaktiviert)	PAN, Aidenbach
	Hepes-Puffer	Gibco, Karlsruhe
	L-Glutamin	Gibco, Karlsruhe
	Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe
Knorpelandaue:	DNase II B	Sigma, Taufkirchen
	Hyaluronidase aus Schafshoden, Typ II	Sigma, Taufkirchen
	Kollagenase P	Boehringer, Mannheim
Oxidativer Stress:	Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Passage:	DPBS (pH 7,4)	Cambrex, Verviers, Belgien
	0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA	Gibco, Karlsruhe
	Methylenblau	Merck, Darmstadt
Viabilitätsprüfung:	Live/Dead Kit	Invitrogen, Darmstadt

▲ **Tabelle 3—6:** Chemikalien und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Fixierung:	DPBS (pH 7,4)	Cambrex, Verviers, Belgien
	Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Färbung:	Bromo-chloro-indolyl- galaktopyranosid (X-Gal)	Invitrogen, Darmstadt
	$K_3[Fe(CN)_6]$	Merck, Darmstadt
	$K_4[Fe(CN)_6]$	Merck, Darmstadt
	Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
	Zitronensäure	Merck, Darmstadt

▲ **Tabelle 3—7:** Chemikalien und Reagenzien für β -Galaktosidase-Nachweis

DNA-Isolation und Restriktion:	High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche, Mannheim
	HinfI, 5000 U	New England Biolabs, Frankfurt
	NEBuffer 4	New England Biolabs, Frankfurt
	λ -DNA	Roche, Mannheim
Gelelektrophorese:	Agarose	Sigma, Taufkirchen
	Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
	1 kb DNA-Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
	DIG Molecular Weight Marker II DNA	Roche, Mannheim
Hybridisierung und Detektion:	Telomersonde: (TTAGGG) ₇ , 3'/5'-Digoxigenin-gelabelt	Roth, Karlsruhe
	N-Lauroylsarkosin	Sigma, Taufkirchen
	Blocking Powder	Merck, Darmstadt
	Anti-Digoxigenin-AP	Roche, Mannheim
	CDP-Star, ready to use	Roche, Mannheim

▲ **Tabelle 3—8:** Chemikalien und Reagenzien für Telomeranalytik (TRF-Assay)

RNA-Isolation:	RNAzol	Tel-Test, Inc., Friendsfield, TX
	Chloroform	Merck, Darmstadt
	Isopropanol	Merck, Darmstadt
Gelelektrophorese:	Agarose	Sigma, Taufkirchen
	Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
	RNA-Sample-Loading- Buffer	Sigma, Taufkirchen
DNase Verdau:	DNA-free™ Kit	Ambion, Darmstadt
cDNA-Synthese:	Oligo(dT)	Roche, Mannheim
	dNTP	Roche, Mannheim
	SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
PCR:	LightCycler FastStart DNA Master SYBR-Green I	Roche, Mannheim
	Primer für LightCycler- PCR: TRF1, TRF2, p21, SIRT1, XRCC, GAPDH	TIB MOLBIOL, Berlin

▲ **Tabelle 3—9:** Chemikalien und Reagenzien zur Analyse der RNA-Expression

3.1.3 Medien, Puffer und Lösungen

Chondrozytenmedium:	RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
	FCS (nicht hitzeinaktiviert)	10%
	Hepes-Puffer	1%
	L-Glutamin	1%
	Penicillin/Streptomycin	1%
Knorpelandaumedium:	RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
	Penicillin/Streptomycin	1%
	Kollagenase	16,6%
	DNase II B	16,6%
	Hyaluronidase	16,6%

▲ **Tabelle 3—10:** Medien für zellbiologische Arbeiten

DEPC-Wasser:	DEPC	0,2%
	Aqua dest.	
10x TBE-Puffer:	Tris-Base	890 mM
	Borsäure	890 mM
	EDTA (pH 8,0)	20 mM
	DEPC-Wasser	
20x SSC (pH 7,0):	NaCl	3,0 M
	Tri-Na-Citrat	0,3 M
	DEPC-Wasser	
2x SSC (pH 7,0):	20x SSC	10%
	DEPC-Wasser	
SDS 10% (pH 7,2):	SDS	10%
	DEPC-Wasser	
Maleinsäurepuffer (pH 7,5):	Maleinsäure	100 mM
	NaCl	150 mM
	DEPC-Wasser	

▲ **Tabelle 3—11:** Allgemein verwendete Puffer und Lösungen

Fixationslösung:	Formaldehyd 37%	10%
	DPBS (pH 7,4)	
X-Gal-Lösung:	X-Gal	200mg/ml
	DMF	
Zitronensäurelösung:	Zitronensäure	100mM
	Aqua dest.	
Natriumphosphatlösung:	Dinatriumhydrogen- phosphat	200mM
	Aqua dest.	
Zitronensäure/ Phosphat-Puffer (pH 6,0):	Zitronensäurelösung	37%
	Natriumphosphatlösung	63%
Färbelösung:	X-Gal-Lösung	1mg/ml
	Zitronensäure/Phosphat- Puffer (pH 6,0)	40mM
	K ₃ [Fe(CN) ₆]	5mM
	K ₄ [Fe(CN) ₆]	5mM

	NaCl	150mM
	MgCl ₂	2mM
	Aqua dest.	

▲ **Tabelle 3–12:** Lösungen und Puffer für β -Galaktosidase Nachweis

1x TBE-Puffer:	10x TBE-Puffer	10%
	DEPC-Wasser	
10x Ladungspuffer für DNA:	Bromphenolblau	0,41%
	Saccharose	67%
	DEPC-Wasser	

▲ **Tabelle 3–13:** Puffer für Elektrophorese

TE Puffer	Tris-HCl	10 mM
	EDTA	1,0 mM
	DEPC-Wasser	

▲ **Tabelle 3–14:** Puffer für Photometrie

Elutionslösung (pH 8,0):	NaOH	1 μ M
	Aqua dest.	

▲ **Tabelle 3–15:** Lösung für DNA-Isolation

Denaturierungslösung:	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
	DEPC-Wasser	
Neutralisierungslösung (pH 7,5):	Tris-Base	1,0 M
	NaCl	1,5 M
	DEPC-Wasser	

▲ **Tabelle 3–16:** Lösungen für Southern Blot

Prähybridisierungslösung:	20x SSC	5x
	Blocking Powder	5%
	Formamid	50%
	N-Lauroylsarkosin	0,1%
	SDS 10%	0,02%
	DEPC-Wasser	

Hybridisierungslösung:	20x SSC	5x
	Blocking Powder	5%
	Formamid	50%
	N-Lauroylsarkosin	0,1%
	SDS 10%	0,02%
	Telomersonde	2,4 pmol/ml bzw. 31,8 ng/ml
	DEPC-Wasser	
Antikörperlösung	Anti-Digoxigenin-AP	1:10000
	Blockierungslösung	
Puffer 1: 2x SSC/0,1 SDS	20x SSC	10%
	SDS 10%	1%
	DEPC-Wasser	
Puffer 2: 2x SSC	20x SSC	10%
	DEPC-Wasser	
Puffer 3: Maleinsäurepuffer/0,1% Tween 20	Maleinsäurepuffer	
	Tween 20	0,1%
Puffer 4 (pH 9,5): Neutralisierungslösung	Tris-HCl	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
	DEPC-Wasser	
Puffer 5: Blockierungslösung	Blocking Powder	10%
	Maleinsäurepuffer	

▲ **Tabelle 3–17:** Lösungen und Puffer für Hybridisierung und Detektion

3.2 Biologisches Untersuchungsmaterial

Die für die Versuche verwendeten Chondrozyten wurden aus den Kniegelenken von Patienten des Universitätsklinikums Regensburg gewonnen, die sich aufgrund einer Gonarthrose der operativen Implantation einer Endoprothese in der Abteilung für Unfallchirurgie unterziehen mussten. Die Patienten stimmten der Verwendung der gewonnenen Chondrozyten im Rahmen dieses Experiments, das von einer Ethikkommission genehmigt wurde, zu. Insgesamt wurden die Zellen von sechs Patienten – darunter fünf Männer und einer Frau – im Alter von 31 bis 76 Jahren (MW \pm SD: 58,8 \pm 17,6 Jahre) untersucht.

3.3 Methoden

3.3.1 Zellbiologische Methoden

3.3.1.1 Gewinnung und Kultivierung humaner Chondrozyten

Das intraoperativ gewonnene Spendergewebe wurde steril in physiologische, 0,9%-ige NaCl-Lösung gegeben und bis zur Weiterverarbeitung, die innerhalb von sechs Stunden postoperativ erfolgte, bei 4°C gelagert. Unter sterilen Bedingungen wurde anschließend im Labor der Knorpel mit Skalpell vom Knochen gelöst und in kleine Stücke geschnitten (ca. 0,2-0,5 mm³), die mit 20 ml Andamedium (vgl. Tabelle 3—10) in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C für 17 h inkubiert wurden. Die Befestigung auf einem Taumler optimierte die Durchmischung und Verdauung. Nach steriler Filtration durch einen 40 µm Filter wurde die Mischung mit Chondrozytenmedium (vgl. Tabelle 3—10) auf 50 ml aufgefüllt und bei 2000 g für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in Chondrozytenmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.1.2) und anschließend in 75 cm² Zellkulturflaschen zu je 10⁶ Zellen ausgesät. Mit 15 ml Chondrozytenmedium pro Zellkulturflasche wurden die Knorpelzellen bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Im Verlauf erfolgte alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel.

Die Passage der Zellen erfolgte nach Erreichen einer 90%-igen Konfluenz. Nachdem das alte Medium verworfen wurde, folgte ein Waschschriff mit 5 ml DPBS zur Entfernung vorhandener Serumreste, bevor eine etwa fünfminütige Inkubation mit 0,05% Trypsin/0,02% EDTA bei Raumtemperatur die Zellen vom Flaschenboden ablöste. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Reaktion durch Zugabe von Chondrozytenmedium gestoppt und die Zellsuspension in 50 ml Falconröhrchen zentrifugiert (5 min bei 2000 g, 25°C). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets in Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und in neue Zellkulturflaschen zu je 200.000 Zellen aufgeteilt. Zur Bestimmung des Endpunkts der Zellkultivierung dienten die Seneszenz-assoziierten Charakteristika bestehend aus Zellwachstumsstopp (< 1 cpd pro 4 Wochen), Seneszenz-typischer Morphologie und einem mehr als 90%-igen Anteil SA-β-Galaktosidase positiver Zellen.

Das Chondrozytenmedium zur Behandlung der Knorpelzellen unter chronisch oxidativem Stresseinfluss enthielt zusätzlich 10 µM H₂O₂, um die *in vivo*

Bedingungen einer physisch aktiven Person zu simulieren.⁸⁴ Mediumwechsel, Passage- und sonstige Kultivierungsbedingungen entsprachen im Übrigen den Kontrollgruppen, die in Chondrozytenmedium ohne Zusatz kultiviert wurden.

Für die oxidativen Akutversuche wurde den Chondrozyten, die bis dahin ohne H₂O₂-Einfluss kultiviert wurden, in frühen und späten Passagen zunächst für zwei Stunden Medium mit einer subletalen H₂O₂-Konzentration von 75-100µM hinzugefügt (vgl. Kapitel 3.3.2). Da die Konzentration von Oxidantien im Vergleich zur Normalbevölkerung bei Arthrosepatienten höher, die antioxidative Kapazität dabei gleichzeitig geringer ist,⁸⁴ entsprach diese Konzentration etwa den *in vivo* Bedingungen von Arthrosepatienten. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen und in H₂O₂-freiem Chondrozytenmedium für unterschiedliche Zeiträume weiterkultiviert: Die Bestimmung der Genexpression erfolgte 1, 3, 6, 12 und 24 h nach der Stressbehandlung, die Analyse der Telomerlänge erfolgte nach einer Latenz von 24 h und 4 Wochen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Chondrozyten desselben Donors. Die unterschiedlichen Konzentrationen für die oxidativen Stressversuche wurden jeweils unmittelbar vor Gebrauch aus einer 30%-igen H₂O₂-Stammlösung frisch hergestellt.

3.3.1.2 Bestimmung von Zellzahl und Zellproliferation

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte im Rahmen der Zellpassage unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer. Hierfür wurde zu einer 10 µl umfassenden Probe der resuspendierten Zellpellets 10 µl Methylenblau hinzugefügt, das Gemisch in die Neubauer Zählkammer gegeben und die vier Quadranten ausgezählt. Die Zugabe von Methylenblau ermöglichte dabei die Differenzierung von toten und lebendigen Zellen.

Die Gesamtzellzahl N berechnete sich nach folgender Formel:

$$N = Z \cdot X \cdot V \cdot 10^4$$

Der Mittelwert aller vier Quadranten Z multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor X (*hier* = 2), der zum Resuspendieren verwendeten Mediummenge V in ml und dem Volumen (10^4) ergibt die Gesamtzellzahl N .

Als Parameter zur Bestimmung der Zellproliferation wurde auf die Zellpopulationsverdopplungen (cpd) zurückgegriffen, die sich aus folgender Formel ergeben:

$$cpd = \log_{10}\left(\frac{N_0}{N}\right) \cdot 3,33$$

Dabei bezeichnet N_0 die Zellzahl zu Beginn der Versuche und N die Zellzahl am Ende der Versuche.

3.3.2 Bestimmung der letalen H_2O_2 -Dosis

Um die Chondrozyten in den Akutversuchen nicht abzutöten, sondern die biologische Antwort der Zellen auf möglichst hohe H_2O_2 -Konzentrationen zu untersuchen, musste in Vorversuchen die letale H_2O_2 -Dosis ermittelt werden. Hierzu wurden Chondrozyten in 96-Well Platten ausgesät und mindestens 1 Woche lang bis zu einer etwa 90%-igen Konfluenz kultiviert. Nach einer zwei-stündigen Inkubation der Chondrozyten mit Medium, das unterschiedliche H_2O_2 -Konzentrationen (0, 10, 50, 100, 250, 500 μM) enthielt, wurde das H_2O_2 -haltige Medium nach einem Waschschrift mit DPBS durch unmodifiziertes Chondrozytenmedium ersetzt. Nach weiteren 24 h erfolgte die Auswertung mittels Live/Dead[®]-Kit gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

Das Medium wurde abgesaugt und nach einem Waschschrift durch 100 μl einer Färbelösung ersetzt, die aus DPBS, 4 μM Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) und 2 μM Calcein-Acetoxy-methylester (Calcein-AM) bestand. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Ergebnisse mit einem Fluoreszenzmikroskop dokumentiert.

Das enthaltene Calcein-AM penetriert die Zellmembran der untersuchten Chondrozyten und wird im Falle lebendiger Zellen durch unspezifische Esterasen intrazellulär hydrolysiert. Das entstehende kaum zytotoxische Calcein, das im Gegensatz zum Calcein-AM zellmembranimpermeabel ist, komplexiert intrazellulär Calciumionen und führt daraufhin zu einer grünen Fluoreszenz (ex/em ~ 495 nm/ ~ 515 nm). Lebendige Zellen erscheinen somit im Gegensatz zu toten Zellen – denen die aktiven Esterasen fehlen - unter dem Fluoreszenzmikroskop grün.

Die rote Fluoreszenz des EthD-1 (ex/em ~ 495 nm/ ~ 635 nm) erfährt durch die Bindung an Nukleinsäuren eine etwa 40-fache Verstärkung. Da der Eintritt von EthD-1 in die Zellen erst durch eine defekte Barriere in Form einer geschädigten Zellmembran weitestgehend ermöglicht wird, erscheinen lediglich geschädigte bzw. tote Zellen rot. Die praktisch nicht vorhandene Fluoreszenz der verwendeten Farbstoffe bei fehlender Interaktion mit Zellen begründet die geringe Hintergrundfluoreszenz und gute Anwendbarkeit.

Die Effekte einer niedrigeren ($10 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$), aber chronischen Anwendung von H_2O_2 auf die Viabilität von Chondrozyten wurde durch eine einwöchige Exposition analog untersucht.

3.3.3 Seneszenznachweis mittels X-Gal-Färbung

Die X-Gal-Färbung, deren positives Ergebnis auf der Hydrolyseaktivität der Seneszenz-assoziierten (SA) β -Galaktosidase bei einem pH-Wert von 6 beruht, diente als Marker für seneszente Zellen. X-Gal (Bromo-chloro-indolyl-galaktopyranosid) wird dabei intrazellulär durch die SA- β -Galaktosidase in Galaktose und die Indolkomponente 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol gespalten, die nach erfolgter Oxidation zum 5,5'-Dibromo-4,4'-dichloro-indigo den sichtbaren, nicht wasserlöslichen, blauen Indigofarbstoff der Färbung darstellt.

Die Chondrozyten wurden zur Seneszenzevaluation mittels X-Gal-Färbung in 6-Well-Platten ausgesät. Um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden, wurde die Auswertung nur an Zellen vorgenommen, die eine maximale Konfluenz von etwa 80% nicht überschritten. Nach Fixierung der Chondrozyten mit 3,7%-iger Formaldehydlösung für 5 min und zweimaligem Waschen mit DPBS wurden etwa 1,5 ml/Well der auf 37°C vorgewärmten Färbelösung (vgl. Tabelle 3–12) zugegeben. Die 6-Well-Platten wurden luftdicht mit Parafilm verschlossen und bei 37°C im Heizofen inkubiert. Nach wenigen Stunden konnte im positiven Fall bereits eine Blaufärbung festgestellt werden, die Auswertung und Dokumentation erfolgten stets nach 15 h.

3.3.4 Bestimmung der Telomerlänge (TRF-Assay)

3.3.4.1 DNA-Isolation

Nachdem die reverse Isolation von DNA mit Hilfe des Extraktionsreagenz DNA STAT-60TM (Tel-Test Inc., Friendswood, TX) keine zufriedenstellenden Ergebnisse in Bezug auf Qualität und Quantität erzielen konnte, wurde für Zwecke der DNA-Isolation das High Pure PCR Template Preparation Kit[®] (Roche, Mannheim) verwendet. Die Anwendung beider Methoden erfolgte dabei gemäß den jeweiligen Herstellerangaben.

Für die DNA-Isolation mittels des High Pure PCR Template Preparation Kits wurden etwa 1×10^6 Chondrozyten in 200 μl DPBS resuspendiert und mit 200 μl Binding Buffer sowie 40 μl Proteinase K für 10 Minuten bei 70°C im Heizblock inkubiert. Nach Zugabe von 100 μl Isopropanol und gründlichem Mischen

wurden die Proben auf die Isolierungssäulen aufgetragen und für 1 min bei 8000 g, 25°C zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl Inhibitor Removal Buffer auf die Filter aufgetragen, worauf sich eine weitere Zentrifugation anschloss (1 min bei 8000 g, 25°C). Zwei Waschschrirte mit jeweils 500 µl Washing Buffer und folgender Zentrifugation (jeweils 1 min bei 8000g, 25°C) dienten der Entfernung von Rückständen aus den Filtern, bevor die isolierte DNA mit 150 µl bzw. 100 µl der selbst hergestellten und auf 70°C vorgewärmten Elutionslösung zur Erhöhung des Ertrags in zwei Schritten gewonnen wurde (Zentrifugation jeweils 1 min bei 8000 g, 25°C). Das sich ergebende Probenvolumen von 250 µl wurde abschließend im Speed-Vac reduziert, um die für den Hinfl-Verdau benötigte hohe DNA-Konzentration zu erzielen. Die geöffneten Eppendorf Cups mit der isolierten DNA wurden hierzu für 2-3 Stunden bis zum Erreichen des Zielvolumens von etwa 50 µl in der Vakuumzentrifuge bei 1000 g, 10 mbar zentrifugiert.

3.3.4.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

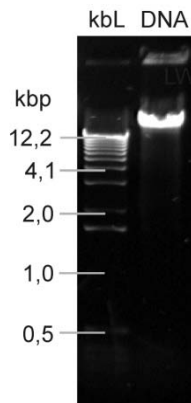
Die DNA-Konzentration wurde photometrisch nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmt. Um zuverlässige Ergebnisse unter Berücksichtigung der Eigenschaften der Absorptionsspektrometrie (valide Ergebnisse lediglich im Bereich von 0,1 bis 1,0 OD (optische Dichte) entsprechend einer Nukleinsäurekonzentration von 5-50 µg pro ml) zu erhalten, wurden die Proben mit TE-Puffer 1:35 verdünnt und die Absorption anschließend in einer Quarzküvette bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ (A_{260}) bestimmt. Als Referenzwert diente die Absorption des TE-Puffers. Die DNA-Konzentration der Probe ermittelte sich aus dem Mittelwert der durchgeführten Doppelbestimmung.

Als Indikator für die Reinheit der isolierten DNA wurde die A_{260}/A_{280} -Ratio verwendet. Im Idealfall liegt dieses Verhältnis bei reiner, nicht degradierter DNA zwischen 1,8 und 2,1. Vorhandene Phenolreste oder Proteine, die ihr Absorptionsmaximum bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ haben, können für Werte $< 1,6$ verantwortlich sein, Werte $> 2,1$ können Hinweis auf verbliebene RNA oder degradierte DNA sein.

3.3.4.3 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde im Rahmen des TRF-Assays einerseits dazu verwendet, die Integrität der isolierten DNA und die Vollständigkeit des Restriktionsverdau zu überprüfen, andererseits erfolgte hiermit auch die

erforderliche Auftrennung der Restriktionsfragmente für den Southern Blot. Hierzu kamen für alle Einsatzgebiete Gele mit 0,8% Agarose in 1 x TBE-Puffer zur Anwendung.



◀ **Abbildung 3—1: Integritätsüberprüfung der DNA.**
*Nicht degradierte DNA zeichnet sich durch eine singuläre Bande im Bereich über 12,2 kbp aus. **kbL**: 1-kb-DNA-Ladder; **kbp**: Kilobasenpaare.⁸⁶*

Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer gelöst, in einer Mikrowelle dreimal aufgekocht und mit 5 µl Ethidiumbromid/100 ml Agarosegel versetzt in eine Gelkammer mit Taschenkamm gegossen. Nach initialer Abkühlung des Gels bei Raumtemperatur wurde es zur besseren Vernetzung kurz in den Kühlschrank gegeben. Nach abschließender Füllung der Gelkammer mit 1 x TBE-Laufpuffer konnten die Geltaschen mit den Proben, die 20 Vol.-% Loading Buffer enthielten, beladen werden.

Als Größenstandard bei den Gelen für den Southern Blot diente eine 1-kb-DNA-Leiter. Die Elektrophoresebedingungen unterschieden sich je nach Anwendungsgebiet und gestalteten sich folgendermaßen:

- 100 V (6,67 V/cm) für 1,5-2 h bei analytischen Gelen (Überprüfung der DNA-Integrität und des Restriktionsverdaus)
- 60 V (4 V/cm) für 12 h bei Transferelektrophorese (Auftrennung der Restriktionsfragmente für den Southern Blot).

Die Begutachtung und Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht. Ethidiumbromid, das bevorzugt neben CG-Basenpaaren der DNA interkaliert, wird dabei zur Emission von Licht im sichtbaren Wellenspektrum ($\lambda = 500-590$ nm) angeregt und ermöglicht auf diese Weise die Detektion von Nucleinsäuren.

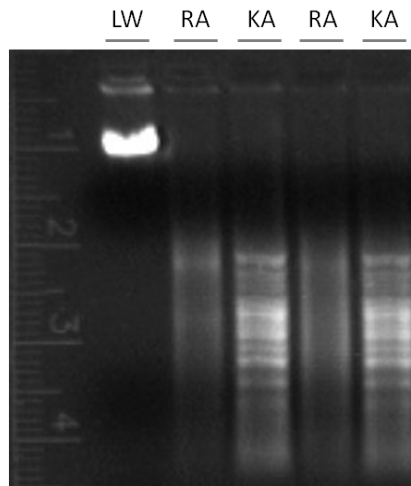
3.3.4.4 Restriktion

Der nächste Schritt des TRF-Assays bestand aus der Restriktion der isolierten, hochmolekularen genomischen DNA. Zu diesem Zweck wurde das

Restriktionsenzym *HinfI* verwendet, eine Endonuklease aus *Haemophilus influenzae* Rf mit der Erkennungssequenz 5'...G[▼]ANTC...3'. Das ubiquitäre Vorkommen dieser Sequenz in der genomischen DNA mit Ausnahme der Telomerregion liefert nach dem enzymatischen Verdau multiple kurze DNA-Fragmente, die elektrophoretisch von den längeren, ungeschnittenen Telomerenden (4-15 kbp) getrennt werden können.

Die Restriktionsansätze enthielten jeweils 10 µg DNA, 10 Vol.-% 10 x NEBuffer 4, 2 µl *HinfI* entsprechend 2 U *HinfI*/µg DNA und wurden mit DEPC-Wasser zu einem Endvolumen von 50 µl (entspricht einer DNA-Konzentration von $0,2 \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$) ergänzt. Zur Kontrolle einer ausreichenden Enzymaktivität des *HinfI* dienten Kontrollansätze bestehend aus einem 2,5 µl umfassenden Aliquot des zu kontrollierenden Restriktionsansatzes, 2 µl λ-DNA (entspricht 500 ng λ-DNA) und 12,5 µl 1 x NEBuffer 4. Die enthaltene Enzymmenge in dem 2,5 µl großen Aliquot aus dem Restriktionsansatz musste in den Kontrollansätzen zu einer vollständigen Verdauung der 500 ng λ-DNA ausreichen. Anschließend wurden die Restriktions- und Kontrollansätze zusammen mit einem Leerwert, der 2 µl λ-DNA und 10 µl 1x NEBuffer 2 enthielt, für 12 h bei 37°C im Wärmeblock inkubiert.

Eine abschließende Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.3.4.3) diente der Visualisierung des Restriktionsergebnisses, bevor die Proben in den Transferzellen für den Southern Blot verwendet wurden. Nach 1,5-2 h zeigte sich bei gelungener Restriktion für die Restriktionsansätze ein Schmier im Größenbereich < 4kbp, für den Leerwert eine hochmolekulare Bande, die ungeschnittene λ-DNA repräsentiert, und für die Kontrollansätze das typische Schnittmuster von mit *HinfI* verdauter λ-DNA (vgl. Abbildung 3—2).

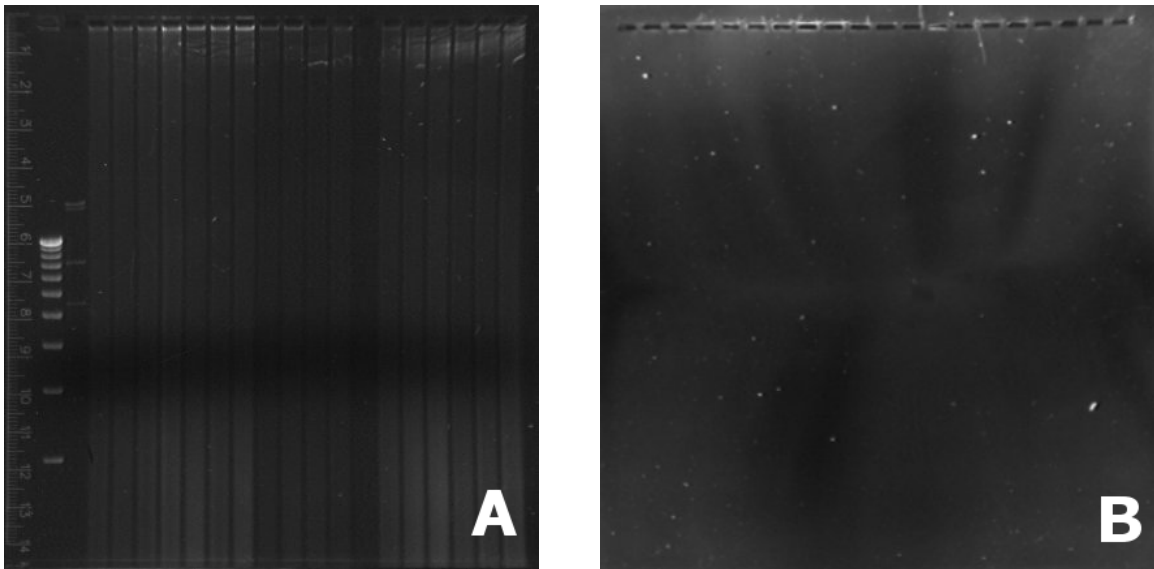


◀ **Abbildung 3—2: Kontrollgel der DNA-Restriktion mit HinfI (LN 469).** Man erkennt die unverdaute λ -DNA im Leerwert (LW), den Schmier in den Restriktionsansätzen (RA) und das typische Schnittmuster der mit HinfI verdauten λ -DNA in den Kontrollansätzen (KA). Das abgebildete Lineal repräsentiert die Laufstrecke in cm.

3.3.4.5 Southern Blot

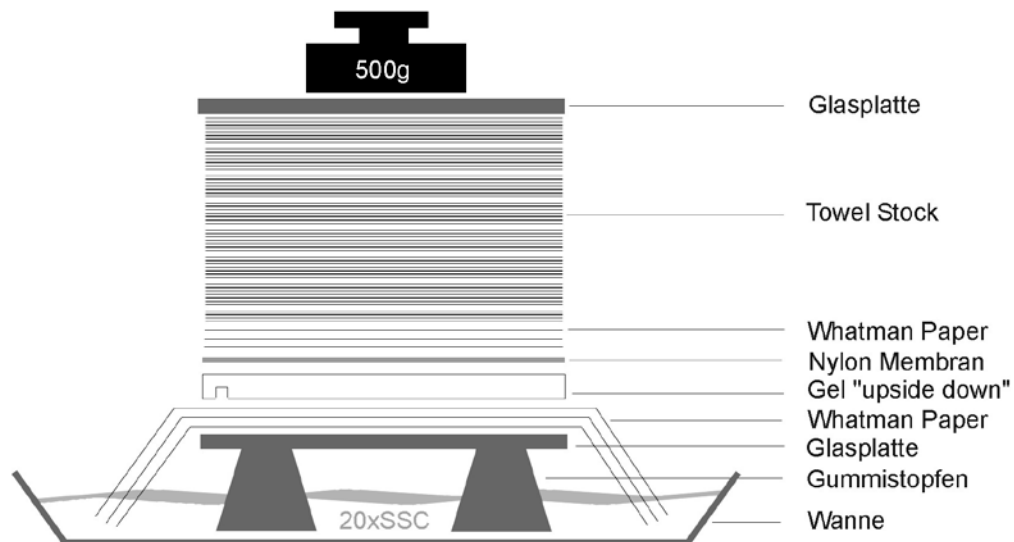
1975 publizierte *Edwin Southern* ein Verfahren,¹⁰³ das den Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten auf eine flexible Membran ermöglicht, die anschließend einer Fixation und Detektion der DNA-Fragmente zugeführt werden kann. Der Southern Blot wurde in der Folge stetig weiterentwickelt¹⁰⁴ und bei dieser Arbeit im Rahmen des TRF-Assays angewendet.

Für die Transfergele wurden stets 4 μg DNA pro Lane aus den kontrollierten Restriktionsansätzen verwendet. Bei einer DNA-Konzentration von 0,2 $\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}$ wurden dementsprechend 20 μl der Probe mit 5 μl Ladungspuffer in Doppelsätzen auf das Gel aufgetragen. Zusätzlich befanden sich für die spätere Auswertung auf jedem Gel zwei Längenstandards: eine kb-Leiter bestehend aus 1 μl der 1 kb DNA-Ladder, 6,5 μl DEPC-Wasser und 2,5 μl Ladepuffer sowie ein DIG-markierter Längenstandard bestehend aus 5 μl DIG Molecular Weight Marker II, 2,5 μl DEPC-Wasser sowie 2,5 μl Ladungspuffer. Nach einer Laufzeit der Elektrophorese von 12 h bei 60 V wurde die Laufstrecke der 1 kb DNA-Ladder und der Proben auf dem Gel kontrolliert.



▲ **Abbildung 3–3: Transferringel für den Southern Blot.** **A:** Transferringel (LN 469) nach 12 h Elektrophorese mit sichtbaren Längenstandards (Lane 1+2) und dem Schmier der Restriktionsansätze. **B:** Transferringel nach dem Southern Blot ohne Nachweis verbliebener DNA.

Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung der DNA-Fragmente wurde das Gel zur Depurinisierung – um die Transfereffizienz langer DNA-Fragmente (>10 kbp) zu verbessern – für 10 min in 250 mM HCl-Lösung gegeben. Nach einem kurzen Waschschrift in destilliertem Wasser folgte eine 30-minütige Inkubation in Denaturalisierungslösung (vgl. Tabelle 3–16), um die für die Hybridisierung notwendigen DNA-Einzelstränge zu erhalten. Einem weiteren kurzen Waschschrift mit destilliertem Wasser schloss sich eine Behandlung des Gels in Neutralisierungslösung (vgl. Tabelle 3–16) für 30 min an, bevor das Gel schließlich für 10 min in 20 x SSC äquilibriert werden konnte.



▲ **Abbildung 3—4:** Aufbau des Southern Blots.⁸⁶

Das vorbehandelte Gel wurde nun zum Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran in der Turmbaummethode (vgl. Abbildung 3—4) verwendet. Über 3 Whatman 3MM Paper, deren freie Enden in eine Wanne mit 20 x SSC reichten und dadurch den Kapillartransfer ermöglichten, wurde das Gel „upside down“ gelegt. Darauf folgten die auf die Größe des Gels zugeschnittene Nylonmembran und 3 weitere Lagen an Whatman 3MM Paper. Dabei wurde vor allem darauf geachtet, dass sich zwischen den Schichten keine Luftblasen befanden, die den DNA-Transfer beeinträchtigen könnten. Abschließend schloss sich ein etwa 15 cm hoher Towel Stock mit aufliegender Glasplatte an, die zusätzlich noch mit etwa 500 g beschwert wurde.

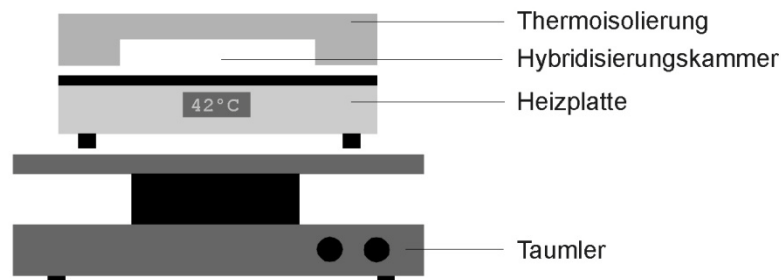
Der Southern Blot wurde nach 12 h beendet und zur Kontrolle der Transfer-effizienz die Ethidiumbromid-enthaltenden Gele ein weiteres Mal unter UV-Licht begutachtet. Dabei konnte nach vollständigem Transfer der DNA kein Signal mehr in dem Gel detektiert werden (vgl. Abbildung 3—3:B).

Nun wurde die Nylonmembran für 10 min in 2 x SSC gewaschen und zur Fixierung der Restriktionsfragmente zwischen zwei Lagen Whatman 3MM Paper noch im feuchten Zustand für 30 min bei 120°C im Heizofen gebacken.

3.3.4.6 Hybridisierung

Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschschriffe wurden unter Zuhilfenahme einer Eigenkonstruktion bestehend aus Taumler, Heizplatte und entsprechender Thermoisolierung aus Pappe und Styropor durchgeführt (vgl.

Abbildung 3—5). Die Nylonmembranen wurden zusammen mit der benötigten Lösung in Folie eingeschweißt und in der Hybridisierungskammer platziert, wodurch eine Hybridisierung unter dauerhafter Bewegung und konstanter Temperatur möglich war.



▲ **Abbildung 3—5:** Aufbau der Hybridisierungsvorrichtung.⁸⁶

Die Prähybridisierung zum Äquilibrieren der Nylonmembran und die Hybridisierung erfolgten mit jeweils 10 ml Prähybridisierungs- bzw. Hybridisierungslösung (vgl. Tabelle 3—17), wobei im Gegensatz zur Prähybridisierungslösung die Hybridisierungslösung zusätzlich 2,4 pmol/ml frisch denaturierte Telomer-Sonde enthielt. Ein die benötigte Menge an Digoxigenin-gelabelter Telomer-Sonde umfassendes Aliquot wurde vor der Verwendung in der Hybridisierungslösung mit DEPC-Wasser zu 50 µl ergänzt, zur Denaturierung für 5 min bei 55°C im Wärmeblock inkubiert und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Nach der 30-minütigen Prähybridisierung bei 42°C folgte die Hybridisierung für mindestens 15-16 h bei 42°C unter ständiger Bewegung.

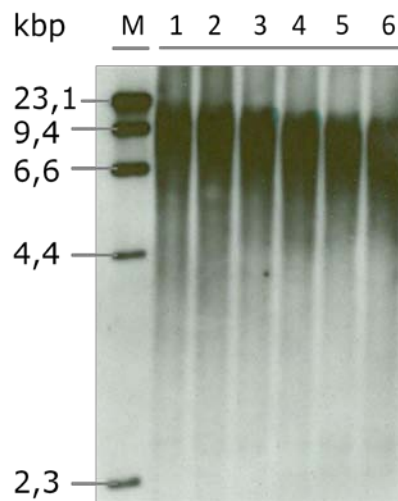
Im Anschluss wurden die Nylonmembranen zweimal jeweils 15 min bei 42°C mit 2x SSC/0,1% SDS gewaschen, um mögliche Fehlpaarungen der Sonde zu lösen. Abschließend folgten zwei je 5-minütige Waschschriffe in 2x SSC und Maleinsäurepuffer/0,1% Tween jeweils bei Raumtemperatur.

3.3.4.7 Detektion der Telomer-Restriktionsfragmente

Die Nylonmembranen wurden zunächst für 30 min bei Raumtemperatur in einer 10%-igen Blockierungslösung (vgl. Tabelle 3—17) unter Bewegung inkubiert. Dadurch werden unbesetzte Bindungsstellen für die Anti-DIG-Antikörper maskiert und eine Erhöhung der Signal-to-noise ratio erreicht. Nach 30 Minuten wurde die Blockierungslösung durch 10 ml der Antikörperlösung (vgl. Tabelle 3—17) ersetzt und die in Folie eingeschweißte Membran für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Taumler inkubiert. Um ein

günstiges Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund zu bewahren, erfolgte auch die 1:10000 Verdünnung der Antikörper in der 10%-igen Blockierlösung. Zwei sich anschließende jeweils 15-minütige Waschschriffe mit Maleinsäurepuffer/0,1% Tween dienten der Entfernung überschüssigen Antikörperkonjugats.

Danach wurden die Membranen 2 min in einem alkalischen Reaktionspuffer (Puffer 4, pH 9,5) äquilibriert, um der an die Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase optimale Reaktionsbedingungen zu gewährleisten. Mit einem handelsüblichen Sprühkopf wurden nun 10 Hübe entsprechend etwa 1 ml CDP-Star®-Lösung gleichmäßig auf jeder Nylonmembran verteilt. Die Membranen mit dem Chemilumineszenzsubstrat wurden einzeln in Folie eingeschweißt und für 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie in neue Folien überführt, um überschüssiges Substrat zu entfernen. Die Filmexposition erfolgte bei Raumtemperatur in Filmkassetten, wobei die Expositionszeiten zwischen 15 s und 4 min lagen.

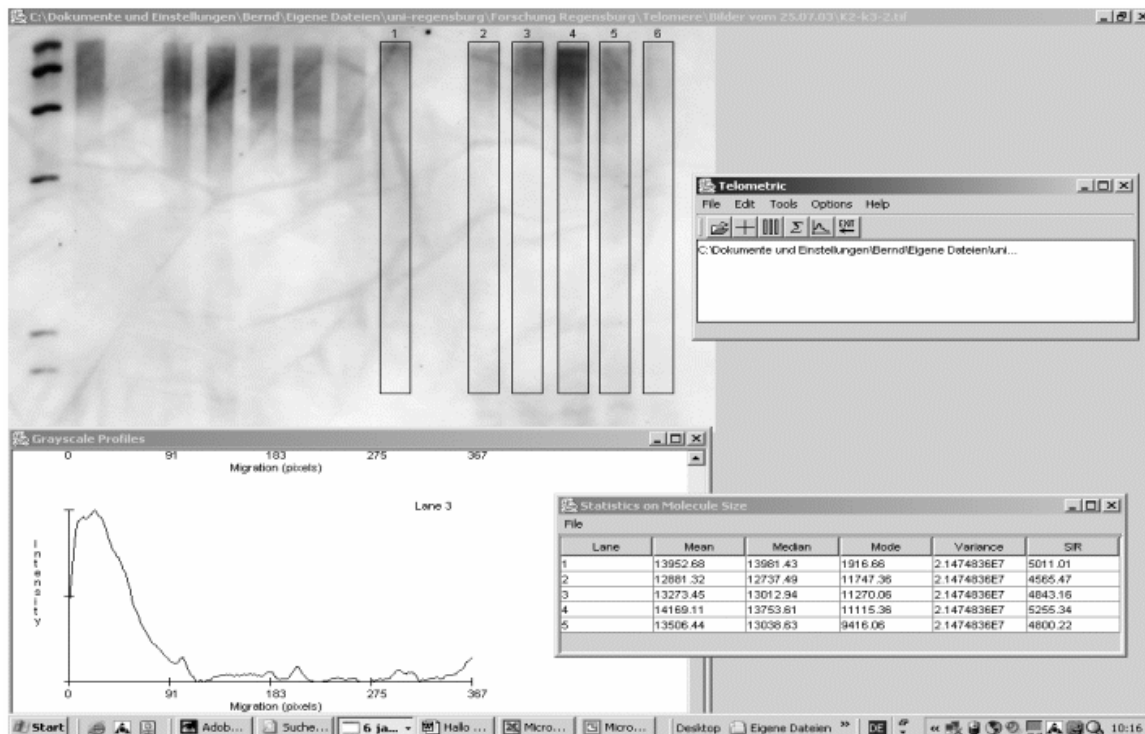


▲ **Abbildung 3—6:** Gescannte Filmaufnahme eines Southern Blots mit Telomer-Restriktionsfragmenten von 6 Zellpassagen unter chronisch oxidativem Stress (LN 579). **kbp:** Kilobasenpaare; **M:** DIG-gelabelter Längenmarker.

3.3.4.8 Auswertung und Berechnung der mittleren Restriktionsfragmentlängen

Die Filme wurden eingescannt und mittels der Software Telometric 1.2 (Fox Chase Cancer Center) densitometrisch ausgewertet. Die mittlere Telomerlänge wurde dabei aus einer Doppelbestimmung ermittelt.

Aufgrund besser reproduzierbarer Ergebnisse wurde zur Ermittlung der mittleren Telomerlänge auf eine Methode zurückgegriffen, die auf dem Integral der densitometrischen Kurve beruht.¹⁰⁵ Zusätzlich wurden die Messwerte gewichtet, um eine quantitative Überbewertung langer Restriktionsfragmente aufgrund multipler Sondenbindungen, die zu einem verstärkten Signal führen, auszugleichen. Um eventuelle Inhomogenitäten der Gele untereinander oder des Gellaufs zu kompensieren, wurde auf jedem Gel ein mit Digoxigenin-gelabelter Längenstandard (DIG-Molecular Weight Marker II) mitgeführt. Desweiteren wurde für jeden Blot ein spezifisches Hintergrundsignal bestimmt, das von den auszuwertenden Lanes abgezogen wurde. Diese Maßnahmen trugen wie die Tatsache, dass alle Blots auf einmal von der gleichen Person über die gesamte Länge und Spurbreite der Signale ausgewertet wurden, zur Standardisierung des Auswerteverfahrens bei.¹⁰⁶



▲ **Abbildung 3—7:** Beispiel der Auswertung eines Southern Blots mit Hilfe des Programms Telometric 1.2 (Fox Chace Cancer Center).¹⁰⁶

links oben: Blot mit Marker und den die in die Auswertung eingehenden Flächen markierenden Säulen in der rechten Bildhälfte.

links unten: Gegen die Laufstrecke aufgetragene optische Dichte des Signals der Lane 3. Das gewichtete Integral dieser Funktion über der gesamten Laufstrecke ergibt die mittlere Telomerlänge der Probe.

rechts unten: Berechnete Mittelwerte, Mediane, Varianz und Standardabweichung der TRF-Längen in den markierten Lanes.

3.3.5 Analyse der Genexpression

3.3.5.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte nach der RNAzol-Methode. Um eine Veränderung der Genexpression in den Chondrozyten durch zusätzlichen Stress in Form des Abtrypsinierens zu vermeiden, erfolgte die RNA-Isolation dabei direkt aus den Zellkulturflaschen.

Nachdem die Zellkulturflaschen durch zweimaliges Spülen mit DPBS gereinigt wurden, erfolgte die direkte Zugabe von 2 ml RNAzol in die 75 cm² Zellkulturflaschen und das Zell-RNAzol Gemisch wurde mit Zellschabern und durch mehrmaliges Aufziehen in einer 2-ml-Pipette homogenisiert. Das Homogenisat wurde auf zwei Eppendorf-Cups verteilt (A- und B-Probe, jeweils 1 ml), mit 100 µl (0,1 VT) Chloroform versetzt und für 15 s per Hand geschüttelt. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation (12000 g, 4°C) wurden etwa 500 µl der die RNA enthaltenden, obenliegenden, wässrigen Phase in ein neues Cup überführt und die untenliegende blaue Phenol-Chloroform-Phase, die Proteine und DNA enthält, verworfen. Nach Zugabe von etwa 500 µl (1 VT) Isopropanol und folgender Durchmischung wurden die Proben zur Fällung für 45 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 12000 g, 4°C) wurde der Überstand entfernt und die entstandenen RNA-Pellets in 800 µl 75%-igem Ethanol unter wiederholtem Vortexen gereinigt. Die Cups wurden zentrifugiert (8 min, 7500 g, 4°C), der Ethanolüberstand verworfen, die RNA für maximal 90 min luftgetrocknet und schließlich in 15 µl DEPC-Wasser gelöst.

3.3.5.2 DNase-Verdau

Die RNA-Proben wurden vor der cDNA-Synthese einem DNase-Verdau mit dem DNA-free™ Kit unterzogen. Das Vorgehen erfolgte dabei gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

Die RNA-Proben wurden für den Verdau zusammen mit 2 µl 10x DNase I Buffer und 2 µl rDNase I bei 37°C in den Heizblock gegeben. Nach 30 min wurden zur Inaktivierung der DNase 5 µl frisch resuspendiertes DNase Inactivation Reagent hinzugefügt und unter mehrmaligem Vortexen für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend folgte eine Zentrifugation bei 10000 g für 2 min, nach der der Überstand, der die DNA-freie RNA enthält, in ein neues Cup überführt wurde.

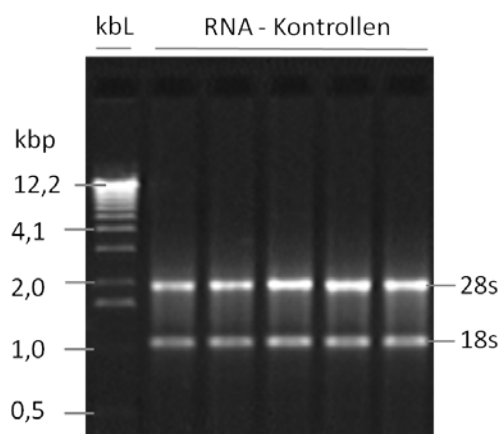
3.3.5.3 Messung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch analog dem Vorgehen zur Messung der DNA-Konzentration (vgl. Kapitel 3.3.4.2). Auch hier diente die A_{260}/A_{280} -Ratio als Indikator für die Integrität der RNA, wobei die Ratio für unkontaminierte, intakte RNA etwa 0,2 über dem Level liegt, das für unkontaminierte, intakte DNA gilt.

3.3.5.4 Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an die photometrische Konzentrationsbestimmung wurde eine Gelelektrophorese zur weiteren Verifizierung der Integrität und Reinheit der RNA durchgeführt. Auch hier kam ein 0,8%-iges Agarosegel in 1 x TBE-Puffer zur Anwendung (vgl. auch für Herstellung Kapitel 3.3.4.3), wobei für die RNA-Gelelektrophorese bei der Herstellung auf RNase-freies DEPC-Wasser zurückgegriffen wurde.

2 μ l Probenvolumen wurde mit DEPC-Wasser auf 8 μ l ergänzt, für 10 min bei 65°C inkubiert und sofort auf Eis gekühlt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Nach Zugabe von 2 μ l RNA-Loading Buffer wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese für 1,5 – 2 h mit 100 V (6,67 V/cm) durchgeführt. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht begutachtet und fotografisch dokumentiert.



◀ **Abbildung 3—8: RNA-Kontrollgel.**

Man erkennt die typische 28s- und 18s-Bande als Zeichen nicht degradierter RNA. **kbL**: 1-kb-DNA-Ladder; **kbp**: Kilobasenpaare.

3.3.5.5 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das Enzym SuperScript™ II RNase H⁻ verwendet. Diese aus *Escherichia coli* isolierte reverse Transkriptase, die das *pol* Gen des *Moloney Murine Leukemia Virus* enthält, synthetisiert cDNA-Einzelstränge mit einer Länge von bis zu 12,3 kbp.^{107, 108}

Die cDNA-Synthese erfolgte im Doppelansatz mit jeweils 2 µg RNA, die am Ende der Prozedur in einem Cup gepoolt wurden. Die verwendeten Oligo(dT) Primer, die Nukleotide ATP, TTP, GTP und CTP (dNTPs) sowie das DEPC-Wasser wurden zur Vermeidung von Kontaminationen stets in Portionen zu 10 µl aliquotiert.

Für die Synthese wurde ein Aliquot, das 2 µg RNA enthielt, mit 1 µl Oligo(dt), 1 µl dNTPs und DEPC-Wasser auf 12 µl ergänzt, für 5 min bei 65°C im Heizblock inkubiert und daraufhin auf Eis gekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden jedem Ansatz auf Eis 4 µl 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) und 2 µl 0,1 M DTT hinzugefügt. Nach einer 2-minütigen Erwärmung der Proben auf 42°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl reverse Transkriptase (SuperScript™ II RNase H-Reverse Transkriptase) gestartet und für 1 Stunde bei 42°C fortgeführt. Anschließend wurde durch 15-minütiges Erhitzen der Proben auf 70°C die Synthese gestoppt, die Doppelansätze gepoolt und die cDNA-Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. Kapitel 3.3.4.2).

3.3.5.6 PCR

Die PCR wurde im Light-Cycler® gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Dabei kamen für die untersuchten Gene folgende Primer zum Einsatz:

- **TRF1:** (5'- AAT GAA GGC AGC GGC AAA AG -3' und 5'- AGT TAC CGC AGA CTG TTT GTC -3'),
- **TRF2:** (5'- AGG CAG CTA CGG AAT CCT C -3' und 5'- GGG CTG AAC TTT CGT TTT CAT CT -3'),
- **p21:** (5'- CCT GTC ACT GTC TTG TAC CCT -3' und 5'- GCG TTT GGA GTG GTA GAA ATC T -3'),
- **XRCC5:** (5'- GAC GTG GGC TTT ACC ATG AGT -3' und 5'- TCA GTG CCA TCT GTA CCA AAC -3'),
- **SIRT1:** (5'- CGC TGG CCG ACA ACT TGT A -3' und 5'- CAT GTG AGG CTC TAT CCT CCT -3') und
- **GAPDH:** (5'- GAA GGT GAA GGT CGG AGT C -3' und 5'- GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC -3')

Ein 20 µl Ansatz bestand aus 2 µl Probe, die 0,5 µg cDNA enthielt, und 18 µl Master-Mix. Die unterschiedliche Zusammensetzung des Master-Mix richtete sich dabei nach der optimalen MgCl₂-Konzentration der einzelnen Primer und kann Tabelle 3—18 entnommen werden.

	TRF1	TRF2	P21	XRCC5	SIRT1	GAPDH
Primer	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl	0,4 µl
FastStart	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
MgCl ₂	2,4 µl (4mM)	1,6 µl (3mM)	1,6 µl (3mM)	1,6 µl (3mM)	0,8 µl (2mM)	1,6 µl (3mM)
H ₂ O	13,2 µl	14 µl	14 µl	14 µl	14,8 µl	14 µl

▲ **Table 3–18:** Zusammensetzung Master-Mix.

Die Negativkontrolle enthielt statt der cDNA-Probe 2 µl Wasser. Nach Zugabe des Fast Starts wurden die Ansätze in einer Dunkelbox weiterbearbeitet und schließlich als Dreifachbestimmung zusammen mit Standardansätzen im Light-Cycler[®] analysiert. Die Auswertung erfolgte nach der Pfaffl-Methode.¹⁰⁹

3.3.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS[®] 17.0 verwendet.

Dabei wurden mit der Methode der linearen Regression und der Korrelationsanalyse nach Pearson die Zusammenhänge zwischen zwei Messgrößen untersucht. Um statistisch signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen festzustellen, wurde der t-Test angewendet. Die Kontrolle der Normalverteilungsannahme erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test.

Ein $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Optimierung des TRF-Assays

Der TRF-Assay wurde bereits im Tissue Engineering Labor der Unfallchirurgie Regensburg eingeführt.¹⁰⁶ Aufgrund des zentralen Stellenwerts dieser Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nach Wegen gesucht, das Verfahren in Bezug auf Kosten- und Zeiteffizienz zu optimieren.

4.1.1 DNA-Isolation

Beschränkte Raum-, Zeit- und Finanzierungskapazitäten machen eine möglichst effiziente Verwertung der kultivierten Zellen erforderlich. Die Gewinnung der benötigten Menge DNA für den Southern Blot stellt dabei ein zentrales Problem dar, steht doch der hohe Gesamtbedarf von mindestens 10 µg DNA pro Probe im Gegensatz zu einer schlanken Zellkultur mit möglichst geringem Zelleinsatz. Um diesen Gegensatz möglichst effizient aufzulösen, wurden mit der DNA-STAT 60TM-Methode der Firma Tel-test Inc. und dem High Pure PCR Template Preparation Kit[®] von Roche neben der Phenol-Chloroform Standardmethode¹⁰⁶ zwei weitere Methoden zur DNA-Isolation getestet.

Das Potential der DNA-STAT 60TM Methode, die in Analogie zur RNAzol[®]-Methode zur RNA-Isolation aus einer chaotropischen Komponente zur Zellyse und einer phenolfreien Extraktionskomponente besteht, ist vor allem durch die Möglichkeit der reversen DNA-Extraktion gegeben. Hiermit soll es möglich sein, aus der organischen Phase, die sich im Rahmen der RNA-Isolation bildet (vgl. Kapitel 3.3.5.1) und die sonst verworfen wird, DNA zu isolieren. Daraus ergäbe sich ein erhebliches Einsparungspotential in Bezug auf benötigte Zellzahlen. Trotz dieser theoretischen Vorteile musste die Methode aufgrund der äußerst geringen Ausbeute und Qualität der isolierten DNA im praktischen Einsatz aufgegeben werden. Auch die getestete direkte Isolation der DNA aus Chondrozyten mittels DNA-Stat 60TM war sowohl in Bezug auf Menge als auch Qualität nicht befriedigend.

Die weiterhin getestete Säulchenmethode High Pure PCR Template Preparation Kit[®] von Roche stellte sich hingegen in Sachen Ausbeute, Qualität und Zeitaufwand als überlegen heraus. Die optimal einzusetzende Zellzahl wurde dabei mit etwa 750.000 Chondrozyten pro Säulchen ermittelt und führte zu einem DNA-Ertrag von etwa 10-15 µg. Die Integrität der DNA wurde in der

Gelektrophorese kontrolliert und neben der photometrischen Konzentrationsbestimmung im BioPhotometer von Eppendorf zusätzlich stichprobenartig mittels Picodrop 100, Biozym verifiziert.

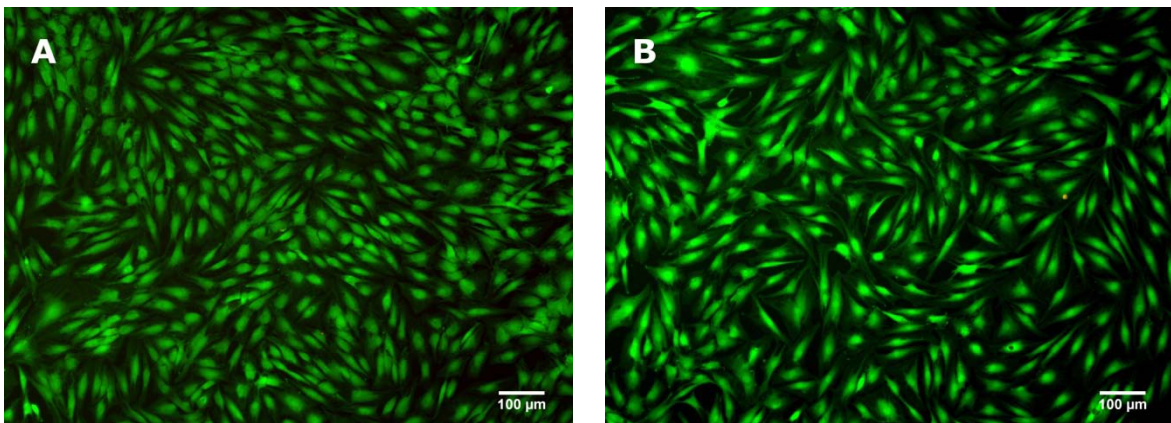
4.1.2 Hybridisierung und Detektion

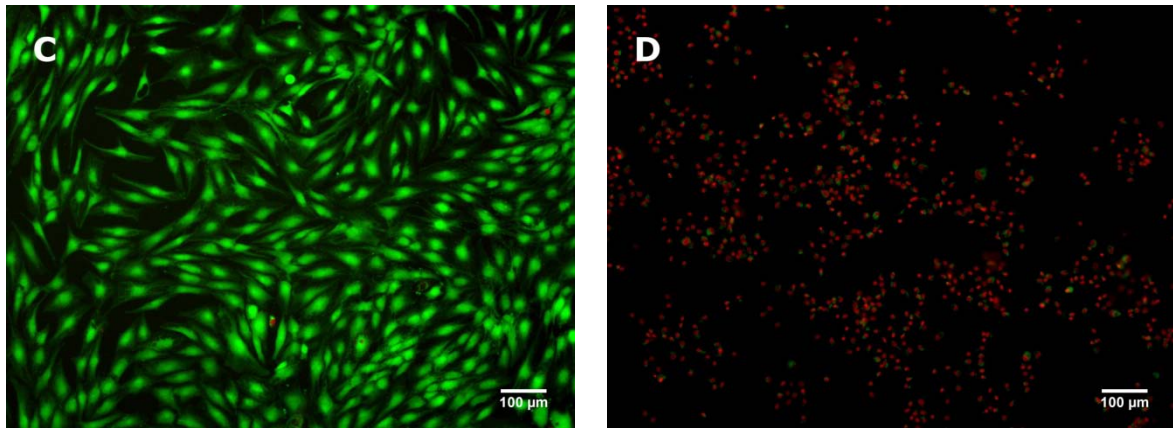
Um die für Hybridisierung notwendige Temperatur und durchgehende Bewegung der Nylonmembranen zu gewährleisten, wurde der zuvor verwendete Hybridisierungssofen durch eine Eigenkonstruktion aus Taumler, Heizplatte und Thermoisolation (vgl. Abbildung 3–5) ersetzt. Dadurch wurden zum einen logistische Probleme bezüglich der Verfügbarkeit umgangen, zum anderen konnte durch das erforderliche Einschweißen der Membranen die einzusetzende Menge an Reaktionslösungen deutlich gesenkt werden, ohne dabei Qualitätseinbußen in Kauf zu nehmen.

Auch die Methode zum Aufbringen des Chemilumineszenzsubstrat zur Detektion der Telomere konnte optimiert werden: Durch den Einsatz eines Sprühkopfes konnte im Vergleich zum etablierten Einsatz einer Pipette ein homogeneres Chemilumineszenzsignal über die gesamte Membran erzielt werden. Dies garantierte in der Folge eine weitaus einfachere und sichere Auswertung der TRF-Assays.

4.2 Bestimmung der letalen H_2O_2 -Dosis

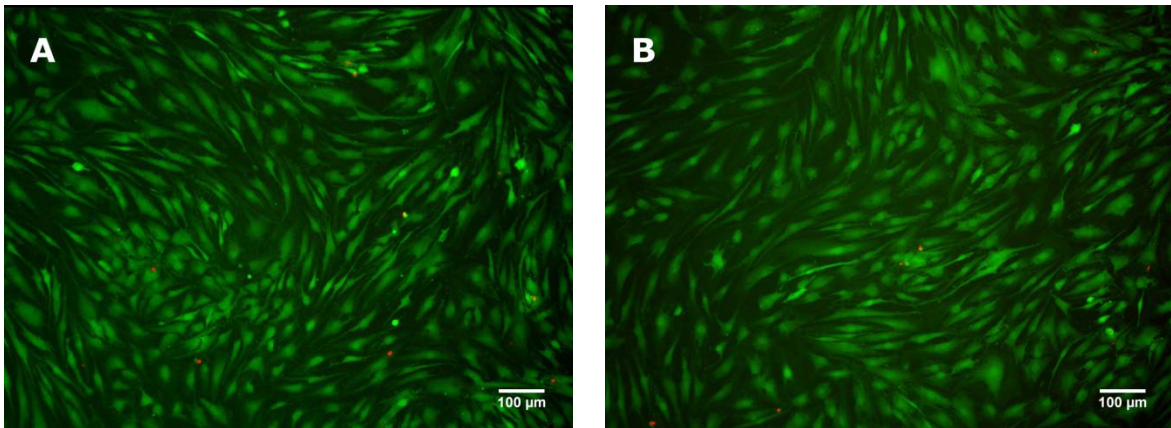
In Vorversuchen wurde approximativ die letale H_2O_2 -Dosis für Chondrozyten bestimmt. Die Chondrozyten wurden hierfür für 2 Stunden verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen (0, 50, 100, 250, 500 μM , 1000 μM) ausgesetzt und nach 24 Stunden mittels Live/Dead Kit evaluiert. Lebendige, intakte Chondrozyten zeigen hierbei eine grüne Fluoreszenz, rote Fluoreszenz hingegen dient als Marker für tote bzw. geschädigte Zellen.





▲ **Abbildung 4—1:** Zellviabilität von Chondrozyten nach 2 stündiger Inkubation mit ansteigenden H_2O_2 -Konzentrationen (LN 469); Fluoreszenzmikroskopie. **A:** Kontrolle. **B:** $50 \mu M H_2O_2$. **C:** $100 \mu M H_2O_2$. **D:** $250 \mu M H_2O_2$. Maßstabsbalken entspricht $100\mu m$.

Das Verhältnis von toten zu lebendigen Zellen unterschied sich bis zu einer H_2O_2 -Konzentration von $100 \mu M$ im Allgemeinen nicht von der Kontrolle, wobei sich interindividuelle Unterschiede bei Chondrozyten verschiedener Spender zeigten. Während eine Konzentration von $50 \mu M$ keine letalen Folgen für die getesteten Chondrozyten hatte, zeigte sich in Einzelfällen bereits bei einer $100 \mu M H_2O_2$ -Konzentration eine deutliche Zunahme geschädigter bzw. toter Zellen. Bei einer H_2O_2 -Konzentration von $250 \mu M$ und darüber hinaus ($500 \mu M$ und $1000\mu M$, Bilder nicht aufgeführt), musste ein weitestgehend ausnahmsloser Zelluntergang über alle Primärzellkulturen konstatiert werden. Folglich wurden für die Akutversuche entsprechend der getesteten interindividuellen Unterschiede subletale H_2O_2 -Konzentrationen von 75 bzw. $100 \mu M$ verwendet. Der Einfluss einer niedrig dosierten, aber länger andauernden oxidativen Stressexposition auf die Zellviabilität wurde ebenfalls mittels Live/Dead[®]-Kit untersucht. Die Zellen wurden hierfür 1 Woche mit einem Zellmedium kultiviert, das eine $10\mu M H_2O_2$ -Konzentration aufwies, wobei nach 3 Tagen ein einmaliger Mediumwechsel stattfand. Nach 7 Tagen erfolgte die Evaluation, bei der sich über alle getesteten Chondrozyten kein Unterschied bezüglich der Zellviabilität zwischen Kontroll- und oxidativen Stressbedingungen feststellen lassen konnte.

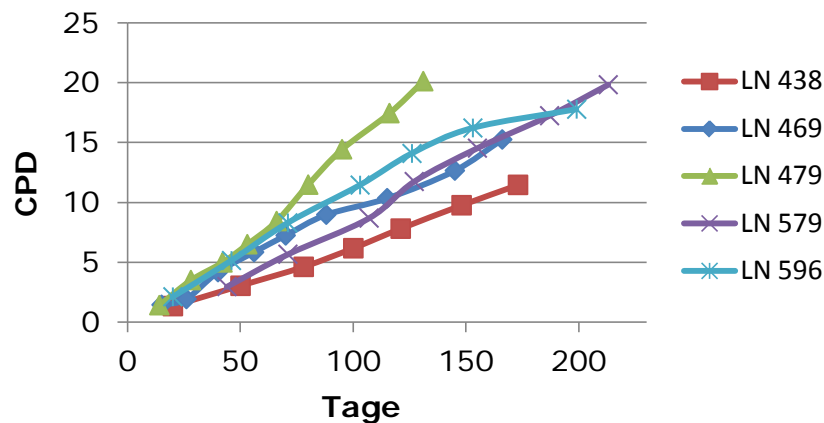


▲ **Abbildung 4—2:** Zellviabilität von Chondrozyten nach chronisch oxidativer Stressexposition; Fluoreszenzmikroskopie. **A:** Kontrolle. **B:** 10 µM H₂O₂. Maßstabsbalken entspricht 100µm.

4.3 Analyse der Zellproliferation

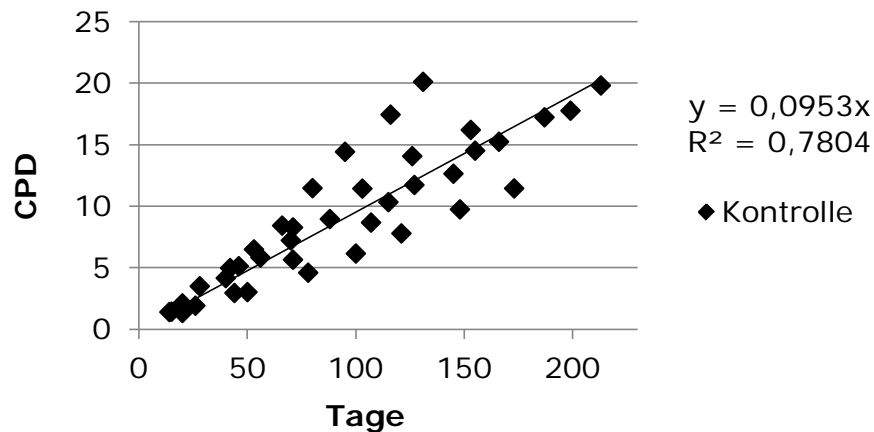
4.3.1 Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter Kontrollbedingungen

Das Proliferationsverhalten der Chondrozyten über eine prolongierte Kultivierungsdauer wurde anhand von 5 Primärzellkulturen untersucht. Der maximale Betrachtungszeitraum betrug hierbei knapp 220 Tage, in denen die Zellen 8-10-mal passagiert wurden. Zur Visualisierung der Ergebnisse wurden die Zellverdopplungen (cell population doubling, cpd) gegen die Kultivierungsdauer in Tagen aufgetragen.



▲ **Abbildung 4—3:** Individuelles Proliferationsverhalten der 5 untersuchten Chondrozytenkulturen unter Kontrollbedingungen. **CPD:** Zellverdopplungen.

Die Chondrozytenkulturen zeigten ein deutlich interindividuell abweichendes Proliferationsverhalten. Während LN 479 mit 15,35 cpd/100 Tage am schnellsten wuchs und insgesamt 20,11 Zellverdopplungen durchlief, wies LN 438 mit 6,62 cpd/100 Tage weniger als die Hälfte und somit die geringste Proliferationsgeschwindigkeit auf und erreichte 11,45 Zellverdopplungen. Dabei konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem individuellen Proliferationsverhalten und dem Alter des Spenders abgeleitet werden.



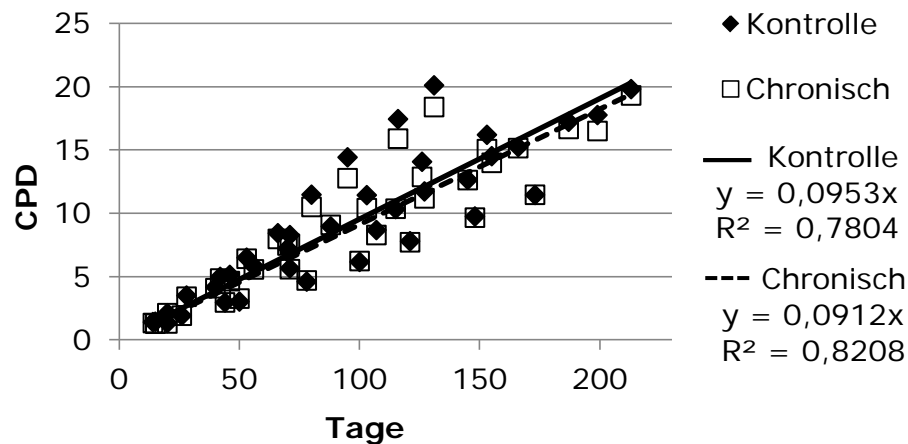
▲ **Abbildung 4—4:** Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter Kontrollbedingungen. **CPD:** Zellverdopplungen; **R²:** Bestimmtheitsmaß; **y=mx:** Gleichung der Regressionsgerade.

Insgesamt erreichten die Chondrozyten unter Kontrollbedingungen über die komplette Kultivierungsdauer eine Proliferationsgeschwindigkeit von 9,53 cpd/100 Tage. Das mit Hilfe der linearen Regressionsanalyse ermittelte Bestimmtheitsmaß R^2 betrug 0,78, der Korrelationskoeffizient nach Pearson r für die kumulativen Populationsverdopplungen und der Kultivierungsdauer ergab einen statistisch signifikanten Wert von 0,88 ($p < 0,001$).

4.3.2 Proliferationsverhalten der Chondrozyten unter chronisch oxidativem Stress

Die Chondrozyten der 5 Spender wurden unter chronisch oxidativem Stress bis zu 220 Tage mit 10 μM H_2O_2 -haltigem Zellmedium über 8-10 Passagen kultiviert. Analog zu den Kontrollbedingungen zeigte sich auch hier ein interindividuell unterschiedliches Proliferationsverhalten der Chondrozyten. LN 438 wies wie in der Kontrollgruppe unter chronischem Stress mit 6,62 cpd/100 Tage die geringste Proliferationsgeschwindigkeit auf und erreichte 11,47

Zellverdopplungen (Kontrolle: 11,45 cpd), LN 479 zeigte mit 14,04 cpd/100 Tage (Kontrolle: 15,35 cpd/100) das schnellste Wachstum und erreichte 18,40 Zellverdopplungen (Kontrolle: 20,11 cpd).

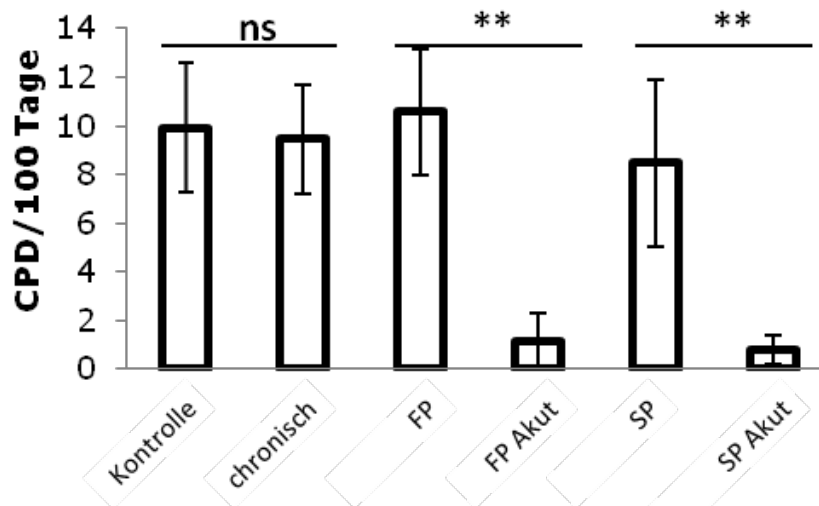


▲ **Abbildung 4—5:** Vergleich des Proliferationsverhaltens von Kontrollgruppe und chronischer Gruppe. n : Anzahl; R^2 : Bestimmtheitsmaß; $y = mx$: Gleichung der Regressionsgerade

Die Proliferationsgeschwindigkeit der Chondrozyten unter chronischem Stress war mit 9,12 cpd/100 Tage etwas geringer als in der Kontrollgruppe mit 9,53 cpd/100 Tage, wobei der Unterschied nicht statistisch signifikant war (vgl. Abbildung 4—6). Bei der Betrachtung des Proliferationsverhaltens über die Zeit lieferte die lineare Regressionsanalyse für die chronische Gruppe ein Bestimmtheitsmaß R^2 von 0,82 (Kontrolle: $R^2 = 0,78$), der Korrelationskoeffizient nach Pearson r betrug 0,91 (Kontrolle: $r = 0,88$). Auch unter chronischem Stress konnte wie unter Kontrollbedingungen somit eine statistisch signifikante lineare Korrelation der Zellverdopplungen und der Kultivierungsdauer konstatiert werden ($p < 0,001$).

4.3.3 Proliferationsverhalten nach akut oxidativem Stress

Chondrozyten aus frühen und späten Passagen wurden mit H_2O_2 -haltigem Medium in einer Konzentration von 75 – 100 μM für 2 h inkubiert und nach einer 24-stündigen Latenz 1:3 gesplittet. Nach einer 4-wöchigen Kultivierung erfolgte die Analyse der Zellproliferation junger (frühe Passage, FP) sowie alter (späte Passage, SP) Chondrozyten nach akuter oxidativer Stressexposition im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf cpd/100 Tage normiert.

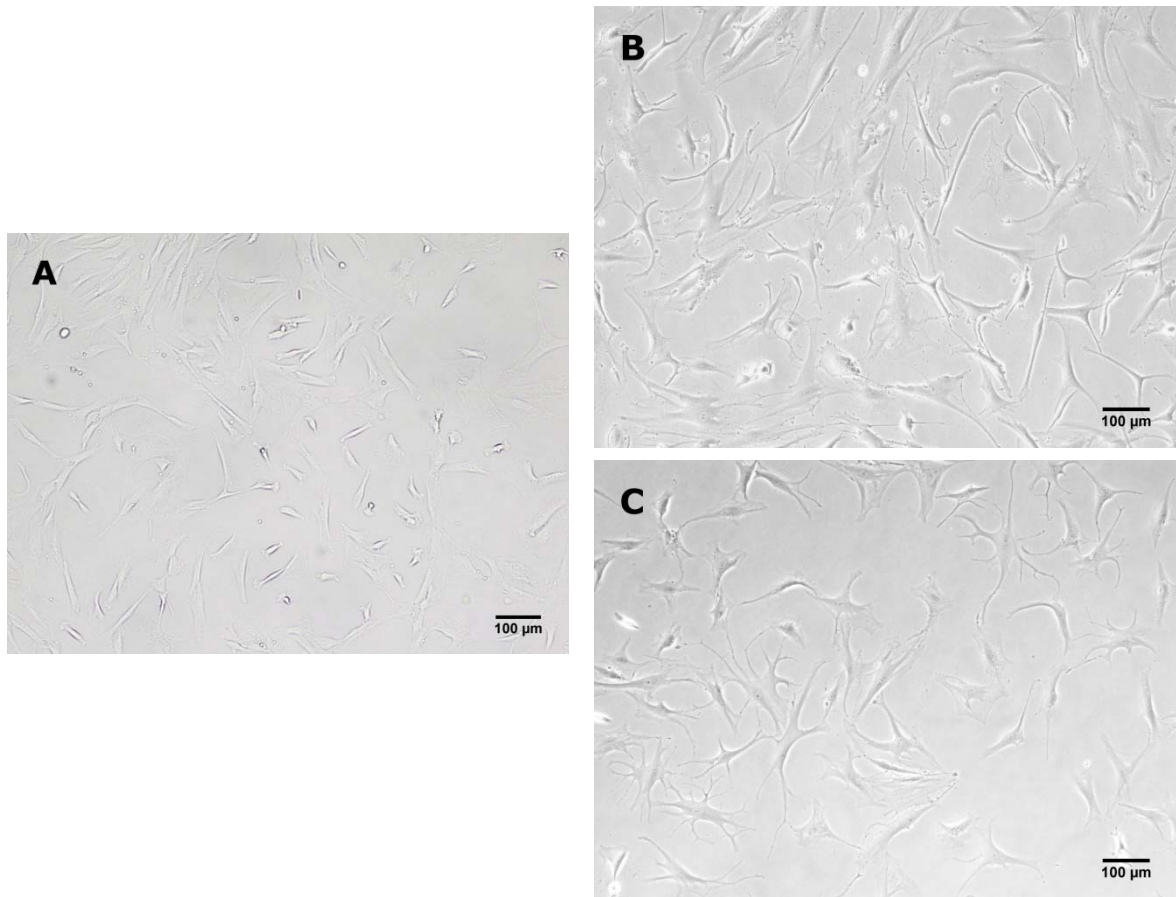


▲ **Abbildung 4–6:** Proliferationsverhalten von Chondrozyten unter oxidativem Stress. **CPD:** Zellverdopplungen **FP:** frühe Passage; **SP:** späte Passage; **ns:** nicht signifikant; ****** $p < 0,01$

Sowohl bei jungen (FP) als auch bei alten (SP) Chondrozyten konnte eine hochsignifikante Reduktion der Zellproliferation nach einer akuten, subletalen oxidativen Stressexposition mit einer H_2O_2 -Konzentration von 75-100 μM im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden ($p < 0,01$). Junge Zellen (FP) zeigten nach dem oxidativen Insult (FP Akut) lediglich noch eine Proliferationsrate von 1.14 cpd/100 Tage (FP: 10.56 cpd/100 Tage), während alte Chondrozyten (SP) nach der Stressexposition (SP Akut) ihre Proliferationsrate auf 0.79 cpd/100 Tage reduzierten (SP: 8.47 cpd/100 Tage) und damit praktisch einstellten. Dies entspricht einer relativen Reduktion der Proliferationsrate von 89% in jungen (FP vs. FP Akut) und 91% in alten (SP vs. SP Akut) Chondrozyten.

4.4 Analyse der Zellmorphologie

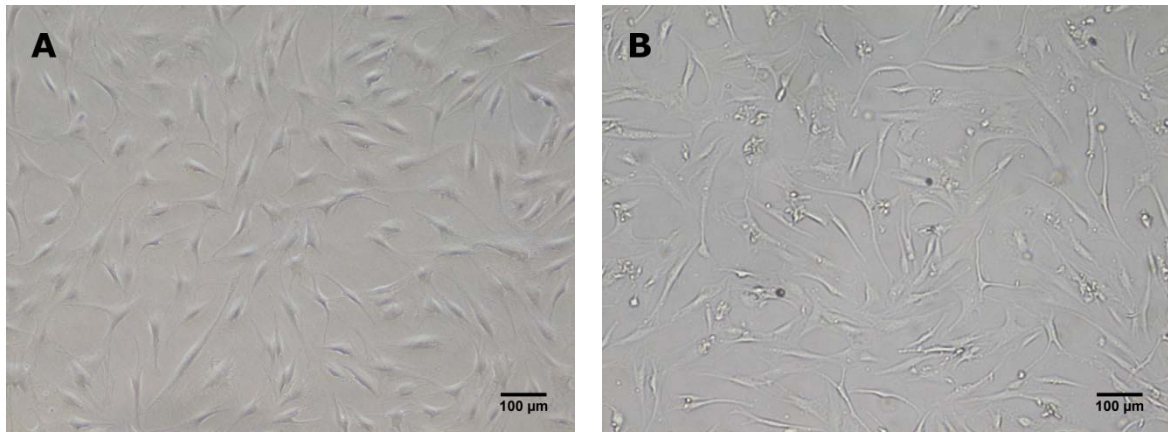
Die Morphologie der Chondrozyten veränderte sich im Laufe der Versuche und wies einige Charakteristika auf. Offenbarten die Chondrozyten zu Beginn der *in vitro* Expansion weitestgehend ein fibroblastenähnliches Erscheinungsbild in Form von rundlich bis spindelförmigen, schlanken Zellen, zeigten sich über die Kultivierungsdauer zunehmend Seneszenz-typische Veränderungen wie Größenprogreddiente, abgeflachte Zelleiber mit plumpen Ausläufern und der Akkumulation von zytoplasmatische Einschlusskörperchen.



▲ **Abbildung 4—7:** *Typische Morphologie junger und alter Chondrozyten (LN 579). A: schlanke, fibroblastenähnliche Morphologie junger Chondrozyten (1.Passage); Durchlicht B+C: Seneszenz-typische Veränderungen alter Chondrozyten mit vergrößerten Zellleibern, plumpen Ausläufern und zytoplasmatischen Einschlusskörperchen; Phasenkontrast. B: 7.Passage unter Kontrollbedingungen. C: 7.Passage unter chronisch oxidativem Stress. Maßstabsbalken entspricht 100µm.*

Die Entwicklung Seneszenz-typischer morphologischer Veränderungen über die Kultivierungsdauer konnte sowohl in den Kontroll- als auch in den chronisch oxidativen Stressgruppen (10 µM H₂O₂ im Zellkulturmedium) beobachtet werden. Ein wesentlicher Unterschied bezüglich der Ausprägung dieser Veränderungen bestand dabei nicht (vgl. B und C in Abbildung 4—7).

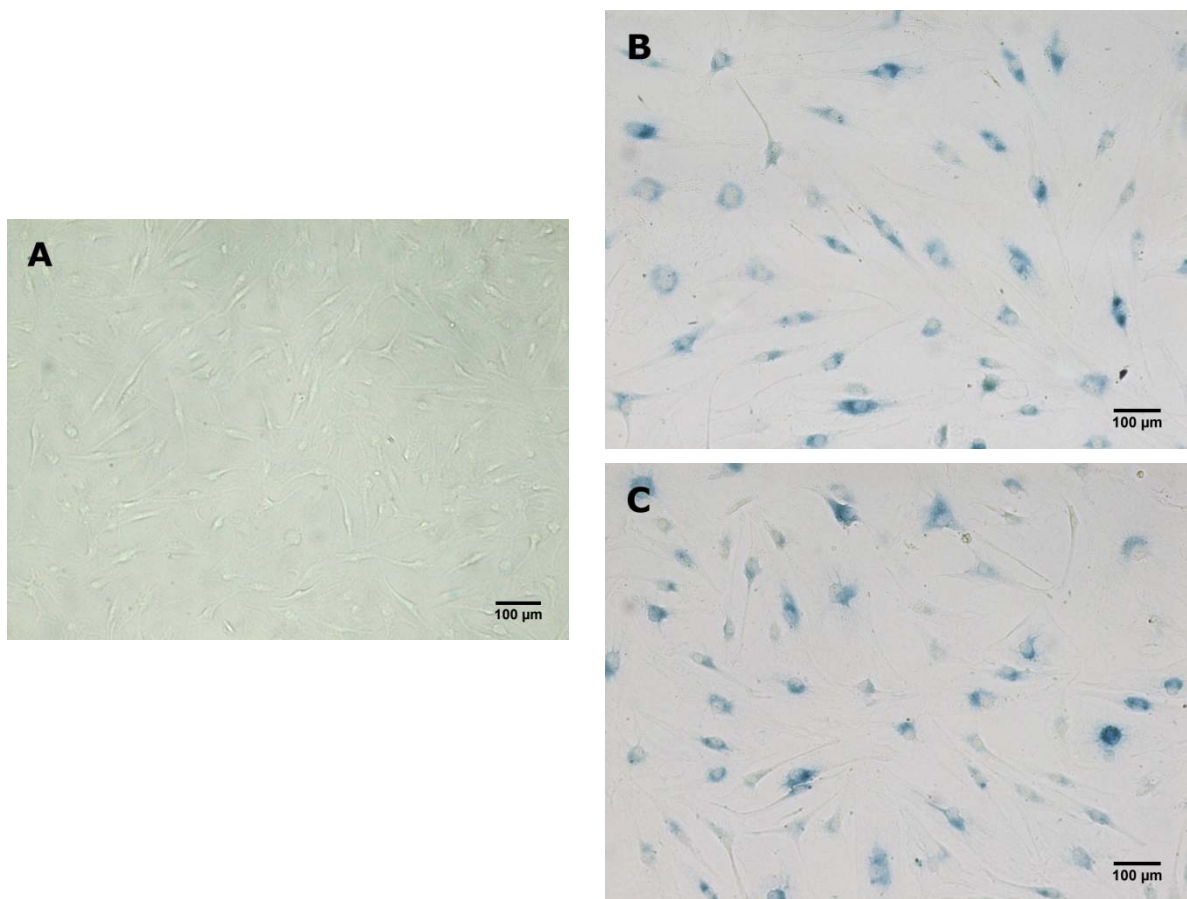
Chondrozyten, die im Rahmen der oxidativen Akutversuche mit subletalen H₂O₂-Dosen (75-100 µM für 2 Stunden) inkubiert wurden, zeigten mit Zellgrößenzunahme und –verplumpung ebenfalls seneszenz-typische Veränderungen. Das Ausmaß der postexpositionellen Veränderungen war dabei interindividuell unterschiedlich, wobei Chondrozyten später Passagen tendenziell deutlichere Unterschiede zeigten.



▲ **Abbildung 4—8:** Seneszenz-typische morphologische Veränderungen nach akuter subletaler oxidativer Stressexposition (LN 438, 1. Passage). **A:** vor der oxidativen Stressexposition; Phasenkontrast **B:** nach der oxidativen Stressexposition erkennt man vergrößerte, abgeflachte Chondrozyten mit vermehrtem Zelldebris; Durchlicht. Maßstabsbalken entspricht 100µm.

4.5 Analyse der SA β -Galaktosidase Expression

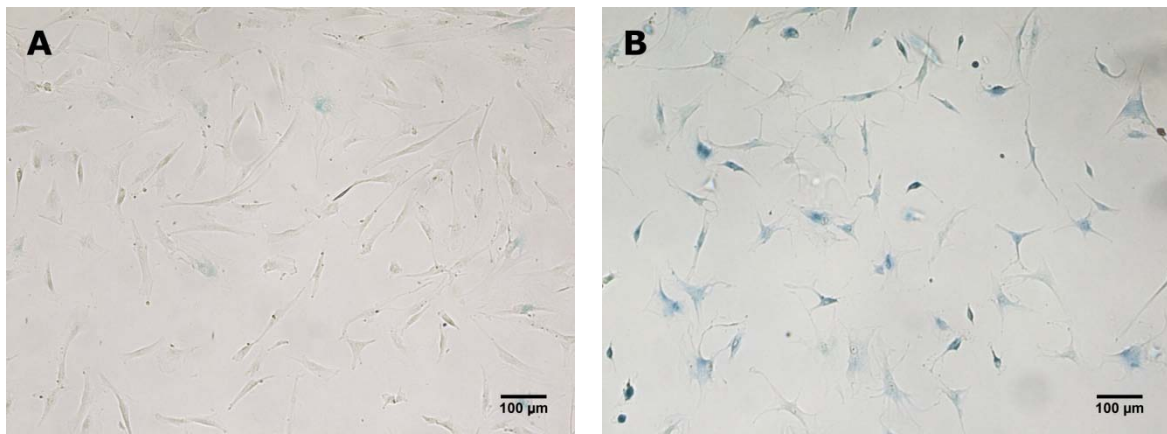
Das Auftreten der Seneszenz-assoziierten (SA) β -Galaktosidase ist ein anerkannter und verbreiteter Marker der Seneszenz und wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der X-Gal Färbung nachgewiesen. Blaue Zellen signalisieren dabei die Existenz der SA β -Galaktosidase und implizieren auf diese Weise die eingetretene Seneszenz.



▲ **Abbildung 4—9:** Vergleich der SA β -Galaktosidase Expression junger und alter Chondrozyten (LN 438). **A:** SA β -Galaktosidase negative junge Chondrozyten (1.Passage) **B+C:** SA β -Galaktosidase positive alte Chondrozyten. **B:** 7.Passage unter Kontrollbedingungen. **C:** 7.Passage unter chronisch oxidativem Stress. Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Während sich bei allen Primärzellkulturen zu Beginn der Expansion die jungen Chondrozyten nicht anfärben ließen und weitestgehend SA β -Galaktosidase negativ waren, zeigten sich in den späten Passagen mehr als 90% der Zellen blau und damit SA β -Galaktosidase positiv. Ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der chronisch oxidativen Stressgruppe konnte wie bei der Morphologie auch bezüglich der SA β -Galaktosidase Expression nicht nachgewiesen werden.

Nach den oxidativen Akutversuchen (75-100 μ M H_2O_2 für 2 Stunden) erhöhte sich der Anteil blauer bzw. SA β -Galaktosidase positiver Chondrozyten, wobei die Ausprägung zwischen den getesteten Chondrozyten variierte. Die Färbung wurde in 6-Well Platten 1 Woche nach der Stressexposition durchgeführt.



▲ **Abbildung 4—10:** Veränderung der SA β -Galaktosidase Expression nach akuter subletaler oxidativer Stressexposition (LN 579). **A:** vor der oxidativen Stressexposition **B:** nach oxidativer Stressexposition erkennt man weitestgehend blau gefärbte Chondrozyten. Maßstabsbalken entspricht $100\mu\text{m}$.

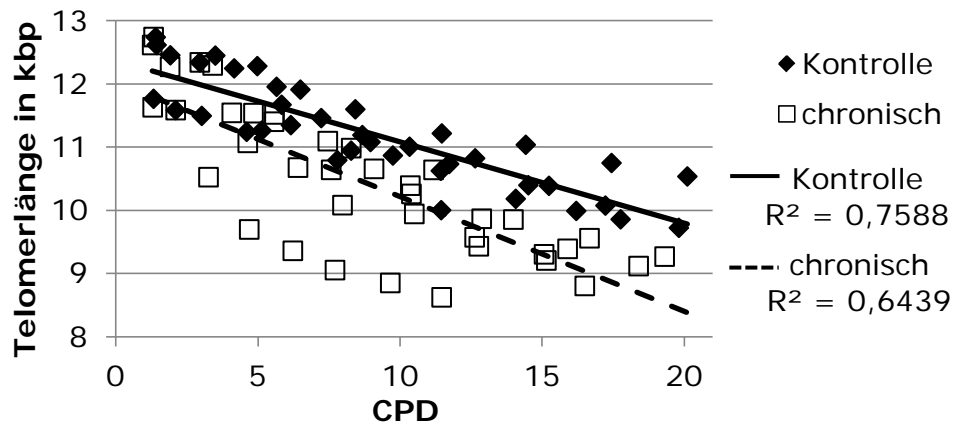
4.6 Analyse der Telomerlänge

4.6.1 Telomerlänge zunehmend seneszenten Chondrozyten unter Kontrollbedingungen und chronisch oxidativem Stress

Die Chondrozyten von 5 Donoren wurden zu Beginn der *in vitro* Langzeitkultivierung in eine Kontrollgruppe und eine chronisch oxidative Stressgruppe (Zellkulturmedium mit $10\ \mu\text{M}\ \text{H}_2\text{O}_2$) aufgeteilt. Die Bestimmung der Telomerlänge mit Hilfe des TRF-Assays erfolgte zu jeder Zellpassage, bei der durch Zellzählung auch die kumulativen Zellverdopplungen (cpd) festgestellt wurden. Zur Analyse wurden die Telomerlängen gegen die Zellverdopplungen aufgetragen.

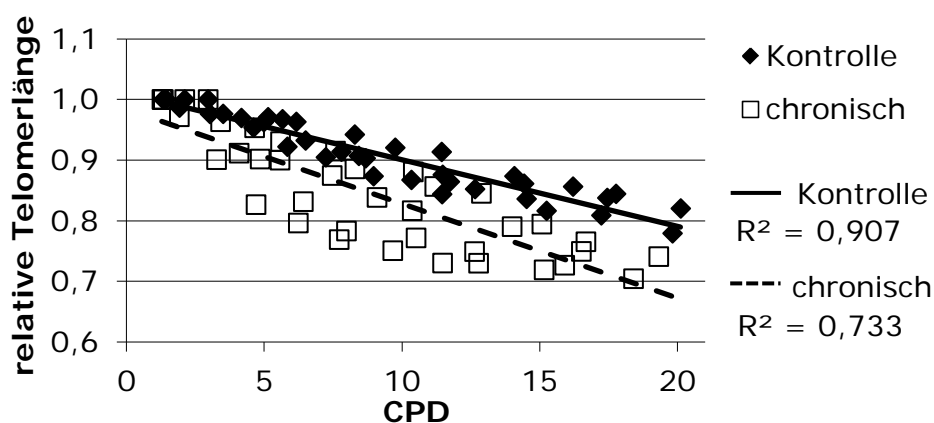
Die initiale mittlere Telomerlänge am Anfang der Kultivierung lag zwischen 11 und 12,2 kbp (MW \pm SD: 11707 bp \pm 512 bp). Während die Chondrozyten unter Kontrollbedingungen am Ende der Betrachtungsperiode Telomerlängen von 9,2 bis 10 kbp (MW \pm SD: 9600 bp \pm 347 bp) aufwiesen, verkürzten sich die Telomere der Chondrozyten in der chronisch oxidativen Stressgruppe auf 8,3 bis 8,7 kbp (MW \pm SD: 8503 bp \pm 278 bp). Die Telomerverkürzung pro cpd war in der chronisch oxidativen Stressgruppe mit 219 bp/cpd signifikant höher als in der Kontrollgruppe mit 140 bp/cpd ($p < 0,01$). In beiden Gruppen korrelierte dabei die Telomerlänge negativ linear mit den Zellverdopplungen (p

< 0,0001), wobei der Telomerverlust pro Zellverdopplung über den gesamten Betrachtungszeitraum, in dem die Chondrozyten einer progredienten Dedifferenzierung unterlagen,^{110–112} konstant blieb.



▲ **Abbildung 4—11:** *Telomerlängenentwicklung von Chondrozyten unter Kontrollbedingungen und chronisch oxidativem Stress. CPD: Zellverdopplungen.*

Um die Daten der verschiedenen Primärzellkulturen trotz unterschiedlicher Ausgangslänge der Telomere besser vergleichen zu können, wurden die relativen Telomerlängen verwendet und gegen die kumulativen Zellverdopplungen (cpd) aufgetragen. Die relativen Telomerlängen ergaben sich dabei aus dem Verhältnis der gemessenen Telomerlänge bei Zellpassage zur Ausgangstelomerlänge der betroffenen Primärzellkultur.

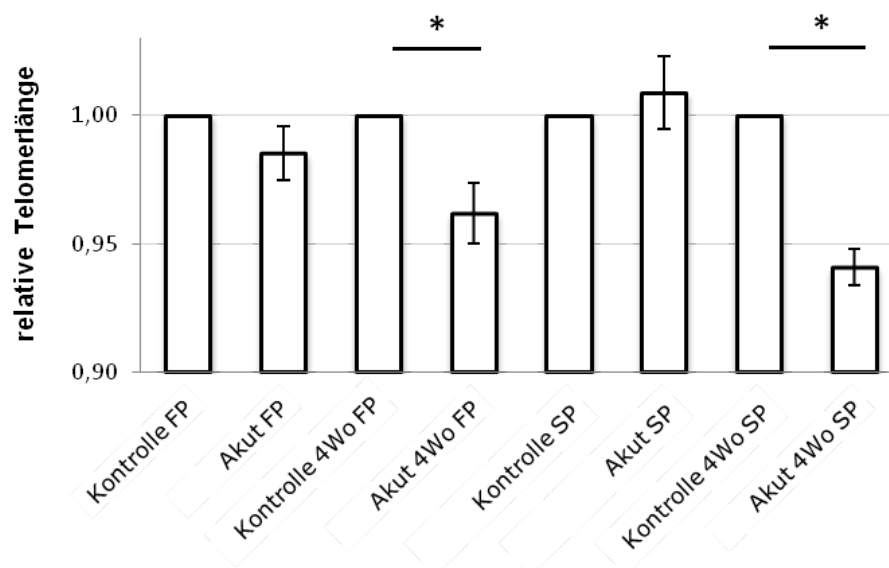


▲ **Abbildung 4—12:** *Relative Telomerlängenentwicklung von Chondrozyten unter Kontrollbedingungen und chronisch oxidativem Stress. CPD: Zellverdopplungen.*

Die relative Telomerlänge korrelierte in beiden Gruppen hochsignifikant ($p < 0,0001$) negativ linear mit den kumulativen Zellverdopplungen, wobei sich für die Kontrollgruppe ein Korrelationskoeffizient r nach Pearson von 0,95 ergab, für die chronische oxidative Stressgruppe war $r = 0,86$. Die relative Telomerverkürzung pro cpd erreichte mit 1,88%/cpd in der chronisch oxidativen Stressgruppe einen signifikant höheren Wert als in der Kontrollgruppe mit 1,19%/cpd ($p < 0,05$).

4.6.2 Einfluss von akut oxidativem Stress auf die Telomerlänge junger und alter Chondrozyten

Junge und alte Chondrozyten aus frühen (FP) bzw. späten (SP) Passagen wurden für diesen Versuchsteil 2 Stunden subletalen H_2O_2 -Konzentrationen (75-100 μ M) ausgesetzt. Bei einem Teil der Zellen erfolgte nach 24 h die Probenisolierung zur Telomerlängenbestimmung (Akut FP und Akut SP), der andere Teil wurde nach 24 h passagiert und weitere 4 Wochen bis zur endgültigen Probenisolierung für den TRF-Assay kultiviert (Akut 4 Wo FP und Akut 4 Wo SP). Da auch hier die unterschiedliche Ausgangstelomerlänge aufgrund interindividueller Variationen der verschiedenen Chondrozytenspender die Auswertung erschwerten, wurden aus Aspekten der Übersichtlichkeit relative Telomerlängen aus dem Verhältnis der gemessenen Telomerlänge zur Ausgangstelomerlänge verwendet.



▲ **Abbildung 4—13:** Relative Telomerverkürzung junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 24 h und 4 Wochen nach akut oxidativer Stresseinwirkung. **FP:** frühe Passage. **SP:** späte Passage. * $p < 0,05$

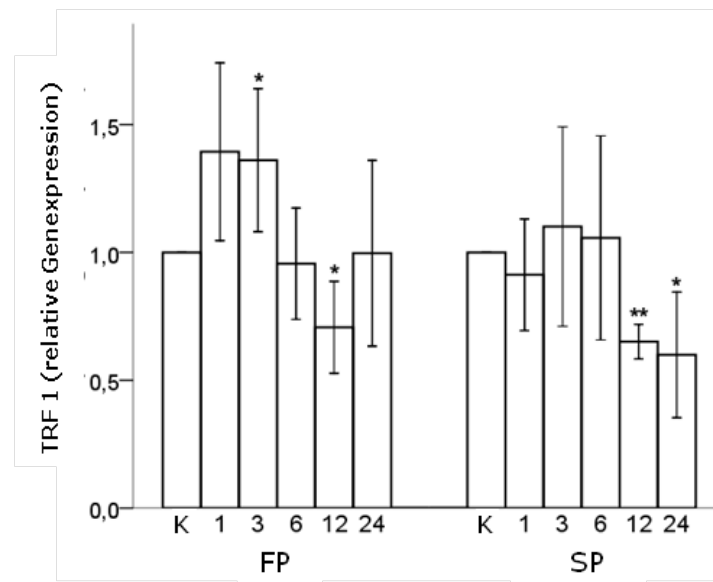
24 h Stunden nach dem oxidativen Akutversuch zeigten die Chondrozyten keine signifikanten Änderungen der Telomerlänge. Sowohl junge Chondrozyten (Kontrolle FP vs. Akut FP) als auch alte Chondrozyten aus späten Passagen (Kontrolle SP vs. Akut SP) wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (vgl. Abbildung 4–13). Wurden die Chondrozyten im Gegensatz hierzu nach 24 h passagiert und weitere 4 Wochen kultiviert, so hatten die Chondrozyten aus der Akutgruppe signifikant kürzere Telomere als die Kontrollgruppe, die ohne H₂O₂-Einfluss kultiviert wurde. Bei jungen Chondrozyten (FP) zeigte sich eine Verkürzung der Telomere um 415 bp bzw. 5.8% ($p = 0,015$), alte Chondrozyten (SP) wiesen einen Telomerverlust von 582 bp bzw. 7.1% ($p = 0.01$) auf.

4.7 Analyse der Genexpression

Junge und alte Chondrozyten aus frühen (FP) bzw. späten (SP) Passagen wurden für diesen Versuchsteil 2 Stunden subletalen H₂O₂-Konzentrationen (75-100µM) ausgesetzt. 1, 3, 6, 12, und 24 h post H₂O₂-Exposition wurden RNA-Proben aus den Chondrozyten isoliert und mittels RT-PCR die auf das housekeeping gene GAPDH normierte Expression der Gene TRF1, TRF2, XRCC5, p21 und SIRT1 bestimmt. Die folgenden Abbildungen zeigen die relative Expression der untersuchten Gene bezogen auf die unmittelbar vor Versuchsbeginn isolierte Kontrolle. Die aufgrund getesteter, interindividueller Unterschiede verwendeten H₂O₂-Konzentrationen von 75 bzw. 100 µM zeigten keinen divergierenden Einfluss auf das Genexpressionsprofil, so dass die Ergebnisse einer einheitlichen Auswertung zugeführt werden konnten.

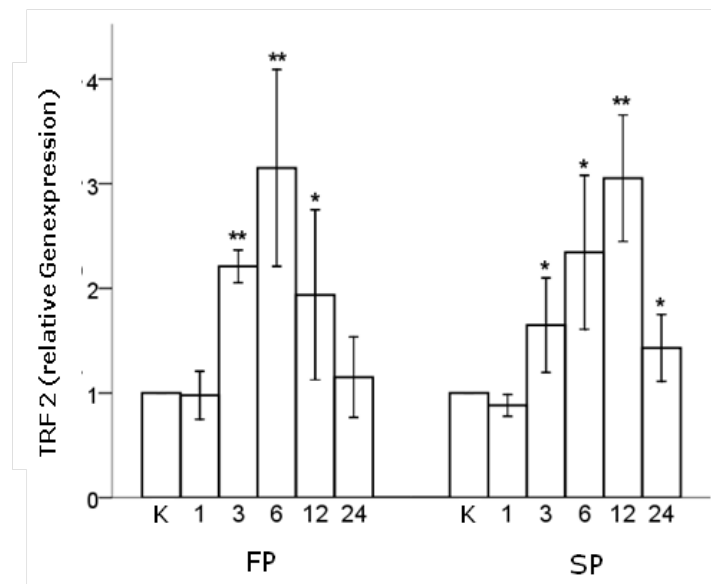
4.7.1 Expression von TRF1 und TRF2

Bei jungen Chondrozyten (FP) zeigte sich 3 h postexpositionell eine signifikante, etwa 40%-ige Steigerung der TRF1 Expression, während es nach 12 h zu einem signifikanten Expressionsabfall gegenüber der Kontrolle kam, bevor nach 24 h in etwa wieder das Kontrollniveau erreicht wurde. Alte Chondrozyten (SP) zeigten hingegen über die ersten 6 h nach der H₂O₂-Exposition ein konstantes Expressionsmuster von TRF1, bevor es nach 12 h zu einem hochsignifikanten Abfall der Expression kam, der auch noch nach 24 h anhielt. Die Expressionsänderungen erreichten dabei weder in jungen noch in alten Zellen physiologisch relevante Werte.



▲ **Abbildung 4—14:** Relative TRF1-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition. **K:** Kontrolle. **FP:** frühe Passage. **SP:** späte Passage. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

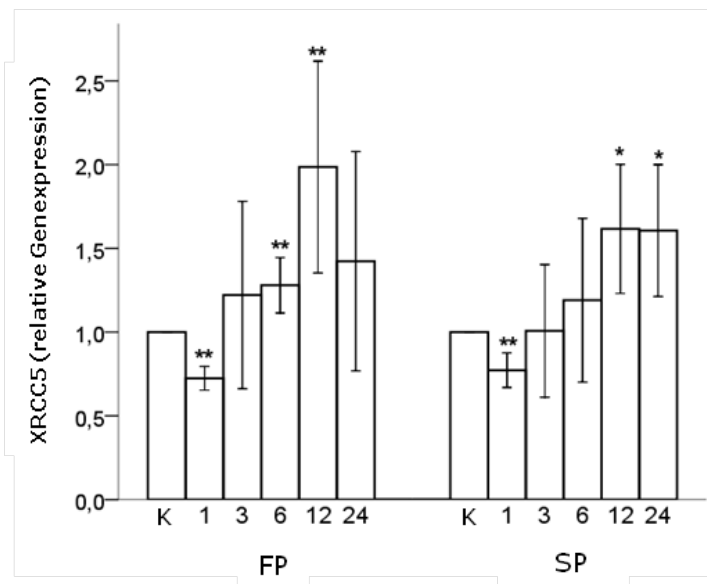
Die TRF2 Expression stieg in jungen Chondrozyten (FP) nach 3 h signifikant an und erreichte nach 6 h einen Maximalwert, der dem dreifachen Ausgangswert entsprach ($p < 0,05$). Danach sank die Expression und erreichte nach 24 h wieder das Kontrollniveau. Bei alten Chondrozyten (SP) zeigte sich ein ähnlicher signifikanter Anstieg der TRF2 Expression bis auf den dreifachen Ausgangswert, dieser wurde hier allerdings erst nach 12 h erreicht. Anschließend sank die relative Genexpression, war nach 24 h allerdings immer noch signifikant über dem Ausgangsniveau ($p < 0,05$).



▲ **Abbildung 4—15:** Relative TRF2-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition. **K:** Kontrolle. **FP:** frühe Passage. **SP:** späte Passage. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.7.2 Expression von XRCC5

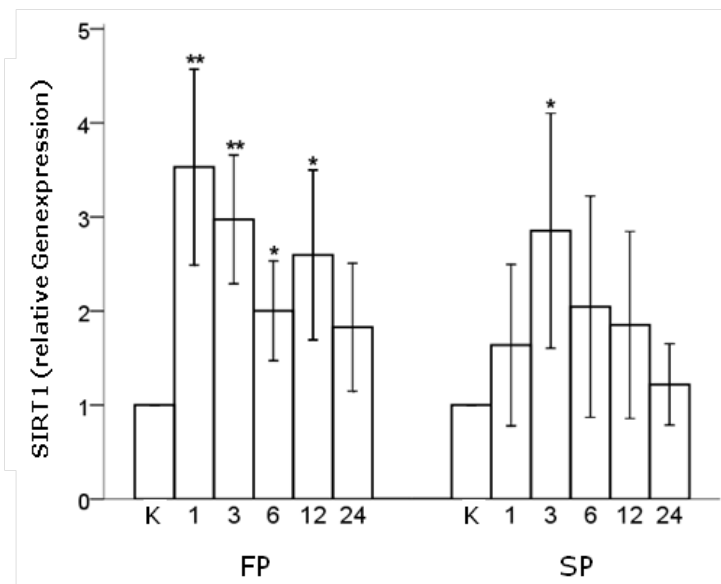
Betrachtet man die XRCC5 Expression, zeigte sich sowohl in jungen (FP) als auch in alten (SP) Chondrozyten 1 h nach dem akut oxidativen Insult eine signifikante Reduktion. Bei jungen Zellen folgte eine stetige Steigerung der Expression bis auf das zweifache Ausgangsniveau nach 12 h ($p < 0,01$), alte Zellen zeigten ihr Expressionsmaximum ebenfalls nach 12 h, erreichten dabei allerdings nur den 1,5-fachen Kontrollwert ($p < 0,05$). Nach 24 h blieb bei alten Zellen das nach 12 h erreichte Niveau erhalten, während die Expression von XRCC5 bei jungen Zellen etwas absank, dabei aber immer noch über dem Ausgangsniveau verblieb.



▲ **Abbildung 4—16:** Relative XRCC5-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition. **K:** Kontrolle. **FP:** frühe Passage. **SP:** späte Passage. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.7.3 Expression von SIRT1

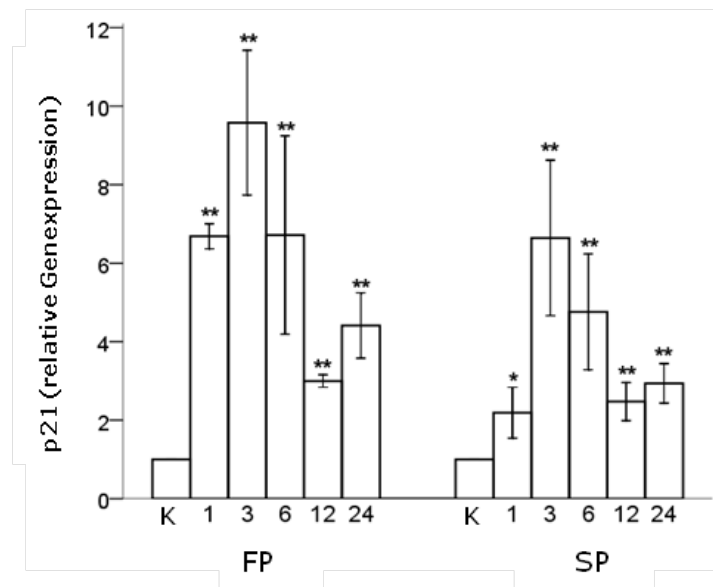
Das zeitliche Expressionsmuster von SIRT1 nach oxidativem Stress zeigte in jungen Zellen (FP) bereits nach 1 h einen hochsignifikanten Anstieg auf das 3,5-fache Ausgangsniveau. Nach niedrigeren – aber stets signifikant höheren Werten nach 3, 6 und 12 h im Vergleich zur Kontrolle – sank die Expression wieder auf einen zur Kontrolle nicht signifikant unterschiedlichen Wert nach 24 h. Alte Chondrozyten (SP) erreichten lediglich nach 6 h einen signifikant höheren Wert. Bei den restlichen Zeitpunkten war die Expression zwar tendenziell erhöht, erreichte aber keine statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle.



▲ **Abbildung 4—17:** Relative SIRT1-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition. **K:** Kontrolle. **FP:** frühe Passage. **SP:** späte Passage. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.7.4 Expression von p21

Die Expression von p21 nach subletaler Wasserstoffperoxidinkubation zeigte sowohl in jungen (FP) als auch in alten (SP) Chondrozyten zu jedem Zeitpunkt eine signifikant erhöhte Expression. Bei beiden Gruppen wurde das Expressionsmaximum nach 3 h erreicht und betrug etwa das neunfache Ausgangsniveau bei jungen Chondrozyten und das sechsfache Ausgangsniveau bei alten Chondrozyten ($p < 0,01$). Anschließend zeigte sich eine Expressionsreduktion, verblieb aber auch nach 24 h auf einem Wert, der bei jungen Zellen vierfach ($p < 0,01$), bei alten Zellen noch dreifach über der Kontrolle lag ($p < 0,01$). Die maximal erreichte Expression von p21 bei den akut oxidativen Stressversuchen entsprach dabei in etwa dem Expressionsniveau, das in seneszenten Chondrozyten gefunden wurde (nicht in der Abbildung aufgeführt).



▲ **Abbildung 4—18:** Relative p21-Genexpression junger (FP) und alter (SP) Chondrozyten 1, 3, 6, 12, und 24 h nach akut oxidativer Stressexposition. **K:** Kontrolle. **FP:** frühe Passage. **SP:** späte Passage. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

5 Diskussion

Chondrozyten sind spezialisierte Zellen, die Knorpelgewebe synthetisieren und für dessen Homöostase verantwortlich sind.¹¹³ Aufgrund der fehlenden Vaskularisation des Knorpels (avaskuläres Gewebe) sind Chondrozyten an eine Lebensumgebung adaptiert, die unter anderem durch einen im Vergleich zu vielen anderen Zellen des Körpers niedrigeren Sauerstoffpartialdruck gekennzeichnet ist.^{114, 115} Sauerstoff (O₂) und davon abgeleitete reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) beeinflussen dabei nicht nur die Differenzierung und den Phänotyp von Zellen,^{116, 117, 115} sondern sind bei Überschreitung der antioxidativen Kapazitäten der Zellen und daraus resultierendem oxidativen Stress auch maßgeblich an der Entstehung der extrinsischen oder Stress-induzierten prämaturnen Seneszenz (SIPS) beteiligt.¹⁰² Seneszente Chondrozyten sind durch ein Sekretionsmuster autoparakrin wirkender kataboler und proinflammatorischer Enzyme gekennzeichnet (SASP), das in vergleichbarer Weise auch bei Chondrozyten zu finden ist, die aus arthrotisch verändertem Knorpelgewebe isoliert wurden und denen somit eine Rolle in der Entstehung von Arthrose zugesprochen wird.^{29, 34, 36, 118} In Verbindung mit neuesten Erkenntnissen, die einen eindeutigen Zusammenhang zwischen zellulärer Seneszenz und altersassoziierten Erkrankungen nachweisen,³⁸ werden die komplexen Zusammenhänge und Interdependenzen von externen Stressoren wie O₂ und ROS, zellulärer Seneszenz und altersassoziierten Erkrankungen wie Arthrose deutlich.

Vor allem bei Chondrozyten, die im Rahmen der autologen Chondrozytentransplantation bei Knorpeldefekten bereits klinisch im Einsatz sind²⁰ und einer schnellen *in vitro* Expansion bedürfen,¹¹⁹ sind die Auswirkungen von oxidativem Stress in diesem Kontext weitestgehend unbekannt. Wiederholte oxidative Präkonditionierung schützt Knorpelgewebe vor mechanisch induziertem Schaden¹⁰⁰ und dessen Einsatz im Rahmen der *in vitro* Expansion könnte eine Kultivierung stressresistenter und somit qualitativ hochwertiger Chondrozyten ermöglichen,⁹⁹ andererseits besteht durch den oxidativen Stress die Gefahr, dass vermehrt Chondrozyten in die Seneszenz eintreten und durch die damit einhergehende vermehrte Sekretion kataboler und proinflammatorischer Substanzen die Arthroseentwicklung negativ beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals die Auswirkungen von akut und chronisch oxidativem Stress in Form von H₂O₂ auf

die Seneszenz humaner Chondrozyten untersucht. Besonderer Fokus lag dabei auf dem Proliferationspotential, der Morphologie und der Telomerlänge, sowie der Expression von telomerassozierten und in der Bewältigung von Zellstress involvierten Genen.

5.1 Diskussion der Zellproliferation

Chondrozyten sind hochdifferenzierte Zellen, die sich in gesundem Knorpel *in vivo* praktisch nicht mitotisch teilen und deswegen häufig als post-mitotisch angesehen werden. Unter definierten Bedingungen *in vitro* findet jedoch eine Wiederaufnahme der mitotischen Teilungsaktivität statt, die in begrenzter Form auch als Reaktion auf traumatische oder degenerative Schäden am Knorpel *in vivo* auftritt.^{113, 120, 121}

Wie auch andere diploide, somatische humane Zellen verfügen Chondrozyten über kein unendliches Proliferationspotential,²⁴ sondern stellen nach einer bestimmten Anzahl von Zellverdopplungen (cpd) ihr expansives Wachstum ein und treten in das Stadium der Seneszenz ein. Während Fibroblasten unter Standardzellkulturbedingungen mit atmosphärischen O₂-Partialdruck etwa 50±10 cpds erreichen,²⁴ stellen Chondrozyten ihr Wachstum bereits nach etwa 25-35 cpds ein.^{122, 123}

In unseren Versuchen lagen die erreichten kumulativen Zellverdopplungen zwischen 11,45 (LN 438) und 20,11 (LN 479) bei einer Proliferationsgeschwindigkeit zwischen 6,62 und 15,35 cpd/100 Tage und damit unter den in der Literatur publizierten Werten. Ein statistischer Zusammenhang zwischen Patientenalter und Proliferationskapazität oder -geschwindigkeit konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Während einer *in vitro* Expansion sind Zellen einem Kulturstress ausgesetzt, der massiven Einfluss auf verschiedenste Zellfunktionen wie auch das Proliferationspotential hat. Zu den stressauslösenden Faktoren zählen ein im Vergleich zur natürlichen Umgebung von Chondrozyten erhöhter O₂-Partialdruck von 20% im Vergleich zu 1-5% *in vivo*,¹⁰¹ als auch verwendetes Zellmedium, Zellkulturflaschen oder Serum.^{27, 124, 125} Diese Faktoren beeinflussen das Proliferationspotential und können als erklärende Ursache der beobachteten Unterschiede herangezogen werden. Durch die lange Kultivierungsdauer von bis zu 220 Tagen in unseren Versuchen ist auch eine Unterschätzung der cpd aufgrund methodischer Gegebenheiten nicht auszuschließen. Nicht adhärente

Zellen werden beim Mediumwechsel und der Zellpassage abgesaugt und gehen folglich nicht in die Zellzählung ein. Über eine Kultivierungsdauer von mehr als einem halben Jahr können kleine dadurch gegebene Abweichungen zu einer beobachteten, niedrigeren cpd beitragen. Desweiteren konnten aus organisatorischen Gründen die bereits vollzogenen kumulativen Zellverdopplungen zwischen Isolation der Chondrozyten aus dem Knorpelgewebe und der primären Kryokonservierung nicht nachvollzogen werden.

Bezüglich der Proliferationskapazität- und geschwindigkeit von Zellen *in vitro* in Abhängigkeit vom Donoralter finden sich kontroverse Literaturangaben. Bei Chondrozyten⁵⁸ und Fibroblasten¹²⁶ wurde eine beeinträchtigte Proliferationskapazität mit zunehmendem Donoralter konstatiert, wobei bei Berücksichtigung weiterer Faktoren wie beispielsweise dem Gesundheitszustand der Donoren diese Korrelation nicht zwangsläufig ist.¹²⁷ Den Ergebnissen aus unseren Versuchen folgend hat ein hohes Patientenalter zumindest keine negativen Effekte auf die Zellproliferation *in vitro* und stellt somit keine Kontraindikation für die Anwendung des Tissue Engineering dar, über das chondrogene (Re-)Differenzierungspotential lässt sich im Rahmen unserer Versuche keine Aussage treffen – zumindest während der Redifferenzierungsphase scheint jedoch ein geringer O₂-Partialdruck förderlich zu sein.¹²⁸ Die untersuchte Anzahl von Patienten mit n=5 ist darüber hinaus sehr gering, um valide Aussagen machen zu können. Diese Ergebnisse sind deshalb mit Vorsicht zu interpretieren.

In den experimentellen Stressgruppen wurde der Effekt einer chronisch, niedrig dosierten (10 µM) und einer akut subletalen H₂O₂-Exposition untersucht. Das verwendete Regimen war dabei ein in der Wissenschaft akzeptiertes und breit angewandtes Verfahren in Studien über zelluläre Seneszenz unterschiedlicher tierischer und humaner Zellen.^{90, 96, 129, 130} Sieht man eine direkte Korrelation von O₂-Partialdruck und ROS als gegeben an,¹³¹ können Studien, die Effekte unterschiedlicher O₂-Konzentrationen auf das Wachstum und andere zytologische Marker untersuchen, auch als Referenz für eine chronisch oxidative Schädigung der Chondrozyten herangezogen werden.

Bereits eine Kultivierung unter atmosphärischem O₂-Gehalt von 20% stellt für Zellen einen unphysiologischen Stressreiz dar, sind Zellen *in vivo* doch an einen O₂-Partialdruck von 1-5% adaptiert. So zeigte sich in Studien, die Zellkulturen unter physiologischen O₂-Partialdrücken von 3-5% durchführten, eine Steigerung der kumulativen Zellverdopplungen um durchschnittlich 20-30%,

teilweise auf das Doppelte im Vergleich zur Kontrollgruppe unter einem 20%-igen O_2 -Partialdruck. Diese Ergebnisse wurden mit Hilfe von humanen diploiden Fibroblasten (HDF)⁸⁸ erzielt und später auch für humane¹²² und Chondrozyten von Hühnern¹¹⁶ bestätigt. Ein erhöhter O_2 -partialdruck von 50% hatte dagegen negative Effekte auf die Zellen mit einer verkürzten *in vitro* Lebensspanne. Unphysiologisch hohe O_2 -Konzentration mit konsekutiver erhöhter ROS Bildung limitieren somit die erreichbaren kumulativen Zellverdopplungen *in vitro*.

In unseren Versuchen bezüglich einer chronisch oxidativen Schädigung humaner Chondrozyten mit 10 μM H_2O_2 zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Proliferationsverhaltens gegenüber der Kontrollgruppe. Studien an HDFs zeigten bei einer H_2O_2 -Exposition mit gleicher Konzentration bereits nach wenigen Tagen einen Proliferationsstopp und typische Zeichen der zellulären Seneszenz.⁹⁰ Die Wirksamkeit von H_2O_2 ist allerdings stark von verwendeten Puffern und Medium abhängig.⁹⁶ Diese Parameter waren in den betrachteten Studien nicht identisch, was als mögliche Erklärung dienen kann. Möglicherweise zeigen Chondrozyten unter diesen Kulturbedingungen auch eine höhere oxidative Stresstoleranz als HDFs bzw. die gewählte H_2O_2 -Konzentration war in dem Setting mit atmosphärischen O_2 -Partialdruck zu gering, um einen Unterschied feststellen zu können.¹³² Vergleichbare Ergebnisse wie bei den hier untersuchten Chondrozyten zeigten sich auch bei mesenchymalen Stammzellen (MSC).¹³³

In den Stressversuchen mit akut subletalen H_2O_2 -Konzentration von 75-100 μM stellten sowohl junge (FP) als auch alte (SP) Chondrozyten ihre Proliferation praktisch ein, wobei der Effekt bei alten Chondrozyten noch ausgeprägter war, was auf eine reduzierte oxidative Stresstoleranz bei langzeitkultivierten (dedifferenzierten) Chondrozyten hinweist.¹³² Auch MSCs¹³³ sowie andere Zellen^{130, 74, 134} zeigten nach akuter, subletaler H_2O_2 -Exposition eine signifikante Reduktion bzw. Einstellung der Proliferation. Die Ergebnisse bestätigen die bekannte Stress-induzierte prämaturne Seneszenz (SIPS) durch akute subletale H_2O_2 -Exposition bei humanen Chondrozyten.

5.2 Diskussion der Zellmorphologie

Werden Chondrozyten aus Knorpelgewebe isoliert und in Monolayern *in vitro* kultiviert, verlieren sie ihre physiologische runde Form und nehmen als Zei-

chen ihrer Entdifferenzierung eine fibroblastenähnliche, spindelförmige Morphologie an.^{135, 136} Mit zunehmender Dauer der Expansion folgen Seneszenz-assoziierte Veränderungen – bereits vor Erreichen des Hayflick-Limits – wie ein Aktivitätswechsel bestimmter transkribierter Gene (Kollagene, Aggrecan, Glykosaminoglykane), ein verändertes Ansprechen auf Wachstumsfaktoren und eine morphologische Größenprogreddiente Abflachung der Zelleiber mit plumpen Ausläufern und der Akkumulation von zytoplasmatischen Einschlusskörperchen.^{24, 110, 137} Seneszenz-assoziierte Veränderungen, die hier dem progredienten Telomerverlust während der prolongierten Expansion zugesprochen werden (replikative Seneszenz), können durch Stressoren wie UV-Bestrahlung, Onkogenaktivierung oder ROS unabhängig vom *in vitro* Alter der Zellen auch prämaturn induziert werden (SIPS).^{74, 75, 90, 95, 138}

In unseren Versuchen konnte die Änderung der Morphologie in Abhängigkeit des *in vitro* Alters – wie in der Literatur beschrieben – gut nachvollzogen werden. Junge Zellen zeigten ein fibroblastenähnliches, spindelförmiges Aussehen, das im Laufe der Expansion der Seneszenz-assoziierten Morphologie mit abgeflachten, vergrößerten Zelleibern mit plumpen Ausläufern und vermehrtem Zelldebris wich. Die Morphologie der Chondrozyten unter chronisch oxidativem Stresseinfluss wies dabei keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Zwar steht dies im Widerspruch zu anderen Studien mit geringem O₂-Partialdruck,¹¹⁶ doch ist dieses Ergebnis in Analogie zur unveränderten Proliferationsfähigkeit der oxidativen Stressgruppe nicht überraschend und die dort aufgeführten Erklärungen auch hier anzuwenden. Die Inkubation junger und alter Chondrozyten mit subletalen H₂O₂-Konzentrationen von 75-100 µM hingegen führte übereinstimmend mit Literaturangaben zu einer Induktion der Seneszenz-assoziierten Morphologie, wobei der Unterschied zur Kontrollgruppe bei alten Zellen deutlicher ausgeprägt war.¹³² Auch dieses Ergebnis impliziert eine verminderte oxidative Toleranz alter Chondrozyten. Übereinstimmende Ergebnisse wurden auch bei MSCs gefunden.¹³³ Die veränderte Morphologie lässt somit keine Rückschlüsse auf die Genese der Seneszenz zu.

5.3 Diskussion der SA-β-Galaktosidase-Aktivität

Ein weit verbreiteter Marker der Seneszenz ist die Detektion der SA-β-Galaktosidaseaktivität. *Dimri et al.* zeigten 1995 an Fibroblasten und Keratinozyten humaner Hautbiopsien, dass lediglich seneszente Zellen im Gegensatz zu jungen oder terminal differenzierten Zellen eine β-Galaktosidase

exprimieren, die bei einem pH=6 histochemisch detektierbar ist (SA- β -Galaktosidase) und so als Seneszenznachweis *in vitro* und *in vivo* dient.³¹ Auch wenn sich in der Folge herausstellte, dass die SA- β -Galaktosidase die lysosomale β -Galaktosidase mit einem pH-Optimum von 4,5 ist¹³⁹ und weder für die Entstehung der Seneszenz ursächlich, noch wirklich seneszenzspezifisch ist, sondern vermutlich auf der Anhäufung von Autophagosomen¹⁴⁰ und somit lysosomalen Kompartimenten in der Zelle beruht,¹⁴¹ hat der Aktivitätsnachweis aufgrund der einfachen Anwendbarkeit und Verlässlichkeit nach wie vor einen hohen Stellenwert in der Wissenschaft. Der detektierbare Aktivitätsanstieg der SA- β -Galaktosidase findet sich sowohl bei der replikativen Seneszenz nach einer gewissen Anzahl von mitotischen Zellteilungen, als auch als Antwort auf unterschiedliche Stressoren im Rahmen der Stress-induzierten prämaturnen Seneszenz und erklärt den Einsatz als universeller Seneszenzmarker.^{31, 90, 130} Die Methode mit der weitesten Verbreitung zur Detektion der SA- β -Galaktosidase ist die enzymatische Spaltung des chromogenen Substrats 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) bei einem pH=6, das zu einer Blaufärbung seneszenter Zellen führt. Bei der Färbung ist zur Vermeidung falsch-positiver Befunde vor allem auf eine subkonfluente Zellkultur zu achten.¹⁴²

Zu Beginn unserer Versuche waren weitestgehend alle Zellen jedes Donors SA- β -Galaktosidase negativ, unabhängig vom Alter der Spender. Dies steht entgegen den Ergebnissen von *Dimri et al.* bei humanen Fibroblasten und Keratinozyten, die einen Aktivitätsanstieg der SA- β -Galaktosidase in Abhängigkeit des Spenderalters feststellen konnten.³¹ Doch gerade die *in vivo* Anwendung bzw. Validität der SA- β -Galaktosidase-Aktivität zur Seneszenzbestimmung ist stark umstritten.¹⁴² Studien an Chondrozyten zeigten einerseits eine direkte Korrelation der SA- β -Galaktosidase-Expression mit dem Spenderalter,⁴ andere Ergebnisse legen eine Korrelation der Aktivität mit dem Krankheitsgrad der Arthrose und nicht dem Patientenalter nahe.¹⁴³

Über die Dauer der Zellkultur zeigte sich eine deutliche Zunahme blauer Zellen als Zeichen der eingetretenen Seneszenz, bis in den letzten Passagen sowohl der Kontroll- als auch der chronisch oxidativen Stressgruppe mehr als 90% der Chondrozyten eine positive X-Gal-Färbung zeigten. Diese Ergebnisse stützen die Bedeutung der SA- β -Galaktosidase-Bestimmung als Zeichen der Seneszenz *in vitro*, legen allerdings auch nahe, dass die Bestimmung *in vivo* multiplen Einflüssen und somit Störfaktoren unterliegt und eine reine Alters-

abhängigkeit nicht konstatiert werden kann. Unterschiede zwischen der Kontroll- und chronisch oxidativen Stressgruppe zeigten sich in Analogie zu den Beobachtungen bei der Zellproliferation und der Morphologie nicht.

In den Akutversuchen mit subletalen H_2O_2 -Konzentrationen von 75-100 μM für 2 Stunden konnte nach einigen Tagen ein deutlicher Anstieg der SA- β -Galaktosidase-Aktivität als Zeichen der eingetretenen Stress-induzierten prämaturnen Seneszenz (SIPS) in Chondrozyten konstatiert werden. Diese Ergebnisse konnten sowohl an jungen als auch an alten, präseneszenten Chondrozyten nachvollzogen werden. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen Studien.^{133, 144}

Zusammenfassend legen die vorliegenden Daten die Vermutung nahe, dass ein Anstieg der SA- β -Galaktosidase-Aktivität *in vitro* vornehmlich mit Zellzyklusarrest in einer sonst promitogenen Umgebung assoziiert ist.⁸⁶ Unabhängig von der Genese eines Wachstumsstopps – sei es durch replikative oder Stress-induzierte Seneszenz oder auch durch Kontaktinhibition im Rahmen hochkonfluenten Kulturen – findet sich ein Anstieg X-Gal gefärbter Zellen. Beachtet man diese Einschränkung bei der Durchführung der Färbung, ist der hohe Stellenwert der SA- β -Galaktosidase-Aktivität als einfacher und universeller Seneszenzmarker nachvollziehbar und begründet.

5.4 Diskussion der Telomerlänge

Telomere schützen die Enden linearer Chromosomen davor, als Doppelstrangbrüche erkannt zu werden und ermöglichen eine DNA-Replikation ohne Verlust genomischer DNA.¹⁴⁵ Als Folge des semikonservativen Replikationszyklus der linearen DNA mit Hilfe von DNA-Polymerasen, die für die Synthese auf RNA-Primer angewiesen sind und ausschließlich in 5' \rightarrow 3'-Richtung synthetisieren können, geht eine Zellreplikation mit einem Verlust an telomerischer DNA am 5'-Ende einher (End-Replikationsproblem). Aus diesem Grund gilt die Telomerlänge als „Replikometer“ oder eine Art „mitotische Uhr“, die Hinweise auf das Alter der Zelle bzw. das verbleibende Proliferationspotential gibt.¹⁴⁶ In der Tat weisen zahlreiche Studien einen steten Telomerverlust somatischer Zellen in Abhängigkeit der kumulativen Zellverdopplungen nach.^{59, 110}

Olovnikov entdeckte die Telomerverkürzung als molekularbiologische Korrelat des von *Hayflick* beobachteten limitierten Proliferationspotentials humaner diploider Zellen mit dem Endpunkt der replikativen Seneszenz.^{24, 54} Bewiesen

wurde dieser Zusammenhang durch die artifizielle Überexpression von Telomerase – einem Enzym, das durch Synthese der Telomerrepeats TTAGGG in der Lage ist, die Telomere zu verlängern: Eine Transfektion von humanen Fibroblasten und retinalen Pigmentepithelzellen mit hTERT verhinderte eine Telomerverkürzung der Zellen während der *in vitro* Kultivierung und das Eintreten der replikativen Seneszenz.³⁹ Auch immortale Zellen wie Krebszellen oder Keimbahnzellen verfügen mit aktivierter Telomerase oder „alternative lengthening of telomeres“ (ALT) über Mechanismen, die es den Zellen ermöglichen, trotz des End-Replikationsproblems ihre Telomerlänge konstant zu halten. Dass eine suffiziente Telomerlänge dabei eine zwingende Voraussetzung für das unendliche Proliferationspotential ist, zeigt sich nach Inaktivierung der Telomerase bei Telomerase-positiven Tumorzellen: die ehemals immortalen Zellen zeigten einen progredienten Telomerverlust, der schließlich zum Absterben der Zellen führte.^{147, 148} Eine Verkürzung der Telomere auf ein kritisches Level hat sich allgemein als verlässlicher Indikator für das Auftreten von Seneszenz (replikative Seneszenz) oder Zelltod in Abhängigkeit des genetischen Backgrounds der betrachteten Zelle erwiesen und fungiert als protektiver Mechanismus in der Kanzerogenese.²⁷ Doch auch lange, dysfunktionale Telomere¹⁴⁹ oder schädigende Einflüsse wie Bestrahlung,¹⁵⁰ oxidative Schädigung^{95, 122, 144} durch Hyperoxie, H₂O₂ und tert-Butylhydroperoxid oder eine Onkogenaktivierung⁷³ können zelluläre Seneszenz (SIPS) induzieren, die unabhängig von der Telomerlänge ist.²⁹

Die Telomerlänge ist somit mehr als nur ein Zähler mitotischer Zellteilungen aufgrund des End-Replikationsproblems oder der alleinige Induktor von zellulärer Seneszenz, sie unterliegt multiplen internen und externen Einflüssen. Die Regulation der Telomere inklusive ihrer Länge ist ein komplexer Vorgang mit weitreichenden Konsequenzen auf die gesamte Zellbiologie.^{92, 93}

In unseren Versuchen zeigte sich eine negativ lineare Korrelation der Telomerlänge mit den kumulativen Zellverdopplungen, wobei der durchschnittliche Telomerverlust unter Kontrollbedingungen 140 bp/cpd betrug und unter chronisch oxidativem Stresseinfluss mit 219 bp/cpd signifikant höher lag. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur, die einen Telomerverlust humaner somatischer Zellen von 100-200 bp unter Standardkulturbedingungen konstatieren⁵⁹ und einen erhöhten Telomerverlust pro cpd unter chronisch oxidativer Schädigung.^{90, 124, 133, 151} Beachtet man allerdings, dass bereits eine Kultivierung unter Kontrollbedingungen mit „Kulturstress“ und

überphysiologischem Sauerstoffpartialdruck vergesellschaftet ist, überschätzen die beobachteten *in vitro* Ergebnisse sicherlich die *in vivo* auftretenden Telomerverkürzungen aufgrund oxidativer und möglicherweise anderen Schädigungen. Die beobachteten Telomerverkürzungen sind bereits unter Kontrollbedingungen so hoch, dass sie nicht ausschließlich durch das End-Replikationsproblem erklärt werden können.¹⁵¹ Telomer-immanente Charakteristika prädisponieren dabei für oxidative Schädigungen im Vergleich zu genomischer DNA.

Telomere sind mit ihren GGG Sequenzen besonders anfällig für oxidative Schädigung⁹⁴ und zeigen darüber hinaus im Vergleich zur restlichen DNA eine eingeschränkte DNA-Reparaturfähigkeit von Einzelstrangbrüchen.¹⁵² Zwar sind Doppelstrangbrüche in der Lage einen Zellzyklusarrest zu induzieren, um der Zelle Zeit für die Reparatur zu geben,⁹⁰ doch scheinen vor allem Einzelstrangbrüche bei der Verkürzung der Telomere unter chronisch oxidativem Stress eine Rolle zu spielen.¹⁵¹ Die Blockierung der Replikationsgabel durch unreparierte Nukleotide oder Schäden an den Basen wird dabei als – allerdings replikationsabhängige – Ursache des erhöhten Telomerverlusts diskutiert.^{151, 132} Auch eine verminderte Bindungsaffinität der Telomer-regulierenden Proteine TRF1 und TRF2¹⁵³ durch oxidative Schäden oder abasische DNA-Abschnitte mag auch replikationsunabhängig an der erhöhten Verkürzungsrates beteiligt sein. Zusammenfassend sprechen die vorliegenden Daten aus den chronisch oxidativen Stressversuchen mit bereits bekannter Anfälligkeit der telomerischen DNA gegenüber oxidativen Schäden dafür, dass replikative Seneszenz Telomerlängen-abhängig ist, die Telomerlänge aber durch externe Faktoren negativ (ROS) wie positiv (Antioxidantien) beeinflusst werden kann und somit als Resultat von oxidativer Schädigung und antioxidativen Abwehrmechanismen gesehen werden sollte.^{91, 132}

Oxidative Schäden sind allerdings nicht nur an der telomerabhängigen replikativen Seneszenz beteiligt, in höheren subletalen Dosen können ROS auch telomerunabhängige, prämatüre Seneszenz (SIPS) induzieren. Analog zu Fibroblasten⁷⁴ zeigte sich auch bei Chondrozyten im Rahmen unser akuten subletalen Stressversuche 24 h nach H₂O₂-Exposition keine signifikante Telomerlängenveränderung trotz der Entwicklung von Seneszenz-assoziierten Morphologieveränderungen, SA-β-Galaktosidasepositivität und einem weitestgehenden Proliferationsarrest. Nach einer weiteren 4-wöchigen Subkultivierung der subletal gestressten Chondrozyten fand sich hingegen ein signi-

fikanter Telomerverlust im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis kann dahingehend interpretiert werden, dass einige wenige Zellen, die aufgrund ihrer antioxidativen Abwehrkapazität den Eintritt in die Seneszenz verhindern konnten, kompensatorisch vermehrt proliferierten und in Verbindung mit bestehenden oxidativen Telomerschäden für den beobachteten Telomerverlust verantwortlich sind. Diese Sichtweise erfordert somit Zellreplikation oder Endoreduplikation¹⁵⁴ als erforderliche Grundlage für die Telomerverkürzung.¹³² Andererseits ist nicht auszuschließen, dass nach Induktion der Stress-induzierten prämaturnen Seneszenz durch subletale H₂O₂-Konzentrationen auch in Chondrozyten ein positiver Verstärkerkreis mit prolongierter, erhöhter intrazellulärer ROS-Produktion^{155, 156} an der Aufrechterhaltung der Seneszenz beteiligt ist. Diese könnten auch proliferationsunabhängig – eben bei irreversiblen Zellzyklusarrest im Rahmen der Seneszenz – eine direkte Telomerschädigung hervorrufen.

Zumindest nach einer gewissen Latenzzeit scheinen bei humanen Chondrozyten die Telomerlänge oder eher die Funktionalität der Telomere in der primär Telomer-unabhängigen – oder besser Telomerlängen-unabhängigen – SIPS durch H₂O₂ eine Rolle zu spielen. Es bedarf mit Sicherheit weiterer Studien, um die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der replikativen Seneszenz und der SIPS als Subtypen der zellulären Seneszenz weiter aufzudecken und zu verstehen.

5.5 Diskussion der Genexpression

Ein weiterer Fokus der Arbeit lag auf der Untersuchung des Einflusses von oxidativem Stress auf das Expressionsprofil Telomer-assoziiierter Gene (TRF1, TRF2, XRCC5) und Zellzyklusregulatoren (p21, SIRT1) in jungen und (prä-)seneszenten humanen Chondrozyten.

Die telomere repeat binding factors (TRF) 1 und 2 sind Bestandteile des telomerschützenden Shelterin-Komplexes und an der Ausbildung des charakteristischen t-loops maßgeblich beteiligt.⁴² Während TRF1 die telomerische DNA am Ende der Chromosomen für die erforderliche Schlinge umschlägt,⁴⁶ sorgt TRF 2 durch die Insertion des 3'-Überhangs in den DNA-Doppelstrang für die Ausbildung des d-loops und kontrolliert den Zugang zum 3'-Überhang.⁴⁴ Darüber hinaus kontrollieren TRF 1 und TRF 2 – möglicherweise durch sterische Hinderung – den Zugang der Telomerase und sind auf diese Weise negativ an der Telomerlängenregulation beteiligt.^{157, 158}

In unseren Akutversuchen zeigte sich eine signifikante Steigerung der TRF2 Expression innerhalb der ersten 12 h, wobei junge Zellen ihr Expressionsmaximum früher als alte Chondrozyten erreichten. Anschließend kehrte die Expression wieder auf das Ausgangsniveau zurück. Die TRF1 Expression zeigte keine physiologisch relevanten Änderungen. TRF2-Überexpression zeigte einen protektiven Effekt im Rahmen der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose,¹⁵⁹ und passt auf diese Weise in die Reaktion der Zelle, durch erhöhte Expression von TRF2 dem oxidativen Insult zu begegnen. Trotzdem scheint eine erhöhte Expression die Zelle nicht vor dem Eintritt in die Seneszenz zu schützen.¹⁶⁰ Darüber hinaus schädigt oxidativer Stress neben Proteinen, Lipiden und weiteren Zellbestandteilen vor allem auch telomerische DNA.⁹⁴ Durch eine alterierte telomerische Sequenz vermindert sich die Bindungsaffinität der TRF-Proteine.¹⁵³ Dadurch wird die Integrität des t-loops gefährdet und TRF ist nicht mehr in der Lage, funktionale Telomere zu gewährleisten.⁴⁴ Folglich werden die Chromosomenenden als Doppelstrangbrüche erkannt, die die Aktivierung von DNA-Reperaturmechanismen wie NHEJ zur Folge haben. Schlussendlich werden trotz hoher TRF Expression Signalwege induziert, die in Apoptose oder Seneszenz enden.^{161, 162}

Die Chondrozyten reagierten auf den oxidativen Schaden mit einer erhöhten Expression von TRF2, um vermutlich die verminderte Bindungsaffinität oder die sicherlich auch direkte Schädigung der Proteine mit ihren fatalen Konsequenzen zu kompensieren. Der verspätete Anstieg der Expression in alten Zellen legt hier bereits eine beeinträchtigte oxidative Stressbewältigungskapazität von alten Chondrozyten nahe.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand war das Expressionsprofil des Zellzyklusregulators p21. p21 ist ein Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor, der unter anderem den zytostatischen Effekt des Tumorsupressorproteins p53 vermittelt und ein wichtiges Element in der Entwicklung zellulärer Seneszenz darstellt.^{26, 163} p53 seinerseits steht als zentraler Vermittler der Zelle als Antwort auf unterschiedliche zelluläre Stressreize wie Radiatio, oxidative Schädigung oder dysfunktionale Telomere. p53 reguliert die Transkription verschiedener Zielgene, die Zellzyklusarrest induzieren (p21) und denen eine Rolle in der Seneszenzentstehung, Apoptose und DNA-Reparatur zugesprochen wird.^{164, 165} In unseren Versuchen führte eine subletale oxidative Schädigung der Chondrozyten mit H₂O₂ sowohl in jungen als auch in alten Zellen zu einem signifikanten Expressionsanstieg von p21, der ähnlich auch bei Fibroblasten

nachgewiesen werden konnte.⁷⁴ Das Maximum war mit dem Expressionsniveau in seneszenten Zellen vergleichbar, bevor es wieder auf Werte fiel, die immer noch signifikant über der Kontrollgruppe lagen.

Das Protein des untersuchten Gens SIRT1 beeinflusst direkt den oben skizzierten Ablauf einer Stress-induzierten Antwort der Zelle über p53 und p21. SIRT1 ist eins von sieben beim Menschen bekannten Sirtuinen (SIRT1-SIRT7), die als Charakteristikum alle eine NAD-abhängige katalytische Domäne mit dem namensgebenden und erstmals in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entdeckten Sir2 (silent information regulator 2) teilen.^{166, 167} Sir2 konnte in *Saccharomyces cerevisiae* die Lebensspanne verlängern¹⁶⁸ und auch in Würmern⁶⁷ und Fliegen⁶⁸ konnte ein positiver Effekt der Sirtuine auf die Lebensspanne festgestellt werden. SIRT1 ist dem Sir2 strukturell am ähnlichsten¹⁶⁹ und fungiert mit seiner NAD-abhängigen Deacetylase unter anderem als negativer Regulator von p53.⁶⁶ Auf diese Weise schwächt SIRT1 die Apoptose- und Seneszenz-induzierende Wirkung von p53 und begünstigt das Überleben der Zelle nach akuter Stressexposition^{69, 170, 165} und könnte so auch für Chondrozyten ein wirkungsvoller Mechanismus sein, ungünstige Wachstumsbedingungen und Stress zu bewältigen.^{132, 171} Darüber hinaus scheint eine verminderte SIRT1-Aktivität in Chondrozyten durch Änderung des Expressionsprofils an der Entstehung von Arthrose beteiligt zu sein.¹⁷²

In unseren Versuchen war die SIRT1-Expression nach akut subletaler oxidativer Schädigung sowohl in jungen als auch in alten Zellen erhöht, wobei der Anstieg in jungen Zellen höher ausfiel. Legt man den beschriebenen negativen Regulationseinfluss von SIRT1 auf p53 zu Grunde, spricht dies für eine bessere Stressbewältigungskapazität junger Zellen im Vergleich zu alten Zellen.¹³² Auch ein Arthrose-protektiver Effekt durch höhere SIRT1 Expression in jungen Chondrozyten ist nicht auszuschließen.

Das letzte untersuchte Gen XRCC5 ist involviert in der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (double strand breaks, DSB) und nimmt dadurch eine wichtige Rolle in der Bewältigung von oxidativ induzierten DNA-Schäden und der Prävention von Seneszenz und Apoptose ein. Während H₂O₂ in moderaten Dosen sowohl zu oxidierten Basen, Einzelstrangbrüchen als auch Doppelstrangbrüchen führt, werden bei akut subletalen Dosen vor allem Doppelstrangbrüche in hoher Frequenz als charakteristisches Schadensmerkmal angesehen.¹⁷³ DSB aktivieren in der Zelle eine Schadensantwort (DNA-Damage response, DDR), die bei Persistenz über p53 und p21 den

Eintritt in die Seneszenz bzw. Apoptose vermittelt.^{144, 174} Um dies zu verhindern, müssen die DSB repariert werden. Säugetiere verfügen hierfür über die Mechanismen des „homology directed repair“ (HDR) und des „non-homologous end-joining“ (NHEJ).¹⁷⁵ Bei dem NHEJ werden DSB – zwei Enden linearer DNA-Abschnitte – zusammengeführt und ligiert. Für diesen Vorgang wird in Säugetieren die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) benötigt, die aus einer katalytischen Untereinheit (DNA-PKcs) und einer Ku-Untereinheit besteht.¹⁷⁶ Ku seinerseits ist ein Heterodimer bestehend aus Ku70/Ku80 – wobei das untersuchte Gen XRCC5 die Ku80 Untereinheit kodiert⁴⁹ – und sorgt für die Erkennung der DSB.¹⁷⁷ In der Folge ermöglicht Ku der DNA-PKcs und anderen beteiligten Proteinen den Zugang und die Reparatur des Doppelstrangbruchs.⁵¹ Während man in proliferierenden Zellen eine erhöhte XRCC5-Expression feststellen kann, um die Reparatur von DSBs zu erleichtern, scheint eine sinkende Expression ein Indikator für weitreichende DNA-Schäden und Apoptose zu sein.¹⁷⁸ Der in unseren Versuchen beobachtete Anstieg der XRCC5-Expression ist Hinweis dafür, dass Chondrozyten – ähnlich wie MSCs¹³³ – zur Bewältigung akut oxidativer Schädigung ihr Reparatursystem hochregulieren können.¹³²

Betrachtet man zusammenfassend die Expressionsverläufe der zellprotektiven Gene SIRT1 und XRCC5, spricht der geringere Anstieg in alten Zellen für eine verminderte DNA-Reparatur- und somit Stressbewältigungskapazität im Vergleich zu jungen Zellen.^{130, 132} Ob die Ursache hierfür der oxidative Stress an sich ist oder die Akkumulation von DNA-Schäden verantwortlich ist, kann nicht abschließend geklärt werden. Während junge Zellen nach einem oxidativen Insult noch mit verminderter Rate proliferierten, stellten alte Zellen ihr Wachstum komplett ein. Die Kombination aus DNA-Schäden und verminderter Reparaturkapazität leitet vermutlich den Eintritt in die zelluläre Seneszenz ein, sobald eine gewisse Grenze an kumulativen DNA-Schäden überschritten wurde. Auch die erhöhte p21-Expression in alten Chondrozyten und der Anstieg der p21-Expression nach oxidativer Schädigung auf dazu vergleichbare Werte bestätigen den Einfluss akkumulierender DNA-Schädigung und Telomerverkürzung auf die zelluläre Alterung. p21 scheint daher ein verlässlicher Marker für kumulative DNA-Schädigung und Seneszenz zu sein.¹³²

5.6 Perspektiven

Das Phänomen der Seneszenz gestaltet sich als zunehmend komplexe Aufgabe. Ursprünglich allein mit Hilfe der Telomerbiologie erklärt (replikative Seneszenz), zeigt sich heute die Vielschichtigkeit dieses Themenkomplexes anhand des Einflusses vieler endogener und exogener Stressoren und den immanenten Bewältigungsstrategien der Zellen zur Abwehr dieser Stressoren. Die im Rahmen dieser Arbeit angestoßene Verknüpfung der Genese der Seneszenz von Chondrozyten unter Stress mit Telomer-assoziierten Genen, DNA-Reparaturgenen sowie Zellzyklusregulatoren ist ein weiterer Schritt, die molekularen Mechanismen der Seneszenz aufzudecken. Folgeversuche mit der Berücksichtigung weiterer Gene werden zu einem tieferen Verständnis der Zusammenhänge führen und die Basis für zukünftige interventionelle Ansätze bilden, die Qualität von *in vitro* kultiviertem Knorpelgewebe im Rahmen des Tissue Engineering weiter zu verbessern.

6 Zusammenfassung

Die Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung und führt zu Schmerzen und Bewegungseinschränkung bei den betroffenen Patienten. Die mangelhafte Selbstheilungskapazität des bradytrophen Knorpelgewebes nach (osteo-)chondralen Defekten als präarthrotische Deformität führte zur Entwicklung zahlreicher Behandlungsstrategien in den letzten Jahrzehnten mit vor allem langfristig nicht befriedigenden Ergebnissen. Neueste Ansätze der autologen Chondrozytentransplantation als klinisches Anwendungsgebiet des Tissue Engineering erfordern nach Knorpelbiopsie eine expansive *in vitro* Kultivierung isolierter Chondrozyten, die wie die meisten diploiden Zellen nach einer gewissen Anzahl von Zellteilungen ihre Proliferation einstellen und in das Stadium der zellulären Seneszenz eintreten. Seneszenten Zellen unterscheiden sich in zahlreichen Charakteristika von terminal differenzierten Zellen und sind unter anderem in der Pathogenese altersassoziierter Krankheiten involviert. Oxidativer Stress beeinflusst die Seneszenzentwicklung und die Effekte auf an hypoxische Umgebungsbedingungen adaptierte Chondrozyten sind weitestgehend unbekannt.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Effekte von akut subletaler und chronisch niedrig dosierter Wasserstoffperoxidexposition auf arthrotische Chondrozyten in Bezug auf Proliferationsverhalten, Morphologie, β -Galaktosidaseexpression, Telomerlänge und Expression Telomer-assoziiierter Gene, sowie Regulatoren des Zellzyklus und DNA-Reparaturgene.

Die chronische Applikation von 10 μ M H_2O_2 hatte keinen Einfluss auf Proliferationsverhalten, Morphologie oder β -Galaktosidaseexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. In beiden Gruppen zeigte sich mit zunehmender Kultivierungsdauer eine gleichförmige Entwicklung Seneszenz-assoziiierter Veränderungen: reduziertes Proliferationspotential, vergrößerte, plumpe Zellmorphologie und Zunahme der β -Galaktosidaseexpression. Akut subletaler oxidativer Stress induzierte Zellzyklusarrest, seneszenz-assoziierte morphologische Veränderungen und β -Galaktosidaseexpression. Subletale und chronische Applikation beschleunigten den Telomerverlust, wobei dieser nach akut subletaler Schädigung erst nach einer Latenz von 4 Wochen detektierbar war. Die Effekte von akut subletaler oxidativer Schädigung bezüglich des Proliferationsverhalten und der Telomerbiologie waren in Zellen später Passagen ausgeprägter als in jungen Chondrozyten.

Akut oxidative Schädigung der Chondrozyten führte zu einem Anstieg der p21 Expression auf ein mit seneszenten Zellen vergleichbares Niveau. TRF2 als Bestandteil des Shelterin-Komplexes schützt die Telomerenden und zeigte eine erhöhte Expression als Zeichen der Zellantwort auf den oxidativen Stress. SIRT1 und XRCC5 ermöglicht Zellen, widrige Umgebungsbedingungen zu bewältigen und den Eintritt in die Seneszenz oder Apoptose zu verhindern. deren Expression war nach akut oxidativer Schädigung ebenfalls erhöht, wobei der Anstieg in Zellen später Passagen reduziert war. Zusammenfassend beschleunigte oxidativer Stress den Telomerverlust humaner Chondrozyten und deren Seneszenzentwicklung, wobei Zellen später Passagen eine verringerte Toleranz gegenüber oxidativem Stress konstatiert werden muss.

Literaturverzeichnis

1. Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. 2005. Instr Course Lect 54: 465–480.
2. Madry H, Grün UW, Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. 2011. Dtsch Arztebl Int 108: 669–677.
3. Lützner J, Kasten P, Günther K, Kirschner S. Surgical options for patients with osteoarthritis of the knee. 2009. Nat Rev Rheumatol 5: 309–316.
4. Martin JA, Buckwalter JA. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. 2003. J Bone Joint Surg Am 85-A Suppl 2: 106–110.
5. Schindler OS. Current concepts of articular cartilage repair. 2011. Acta Orthop Belg 77: 709–726.
6. Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. 1995. Clin Orthop Relat Res: 3–6.
7. RKI. 2009. Krankheitskosten. Berlin.
8. Statistisches Bundesamt. 11.08.2010. Krankheitskostenrechnung. Wiesbaden.
9. Chang RW, Falconer J, Stulberg SD, et al. A randomized, controlled trial of arthroscopic surgery versus closed-needle joint lavage for patients with osteoarthritis of the knee. 1993. Arthritis Rheum 36: 289–296.
10. Jackson RW, Dieterichs C. The results of arthroscopic lavage and debridement of osteoarthritic knees based on the severity of degeneration: a 4- to 6-year symptomatic follow-up. 2003. Arthroscopy 19: 13–20.
11. Shannon FJ, Devitt AT, Poynton AR, et al. Short-term benefit of arthroscopic washout in degenerative arthritis of the knee. 2001. Int Orthop 25: 242–245.
12. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. 1986. Arthroscopy 2: 54–69.
13. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. 1959. J Bone Joint Surg Br 41-B: 618–619.
14. Rodrigo J, Steadman JR, Silliman JE, Fulstone AH. Improvement of full thickness chondral defect healing in the human knee after debridement

- and microfracture using continuous passive motion. 1994. *Am J Knee Surg* 4: 109–116.
15. Mithoefer K, Williams RJ, Warren RF, et al. The microfracture technique for the treatment of articular cartilage lesions in the knee. A prospective cohort study. 2005. *J Bone Joint Surg Am* 87: 1911–1920.
 16. Hangody L, Kárpáti Z. New possibilities in the management of severe circumscribed cartilage damage in the knee. 1994. *Magy Traumatol Ortop Kezseb Plasztikai Seb* 37: 237–243.
 17. Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, et al. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. 1997. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 5: 262–267.
 18. Reddy S, Pedowitz DI, Parekh SG, et al. The morbidity associated with osteochondral harvest from asymptomatic knees for the treatment of osteochondral lesions of the talus. 2007. *Am J Sports Med* 35: 80–85.
 19. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. 1994. *N Engl J Med* 331: 889–895.
 20. Angele P, Fritz J. Navigation-guided transfer of cartilage defect geometry for arthroscopic autologous chondrocyte transplantation. 2006. *Orthopedics* 29: S100-103.
 21. Grogan SP, Sovani S, Pauli C, et al. Effects of perfusion and dynamic loading on human neocartilage formation in alginate hydrogels. 2012. *Tissue Eng Part A* 18: 1784–1792
 22. Mithoefer K, Hambly K, Della Villa S, et al. Return to sports participation after articular cartilage repair in the knee: scientific evidence. 2009. *Am J Sports Med* 37 Suppl 1: 167S-176S.
 23. Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. 2000. *Clin Orthop Relat Res*: 212–234.
 24. Hayflick L, Moorhead P. The serial cultivation of human diploid cell strains. 1961. *Exp. Cell Res.* 25: 585–621.
 25. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. 1965. *Exp Cell Res* 37: 614–636.
 26. Ben-Porath I, Weinberg RA. The signals and pathways activating cellular senescence. 2005. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 961–976.

27. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. 2011. *J Cell Biol* 192: 547–556.
28. Beauséjour CM, Krtolica A, Galimi F, et al. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. 2003. *EMBO J* 22: 4212–4222.
29. Campisi J, di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. 2007. *Nat Rev Mo. Cell Biol* 8: 729–740.
30. Blagosklonny MV. Cell cycle arrest is not senescence. 2011. *Aging (Albany NY)* 3: 94–101.
31. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. 1995. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9363–9367.
32. Coppé J, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. 2008. *PLoS Biol* 6: 2853–2868.
33. Coppé J, Patil CK, Rodier F, et al. A human-like senescence-associated secretory phenotype is conserved in mouse cells dependent on physiological oxygen. 2010. *PLoS ONE* 5: e9188.
34. Freund A, Orjalo AV, Desprez P, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. 2010. *Trends Mol Med* 16: 238–246.
35. Leong DJ, Sun HB. Events in articular chondrocytes with aging. 2011. *Curr Osteoporos Rep* 9: 196–201.
36. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. 2009. *Osteoarthr Cartil* 17: 971–979.
37. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. 2008. *Cell* 134: 657–667.
38. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. 2011. *Nature* 479: 232–236.
39. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. 1998. *Science* 279: 349–352.

40. Blackburn EH, Gall JG. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. 1978. *J Mol Biol* 120: 33–53.
41. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. 1988. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 6622–6626.
42. Lange T de. How shelterin solves the telomere end-protection problem. 2010. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75: 167–177.
43. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. 2005. *Nat Rev Genet* 6: 611–622.
44. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. 1999. *Cell* 97: 503–514.
45. Lange T de. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. 2005. *Genes Dev* 19: 2100–2110.
46. Bianchi A, Smith S, Chong L, et al. TRF1 is a dimer and bends telomeric DNA. 1997. *EMBO J* 16: 1785–1794.
47. Stansel RM, Lange T de, Griffith JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. 2001. *EMBO J* 20: 5532–5540.
48. Cosme-Blanco W, Chang S. Dual roles of telomere dysfunction in initiation and suppression of tumorigenesis. 2008. *Exp Cell Res* 314: 1973–1979.
49. Thacker J, Zdzienicka MZ. The mammalian XRCC genes: their roles in DNA repair and genetic stability. 2003. *DNA Repair (Amst.)* 2: 655–672.
50. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K. Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. 2003. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 712–720.
51. Yoo S, Dynan WS. Geometry of a complex formed by double strand break repair proteins at a single DNA end: recruitment of DNA-PKcs induces inward translocation of Ku protein. 1999. *Nucleic Acids Res* 27: 4679–4686.
52. Hsu HL, Gilley D, Galande SA, et al. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. 2000. *Genes Dev* 14: 2807–2812.
53. Palm W, Lange T de. How shelterin protects mammalian telomeres. 2008. *Annu Rev Genet* 42: 301–334.

54. Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. 1973. *J Theor Biol* 41: 181–190.
55. Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. 1972. *Nature New Biol* 239: 197–201.
56. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. 1985. *Cell* 43: 405–413.
57. Campisi J. From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? 2001. *Exp Gerontol* 36: 607–618.
58. Martin JA, Buckwalter JA. Telomere erosion and senescence in human articular cartilage chondrocytes. 2001. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56: B172-179.
59. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. 1990. *Nature* 345: 458–460.
60. Allsopp RC, Chang E, Kashefi-Azham M, et al. Telomere shortening is associated with cell division in vitro and in vivo. 1995. *Exp Cell Res* 220: 194–200.
61. Levy MZ, Allsopp RC, Futcher AB, et al. Telomere end-replication problem and cell aging. 1992. *J Mol Biol* 225: 951–960.
62. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. 1992. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10114–10118.
63. Di d'Adda Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. 2003. *Nature* 426: 194–198.
64. Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, et al. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. 2004. *PLoS Biol* 2: E240.
65. Rodier F, Campisi J, Bhaumik D. Two faces of p53: aging and tumor suppression. 2007. *Nucleic Acids Res* 35: 7475–7484.
66. Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, et al. hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. 2001. *Cell* 107: 149–159.
67. Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. 2001. *Nature* 410: 227–230.
68. Wood JG, Rogina B, Lavu S, et al. Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. 2004. *Nature* 430: 686–689.

69. Vigneron A, Vousden KH. p53, ROS and senescence in the control of aging. 2010. *Aging (Albany NY)* 2: 471–474.
70. Langley E, Pearson M, Faretta M, et al. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. 2002. *EMBO J* 21: 2383–2396.
71. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. 2011. *Cell* 144: 646–674.
72. Martínez P, Blasco MA. Role of shelterin in cancer and aging. 2010. *Aging Cell* 9: 653–666.
73. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. 1997. *Cell* 88: 593–602.
74. Chen QM, Prowse KR, Tu VC, et al. Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. 2001. *Exp Cell Res* 265: 294–303.
75. Fripiat C, Dewelle J, Remacle J, Toussaint O. Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. 2002. *Free Radic Biol Med* 33: 1334–1346.
76. Ogrunc M, di Fagagna F. Never-ageing cellular senescence. 2011. *Eur J Cancer* 47: 1616–1622.
77. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. 1956. *J Gerontol* 11: 298–300.
78. Kirkwood TB, Kowald A. Network theory of aging. 1997. *Exp Gerontol* 32: 395–399.
79. Rosen DR. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. 1993. *Nature* 364: 362.
80. Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. 1993. *Nature* 364: 535–537.
81. Parker WD, Boyson SJ, Parks JK. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. 1989. *Ann Neurol* 26: 719–723.
82. Mårtensson J, Steinherz R, Jain A, Meister A. Glutathione ester prevents buthionine sulfoximine-induced cataracts and lens epithelial cell damage. 1989. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 8727–8731.
83. Tavakoli S, Asmis R. Reactive Oxygen Species and Thiol Redox Signaling in the Macrophage Biology of Atherosclerosis. 2012. *Antioxidants & redox signaling*.

84. Altindag O, Erel O, Aksoy N, et al. Increased oxidative stress and its relation with collagen metabolism in knee osteoarthritis. 2007. *Rheumatol Int* 27: 339–344.
85. Gibson JS, Milner PI, White R, et al. Oxygen and reactive oxygen species in articular cartilage: modulators of ionic homeostasis. 2008. *Pflugers Arch* 455: 563–573.
86. Meyer M. Zelluläre Seneszenz mesenchymaler Stammzellen unter oxidativem Stresseinfluss. 2011. Dissertation Universität Regensburg.
87. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. 2005. *Cell* 120: 483–495.
88. Packer L, Fuehr K. Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. 1977. *Nature* 267: 423–425.
89. Zglinicki T von, Saretzki G, Döcke W, Lotze C. Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? 1995. *Exp Cell Res* 220: 186–193.
90. Duan J, Zhang Z, Tong T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. 2005. *Int J Biochem Cell Biol* 37: 1407–1420.
91. Houben JMJ, Moonen HJJ, van Schooten FJ, Hageman GJ. Telomere length assessment: biomarker of chronic oxidative stress? 2008. *Free Radic Biol Med* 44: 235–246.
92. Saretzki G, Zglinicki T von. Replicative aging, telomeres, and oxidative stress. 2002. *Ann N Y Acad Sci* 959: 24–29.
93. Zglinicki T von, Petrie J, Kirkwood TBL. Telomere-driven replicative senescence is a stress response. 2003. *Nat Biotechnol* 21: 229–230.
94. Kawanishi S, Oikawa S. Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. 2004. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1019: 278–284.
95. Chen Q, Ames BN. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. 1994. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4130–4134.
96. Chen J, Ozanne SE, Hales CN. Methods of cellular senescence induction using oxidative stress. 2007. *Methods Mol Biol* 371: 179–189.
97. Lee AC, Fenster BE, Ito H, et al. Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. 1999. *J Biol Chem* 274: 7936–7940.

98. Lapointe J, Hekimi S. When a theory of aging ages badly. 2010. *Cell Mol Life Sci* 67: 1–8.
99. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. 2011. *Free Radic Biol Med* 51: 327–336.
100. Ramakrishnan P, Hecht BA, Pedersen DR, et al. Oxidant conditioning protects cartilage from mechanically induced damage. 2010. *J Orthop Res* 28: 914–920.
101. Malda J, Martens DE, Tramper J, et al. Cartilage tissue engineering: controversy in the effect of oxygen. 2003. *Crit Rev Biotechnol* 23: 175–194.
102. Lu T, Finkel T. Free radicals and senescence. 2008. *Exp Cell Res* 314: 1918–1922.
103. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *J Mol Biol* 98: 503–517.
104. Southern E. Southern blotting. 2006. *Nat Protoc* 1: 518–525.
105. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. 1997. *Clinical Cancer Research* 3: 1931–1941.
106. Brandl A. Replikative Seneszenz humaner Chondrozyten und mesenchymaler Progenitorzellen während der in vitro Expansion. 2005. Dissertation Universität Regensburg.
107. Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, et al. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. 1985. *Gene* 35: 249–258.
108. Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC. Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. 1986. *DNA* 5: 271–279.
109. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. 2001. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
110. Brandl A, Angele P, Roll C, et al. Influence of the growth factors PDGF-BB, TGF-beta1 and bFGF on the replicative aging of human articular chondrocytes during in vitro expansion. 2010. *J Orthop Res* 28: 354–360.
111. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. 1982. *Cell* 30: 215–224.

112. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. 2005. *J Orthop Res* 23: 425–432.
113. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. 1995. *Bioessays* 17: 1039–1048.
114. Rajpurohit R, Koch CJ, Tao Z, et al. Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism. 1996. *J Cell Physiol* 168: 424–432.
115. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? 2005. *Osteoarthr Cartil* 13: 643–654.
116. Nevo Z, Beit-Or A, Eilam Y. Slowing down aging of cultured embryonal chick chondrocytes by maintenance under lowered oxygen tension. 1988. *Mech Ageing Dev* 45: 157–165.
117. Murphy CL, Polak JM. Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. 2004. *J Cell Physiol* 199: 451–459.
118. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. 2005. *Cell* 120: 513–522.
119. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, et al. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 30: 2–12.
120. Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, et al. Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. 2009. *Curr Stem Cell Res Ther* 4: 318–329.
121. Campbell CJ. The healing of cartilage defects. 1969. *Clin Orthop Relat Res* 64: 45–63.
122. Moussavi-Harami F, Duwayri Y, Martin JA, et al. Oxygen effects on senescence in chondrocytes and mesenchymal stem cells: consequences for tissue engineering. 2004. *Iowa Orthop J* 24: 15–20.
123. Martin JA, Mitchell CJ, Klingelhutz AJ, Buckwalter JA. Effects of telomerase and viral oncogene expression on the in vitro growth of human chondrocytes. 2002. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57: B48-53.
124. Parrinello S, Samper E, Krtolica A, et al. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. 2003. *Nat Cell Biol* 5: 741–747.

125. Ramirez RD, Morales CP, Herbert BS, et al. Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. 2001. *Genes Dev* 15: 398–403.
126. Kaji K, Ohta T, Horie N, et al. Donor age reflects the replicative lifespan of human fibroblasts in culture. 2009. *Hum Cell* 22: 38–42.
127. Cristofalo VJ, Allen RG, Pignolo RJ, et al. Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. 1998. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10614–10619.
128. Schrobback K, Klein TJ, Crawford R, et al. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. 2011. *Cell Tissue Res*.
129. Tchirkov A, Lansdorp PM. Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. 2003. *Hum Mol Genet* 12: 227–232.
130. Toussaint O, Medrano EE, Zglinicki T von. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. 2000. *Exp Gerontol* 35: 927–945.
131. Turrens JF, Freeman BA, Crapo JD. Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. 1982. *Arch Biochem Biophys* 217: 411–421.
132. Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, et al. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. 2011. *J Orthop Res* 29: 1114–1120.
133. Brandl A, Meyer M, Bechmann V, et al. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. 2011. *Exp Cell Res* 317: 1541–1547.
134. Yudoh K, van Nguyen T, Nakamura H, et al. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. 2005. *Arthritis Res Ther* 7: R380-391.
135. Abbott J, Holtzer H. The loss of phenotypic traits by differentiated cells. The reversible behavior of chondrocytes in primary cultures. 1966. *J Cell Biol* 28: 473–487.
136. Huch K, Stöve J, Puhl W, Günther K. Vergleichender Überblick über Verfahren zur Kultivierung artikulärer Chondrozyten. 2002. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 140: 145–152.

137. Campisi J. Replicative senescence: an old lives' tale? 1996. *Cell* 84: 497–500.
138. Frippiat C, Chen QM, Zdanov S, et al. Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts. 2001. *J Biol Chem* 276: 2531–2537.
139. Lee BY, Han JA, Im JS, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. 2006. *Aging Cell* 5: 187–195.
140. Gerland L, Peyrol S, Lallemand C, et al. Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. 2003. *Exp Gerontol* 38: 887–895.
141. Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. 2000. *J Cell Sci* 113 (Pt 20): 3613–3622.
142. Severino J, Allen RG, Balin S, et al. Is beta-galactosidase staining a marker of senescence in vitro and in vivo? 2000. *Exp Cell Res* 257: 162–171.
143. Price JS, Waters JG, Darrah C, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. 2002. *Aging Cell* 1: 57–65.
144. Dumont P, Burton M, Chen QM, et al. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. 2000. *Free Radic Biol. Med* 28: 361–373.
145. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. 1991. *Nature* 350: 569–573.
146. Hayflick L. The illusion of cell immortality. 2000. *Br. J. Cancer* 83: 841–846.
147. Campisi J, Kim SH, Lim CS, Rubio M. Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. 2001. *Exp Gerontol* 36: 1619–1637.
148. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. 1999. *Nat Med* 5: 1164–1170.
149. van Steensel B, Smogorzewska A, Lange T de. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. 1998. *Cell* 92: 401–413.
150. Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, et al. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature

- senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. 2005. *J Cell Sci* 118: 743–758.
151. Zglinicki T von. Oxidative stress shortens telomeres. 2002. *Trends Biochem Sci* 27: 339–344.
152. Petersen S, Saretzki G, Zglinicki T von. Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. 1998. *Exp Cell Res* 239: 152–160.
153. Opresko PL, Fan J, Danzy S, et al. Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. 2005. *Nucleic Acids Res* 33: 1230–1239.
154. Chang BD, Broude EV, Fang J, et al. p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. 2000. *Oncogene* 19: 2165–2170.
155. Passos JF, Nelson G, Wang C, et al. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. 2010. *Mol Syst Biol* 6: 347.
156. Sahin E, Colla S, Liesa M, et al. Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. 2011. *Nature* 470: 359–365.
157. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. 2000. *Mol Cell Biol* 20: 1659–1668.
158. van Steensel B, Lange T de. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. 1997. *Nature* 385: 740–743.
159. Oh H, Wang SC, Prahsh A, et al. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. 2003. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 5378–5383.
160. Zhang Y, Cao E, Qin J. Up-regulation of telomere-binding TRF1, TRF2 related to reactive oxygen species induced by As(2)O(3) in MGC-803 cells. 2005. *Eur J Pharmacol* 516: 1–9.
161. Takai H, Smogorzewska A, Lange T de. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. 2003. *Curr Biol* 13: 1549–1556.
162. Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, et al. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. 1999. *Science* 283: 1321–1325.
163. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. 1997. *Science* 277: 831–834.

164. Pruitt KD, Tatusova T, Klimke W, Maglott DR. NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. 2009. *Nucleic Acids Res* 37: D32.
165. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. 2007. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 275–283.
166. North BJ, Verdin E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. 2004. *Genome Biol* 5: 224.
167. Imai S, Johnson FB, Marciniak RA, et al. Sir2: an NAD-dependent histone deacetylase that connects chromatin silencing, metabolism, and aging. 2000. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65: 297–302.
168. Kaeberlein M, McVey M, Guarente L. The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. 1999. *Genes Dev* 13: 2570–2580.
169. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. 2000. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 793–798.
170. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. 2001. *Cell* 107: 137–148.
171. Alcendor RR, Gao S, Zhai P, et al. Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. 2007. *Circ Res* 100: 1512–1521.
172. Fujita N, Matsushita T, Ishida K, et al. Potential involvement of SIRT1 in the pathogenesis of osteoarthritis through the modulation of chondrocyte gene expressions. 2011. *J Orthop Res* 29: 511–515.
173. Passos JF, Saretzki G, Zglinicki T von. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? 2007. *Nucleic Acids Res* 35: 7505–7513.
174. Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. 2003. *Nat Rev Cancer* 3: 155–168.
175. Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. 2007. *DNA Repair (Amst.)* 6: 923–935.
176. Smith GC, Divecha N, Lakin ND, Jackson SP. DNA-dependent protein kinase and related proteins. 1999. *Biochem Soc Symp* 64: 91–104.
177. Downs JA, Jackson SP. A means to a DNA end: the many roles of Ku. 2004. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 367–378.

178. Shackelford DA, Tobaru T, Zhang S, Zivin JA. Changes in expression of the DNA repair protein complex DNA-dependent protein kinase after ischemia and reperfusion. 1999. *J Neurosci* 19: 4727–4738.

Danksagung

Mein erster Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Michael Nerlich für die Überlassung dieses überaus interessanten und aktuellen Themas. Über sein stetig gezeigtes Interesse und die ermöglichte Teilnahme an Forschungswochenenden habe ich mich sehr gefreut.

Ebenfalls ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Angele für die freundliche Diskussionsbereitschaft bei sämtlichen inhaltlichen Fragestellungen. Seine weitreichenden Erfahrungen auf dem Gebiet des Tissue Engineering waren stets wertvoll und seine Unterstützung ermöglichten mir einen äußerst lehrreichen und interessanten Forschungsaufenthalt in San Diego.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Anita Breu, die durch ihre exzellente Betreuung diese Doktorarbeit erst möglich gemacht hat. Von ihrem Engagement im Labor bis zur Korrektur des Manuskripts stand sie mit ihrer Hilfsbereitschaft stets schnell und unkompliziert zur Seite und verbreitete auch bei Rückschlägen immerwährend Optimismus.

Ich danke den Mitarbeitern im Labor der Abteilung für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg für das hervorragende Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft. Besonders herausheben möchte ich dabei Frau Daniela Drenkard und Herrn Dr. Richard Kujat, die weit über ihre Dienstzeit hinaus bei unterschiedlichsten Problemen und Fragestellungen mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonders persönlicher Dank geht an meine Eltern Gerti und Christian Hartmann sowie meine Schwester Sandra Wagner für ihre bedingungslose Unterstützung und Gesprächsbereitschaft. Meiner Tante Hedi Hartmann und meinem Onkel Karl-Heinz Hartmann spreche ich weit über ihre Gastfreundschaft hinaus meinen aufrichtigsten Dank aus.

Zu guter Letzt bedanke ich mich vielmals bei meinen Mitstreitern in der Forschungsgruppe Seneszenz – Frau Katharina Sprinzing, Herrn Benedikt Sprinzing und Herrn Dr. Matthias Meyer. Die rege Diskussions- und Unterstützungsbereitschaft auf freundschaftlicher Basis weit über unsere Labortätigkeiten hinaus bleiben in bester Erinnerung.

Erklärung zur Dissertation

Herr Prof. Dr. med. Peter Angele und Frau Dr. med. Anita Breu haben die Dissertation angeregt und ihre Ausarbeitung überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgender Fachzeitschrift veröffentlicht:

Brandl A, Hartmann A, Bechmann V, Graf B, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in chondrocytes. 2011. J Orthop Res 29: 1114–1120.