

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Christian Rube

**Untersuchung des Einflusses ionisierender Strahlung auf die Expression der
Histonvariante H2A.J in Keratinozyten der präputialen Epidermis**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes 2021

vorgelegt von: Yanick Hippchen

geb. am: 25.09.1987 in Freising

Tag der Promotion: 29.09.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Michael D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Claudia Rübe

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Barbara Niemeyer-Hoth

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Zusammenfassung	5
3	Einleitung	7
3.1	Strahlenbiologie	7
3.1.1	Ionisierende Strahlung	7
3.1.2	Induktion von Strahlenschäden durch den direkten und indirekten Strahleneffekt	8
3.1.3	Zelluläre Strahlenschäden	9
3.1.4	Signaltransduktionskaskade der DNA-Schadensantwort	10
3.1.5	DSB-Reparaturwege	10
3.1.6	Homologe Rekombination	10
3.1.7	Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung	12
3.2	Seneszenz und ihre Formen	13
3.3	Aufbau der Erbinformation	16
3.3.1	Chromatin, Chromosomen, Histone und Histonvarianten	16
3.3.2	H2A.J	19
3.3.3	Proliferationsmarker Ki67	21
3.4	Aufbau der Haut	22
3.4.1	Männliche Vorhaut	25
3.5	Fragestellung	27
4	Material und Methodik	28
4.1	Geräte und Material	28
4.1.1	Geräte	28
4.2	Chemikalien und deren Zusammensetzung	29
4.2.1	Chemikalien	29
4.2.2	Angesetzte Lösungen	31
4.3	Patientenkollektiv	32
4.4	Patientencharakteristika	32
4.4.1	Ausschlusskriterien	33
4.5	Methodik	33
4.5.1	Hautprobenentnahme und Präparation	33
4.5.2	Bestrahlungsplanung und Bestrahlung	34
4.5.3	Fixierung, Einbettung, Ausblockung und Sektionierung	36

Inhaltsverzeichnis

4.5.4	Immunfluoreszenzmarkierung	36
4.5.5	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	37
4.5.6	Auswertung und Statistik	38
5	Ergebnisse	40
5.1	Quantifikation von H2A.J-positiven Keratinozyten	40
5.2	Quantifikation Ki67-positiver Keratinozyten.....	42
5.3	Inverse Korrelation von H2A.J und Ki67.....	44
6	Diskussion	46
6.1	Interpretation der Ergebnisse	46
6.2	Kritische Auseinandersetzung mit der Methodik.....	47
	Präputium als Untersuchungsobjekt	47
6.3	H2A.J-Quantifizierung und die Vergleichbarkeit mit vorausgegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe.....	50
6.4	Klinische Relevanz.....	53
6.5	Zusammenfassende Interpretation.....	54
7	Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen.....	55
7.1	Abbildungsverzeichnis	55
7.2	Tabellenverzeichnis	56
7.3	Literaturverzeichnis.....	57
7.4	Abkürzungsverzeichnis	65
8	Danksagung.....	67
9	Lebenslauf	68

2 Zusammenfassung

Hintergrund: Zelluläre Seneszenz beschreibt den terminalen Proliferationsstopp von weiterhin metabolisch aktiven Zellen, der durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden kann. Dabei spielt Seneszenz eine ambivalente Rolle, da sie einerseits an der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung sowie der Tumorsuppression beteiligt ist und andererseits relevante Prozesse im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses begleitet. Ein möglicher Auslöser prämaturner Seneszenz stellt ionisierende Strahlung dar, deren DNA-schädigende Wirkung im Rahmen der Radiotherapie zur Tumorkontrolle eingesetzt wird. In vorangegangenen Publikationen wurde bereits untersucht, ob durch die Exposition von muriner und humaner Epidermis mit ionisierender Strahlung eine veränderte Expression der Histonvariante H2A.J nachweisbar ist und ob diese mit altersabhängiger Seneszenz assoziiert werden kann. Darüber hinaus zeigten *ex-vivo* Untersuchungen eine Korrelation zwischen H2A.J-Expression und strahleninduzierter Seneszenz in der humanen, abdominalen Epidermis von erwachsenen Probanden. In dieser Arbeit wurde basierend auf den bereits publizierten Ergebnissen untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der veränderten Expression der Histonvariante H2A.J und zellulärer Seneszenz nach der Exposition mit ionisierender Strahlung auch in der infantilen präputialen Epidermis nachweisbar ist.

Material und Methoden: Im Rahmen elektiver Zirkumzisionen wurden 19 Hautproben männlicher Patienten ohne relevante Grunderkrankungen im Alter von 1 - 10 Jahren akquiriert. Die Epidermis wurde mit einer definierten Dosis bestrahlt, anschließend erfolgte die Markierung der Histonvariante H2A.J und proliferations-assoziiertem Ki67 mittels fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern und die Visualisierung der H2A.J- und/oder Ki67-positiver Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes.

Ergebnisse: Die quantitative Analyse der H2A.J- und Ki67-positiven Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es konnte jedoch ein bestrahlungsunabhängiger Anstieg an H2A.J-positiven Zellen, ausgehend vom Stratum germinativum hin zum Stratum granulosum, nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Es konnten kein Zusammenhang zwischen der applizierten Dosis und einer veränderten H2A.J-Expression in seneszenten Zellen der präputialen Epidermis von pädiatrischen Probanden festgestellt werden. Die bestrahlungsunabhängige schichtspezifische Verteilung H2A.J-positiver Zellen könnte ein Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen H2A.J und der Differenzierung von Keratinozyten sein.

Summary

Background: Cellular senescence describes the terminal proliferation arrest of still metabolically active cells, which can be triggered by a variety of stimuli. Senescence plays an ambivalent role, as it is involved in embryonic development, wound healing and tumor suppression on the one hand and accompanies relevant processes in the physiological aging process on the other hand. A possible trigger of premature senescence is ionizing radiation, whose DNA-damaging effect is used in radiotherapy for tumor control. Previous publications have investigated whether exposure of murine and human epidermis to ionizing radiation results in altered expression of the histone variant H2A.J and whether this can be associated with age-related senescence. Furthermore, *ex-vivo* studies showed a correlation between H2A.J expression and radiation-induced senescence in the human abdominal epidermis of adult volunteers. In this work, based on the previously published results, we investigated whether a correlation between altered expression of the histone variant H2A.J and cellular senescence after exposure to ionizing radiation is also detectable in infantile preputial epidermis.

Material and Methods: Nineteen skin samples from male patients without relevant underlying diseases aged 1 - 10 years were acquired during elective circumcisions. The epidermis was irradiated with a defined dose, followed by labeling of histone variant H2A.J and proliferation-associated Ki67 using fluorescence-coupled antibodies and visualization of H2A.J- and/or Ki67-positive cells using a fluorescence microscope.

Results: Quantitative analysis of H2A.J- and Ki67-positive cells revealed no significant difference compared with the control group. However, an irradiation-independent increase of H2A.J-positive cells, starting from the stratum germinativum to the stratum granulosum, could be detected.

Conclusion: No correlation between the applied dose and altered H2A.J expression in senescent cells of the preputial epidermis of pediatric subjects could be detected. The irradiation-independent layer-specific distribution of H2A.J-positive cells may indicate a possible link between H2A.J and keratinocyte differentiation.

3 Einleitung

3.1 Strahlenbiologie

Die Strahlenbiologie befasst sich mit der Induktion und Reparatur strahleninduzierter Schäden und den daraus resultierenden biologischen und biochemischen Auswirkungen auf lebende Zellen und Gewebe. Die Korrelation zwischen applizierter Bestrahlungsdosis und zellulärer Auswirkung, sowie das Erforschen und Verstehen der DNA-Reparaturprozesse stellen bedeutende Beiträge der radiobiologischen Grundlagenforschung dar [98]. Ihr Verständnis ist fundamental für die klinische Anwendung und Optimierung strahlenbasierter Therapieansätze der Radiotherapie [45], die fester Bestandteil moderner multimodaler Behandlungskonzepte ist.

3.1.1 Ionisierende Strahlung

Als ionisierende Strahlung (engl.: ionizing radiation, IR) wird Teilchen- (α -, β -Strahlung) und elektromagnetische Strahlung (Röntgen-, γ -Strahlung) bezeichnet, die ausreichend energiereich ist, um Elektronen aus Atomen zu lösen. Die hierbei entstehenden Sekundärelektronen verursachen durch weitere Energieübertragung biologische Schäden und induzieren Veränderungen an (intra-) zellulären Bestandteilen. Ionisierende Strahlung erzeugt somit durch das Herauslösen oder Aufnehmen von einem oder mehreren Elektronen (= Sekundärelektronen) aus einem ursprünglich neutralen Atom oder Molekül ein positiv oder negativ geladenes Ion. Dieser Vorgang wird als Ionisation bezeichnet und ist bei γ - und Röntgenstrahlung mit ausreichend hoher Energie durch Photo-, Compton- und Paarbildungs-Effekte bedingt [43,98]. Die absorbierte Energie bezogen auf die Masse biologischen Gewebes wird als Energiedosis ($D = \text{J/kg}$) bezeichnet und in der Einheit Gray [Gy] angegeben. Die Wirkung von ionisierender Strahlung auf Gewebe und Zellen wird durch die relative biologische Wirksamkeit (RBW) beschrieben. Die RBW wird durch die Art der Strahlung, die Dosisleistung (Dosis pro Zeit), die örtliche Dosisverteilung (Größe des Strahlenfeldes) und den linearen Energietransfer (LET; Ionisationsdichte) beeinflusst. Die Äquivalentdosis ($H = \text{J/kg}$) ist ein Maß für die biologische Wirkung einer Exposition hinsichtlich stochastischer Strahlenrisiken unter Berücksichtigung der Strahlenart. Die Berechnung der Äquivalentdosis und Wichtung der Strahlenart anhand ihrer biologischen Wirksamkeit erfolgt durch Multiplikation der Energiedosis [Gy] mit einem dimensionslosen Faktor. Die Äquivalentdosis wird in der Einheit Sievert [Sv] angegeben. Die Exposition gegenüber stochastischer Strahlenrisiken auf den menschlichen Körper wird durch die effektive Strahlendosis ($E = \text{J/kg}$) beschrieben. Die effektive Dosis berücksichtigt die variierende

Einleitung

Zusammensetzung einzelner Gewebe und deren unterschiedliche Strahlungsempfindlichkeiten. Die Berechnung erfolgt durch die Multiplikation der jeweiligen Organ-Äquivalent-Dosis mit dem dimensionslosen Gewebe-Wichtungsfaktor. Der Gewebe-Wichtungsfaktor gibt die jeweilige Empfindlichkeit verschiedener Gewebe gegenüber der stochastischen Strahlenwirkung an. Anschließend addiert man die einzelnen gewichteten Organ-Äquivalent-Dosen und erhält die effektive Dosis die in der Einheit Sievert [Sv] angegeben wird. [2,30,43].

3.1.2 Induktion von Strahlenschäden durch den direkten und indirekten Strahleneffekt

Trifft ionisierende Strahlung auf biologische Materie hat dies Energieübertragungsprozesse zur Folge, die in direkte und indirekte Strahleneffekte unterteilt werden. Als exponiertes Ziel solcher Effekte gilt der Zellkern mit darin enthaltender DNA (Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid), aber auch andere Makromoleküle der Zelle wie Proteine, Lipide und Polysaccharide können verändert werden (siehe Abbildung 1). Bei der direkten Strahlenwirkung erfolgt die Schädigung von Molekülen direkt durch die freigesetzten Elektronen. Dies ereignet sich häufig bei Teilchenstrahlung mit hohem linearen Energietransfer (LET) wie z.B. α -Strahlung. Der LET beschreibt die Anzahl an Ionisationen (übertragene Energie) pro zurückgelegter Wegstrecke [keV/ μ m]. Bei locker ionisierender Strahlung mit niedrigem LET kollidieren Sekundärelektronen überwiegend mit Wassermolekülen. Die Energieübertragung führt zur Radiolyse des intrazellulären Wassers, wodurch Ionen, Radikale und Peroxide entstehen, die wiederum durch strahlenchemische Reaktionen DNA-Schäden induzieren [30,43,98]. Die in dieser Arbeit verwendete Photonenstrahlung wird der locker ionisierenden Strahlung mit niedrigem LET zugeordnet, weshalb molekulare Schäden überwiegend durch den indirekten Strahleneffekt induziert werden.

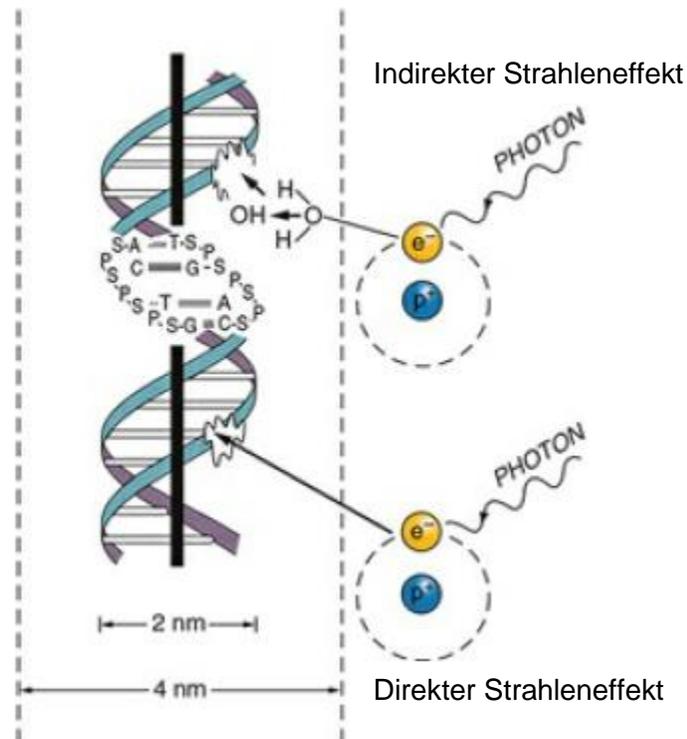


Abbildung 1: Veranschaulichung des direkten und indirekten Strahleneffekts. Das Photon überträgt seine Energie auf das Elektron und löst dieses aus seiner Schale. Trifft das Elektron auf Wassermoleküle in örtlicher Nähe der DNA (oben), kommt es durch Radiolyse zur Entstehung von freien Radikalen und Peroxiden, die mit DNA-Molekülen interagieren können. Da das Elektron nicht direkt mit DNA interferiert, wird dieser Vorgang als indirekter Strahleneffekt bezeichnet. Trifft das Elektron direkt auf die DNA (unten) kommt es durch Energieübertragungsprozesse zum direkten Strahleneffekt. (modifiziert nach Hall EJ, Giaccia AJ, Radiobiology for the Radiologist, 2016)

3.1.3 Zelluläre Strahlenschäden

Durch den direkten und indirekten Strahleneffekt werden, in Abhängigkeit von der Dosis, eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Schäden induziert. Hierbei stellen Basenschäden und Läsionen am Zucker-Phosphat-Rückgrat die häufigste Schadensform dar, gefolgt von Einzelstrangbrüche (SSBs). Doppelstrangbrüche (DSBs) und DNA-DNA-Crosslinks sind hingegen seltener im biomolekularen Schadenmuster vorzufinden. Während Basenschäden und SSBs in der Regel effizient repariert werden und so kaum Relevanz in Bezug auf das Überleben der einzelnen Zelle zu haben scheinen, schwächen insbesondere fehlerhaft reparierte oder irreparable DSBs in hohem Maße die strukturelle Integrität der Chromosomen und können neben dem Zelltod auch Mutationen und Chromosomenaberrationen bedingen [30,43,95,96,98].

3.1.4 Signaltransduktionskaskade der DNA-Schadensantwort

Die fehlerfreie Weitergabe von Erbinformationen an die Folgegeneration ist essenziell für den Fortbestand einer Spezies. Damit eine fehlerfreie Transmission gewährleistet werden kann, müssen DNA-Läsionen identifiziert und Schadensantworten initiiert werden [7,38]. Um die DNA-Schadensantwort auszulösen ist ein initiierendes Signal erforderlich. Diese Schadenssignale können, neben der DNA-Läsion selbst, Chromatinveränderungen sein, die aufgrund der DNA-Läsion entstehen. Das primäre Signal wird von Sensorproteinen detektiert, durch Transduktoren verstärkt und führt anschließend über Phosphorylierungen zur Aktivierung von Effektoren. Zu den Sensorproteinen zählen neben dem MRN-Komplex, bestehend aus MRE11 (Meiotic recombination protein 11), NBS1 (Nijmegen breakage syndrome 1) und Rad50 (Teil der structural maintenance of chromosome protein family), der Rad17-RFC-Komplex (Replication factor C) sowie der Rad9-Rad1-Hus1-Komplex [48,67,68]. Serin-/Proteinkinasen der Phosphatidyl-inositol-3 Kinase-ähnlichen Kinasen (PIKKs) wie ATM (Ataxia telangiectasia mutated protein), ATR (ATM and Rad3-related protein) und DNA-PK (DNA dependent protein kinase) [84] gehören zu den Transduktoren, die über Phosphorylierungen die zu den Effektoren zählenden Zellzyklusinhibitoren und DNA-Reparaturproteine aktivieren.

3.1.5 DSB-Reparaturwege

Die Reparatur von DSBs erfolgt in eukaryotischen Zellen über zwei Reparaturwege, die sich sowohl im Ablauf als auch im Zeitpunkt der Zellzyklusphase unterscheiden: die Homologe Rekombination (HR) und die Nicht-homologe-End-zu-End-Verknüpfung (engl.: non-homologous end joining, NHEJ).

3.1.6 Homologe Rekombination

HR ist eine fehlerfreie Reparatur, bei der der defekte DNA-Strang ein homologes Schwester-Chromatid als Kopiervorlage benötigt, um die fehlende Basensequenz zu rekonstruieren. Deshalb kann die Reparatur durch HR ausschließlich während der späten S- und G2-Phase des Zellzyklus erfolgen, da vorab die DNA dupliziert wurde. Beim Auftreten eines DSB wird dieser durch den MRN-Komplex erkannt. Das darin enthaltene MRE11-Protein und weitere Endonukleasen prozessieren die doppelsträngigen DNA-Enden und schaffen einen kurzen einzelsträngigen 3'-Überhang, der durch die Anlagerung des Rekombinationsproteins A (RPA)

Einleitung

stabilisiert und geschützt wird. Es gibt Hinweise darauf, dass ATM durch Phosphorylierung an der Rekrutierung des Brustkrebstumor-Suppressor-protein 1 (engl.: Breast cancer tumor suppressor protein; BRCA1) beteiligt ist, welches sich anschließend an der Bindungsstelle des MRN-Komplexes anlagert. Über BRCA1 wird BRCA2 aktiviert, welches wiederum RAD51 und RAD52 rekrutiert, die die Bildung eines Nukleoproteinfilaments auf dem Einzelstrang katalysieren [30,85,89]. RPA wird durch die Rekombinase RAD51 ersetzt und ist zusammen mit RAD52 (verhindert Abbau durch Exonuklease) und RAD54 (Helikase) an der Stranginvasion mit dem komplementären Strang im unbeschädigten Chromosom beteiligt [8]. Die beiden invasiven Enden dienen als Primer für die DNA-Synthese und bilden x-förmige Strukturen (Holliday junctions). Anschließend wird der fehlende DNA-Abschnitt durch DNA-Polymerase δ [56] ergänzt und durch DNA-Ligase I die Kontinuität wieder hergestellt [30,34]. Mutationen von an HR beteiligten Proteinen können zu Genomintegritätsverlust führen. Konsekutiv können diese Mutationen Karzinogenese initiieren und sogar zu embryonaler Letalität bei Säugetieren [80] führen, was die Relevanz dieser Proteine im Kontext der DSB-Reparatur unterstreicht [81].

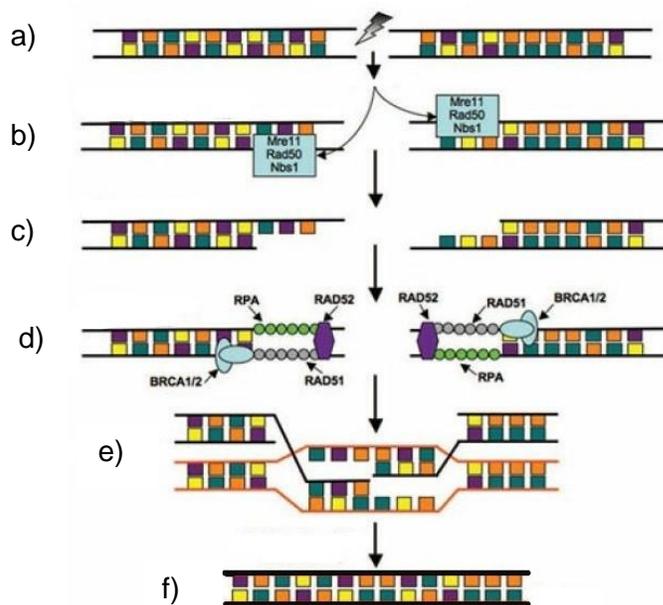


Abbildung 2: Homologe Rekombination: a) Induktion der DNA-Läsion, b) Erkennung der DNA-Läsion und Prozessierung durch MRN-Komplex, c) 5'-3'-Resektion, d) Anlagerung der homologen Rekombinationskomponenten, e) Stranginvasion des homologen Chromatids, f) Strangligation (modifiziert nach Hall EJ & Giaccia AJ, Radiobiology for the Radiologist, 2016)

3.1.7 Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung

Die DSB-Reparatur mittels NHEJ erfolgt im Gegensatz zur HR nicht fehlerfrei, benötigt keine Kopiervorlage und kann dadurch grundsätzlich in jeder Zellzyklus-Phase stattfinden, vorwiegend jedoch in G0 und G1 [12]. Der vorherrschende DSB-Reparaturweg nach Bestrahlung mit ionisierender Strahlung in Säugetierzellen stellt das NHEJ dar, weil sich die Zellen im strahleninduzierten Zellzyklusarrest befinden [13,53]. Unmittelbar nach dem Auftreten eines DSBs bindet die regulatorische Untereinheit der DNA-abhängigen Protein-Kinase (DNA-PK) und der Ku70/Ku80-Heterodimer-Komplex die freien Bruchenden und stabilisiert diese. Anschließend wird die katalytische Untereinheit der DNA-PK (engl.: DNA protein kinase catalytic subunit, DNA-PK_{cs}) rekrutiert und lagert sich mit dem Ku70/Ku80-Heterodimer-Komplex zusammen [38,39]. Durch diese Zusammenlagerung werden die freien DNA-Enden in räumlicher Nähe zueinander stabilisiert und zusätzlich vor Abbau durch Nukleasen und falscher Verknüpfung durch Ligasen geschützt [12,100]. Damit die DNA-Enden wieder ligiert werden können, müssen sie zunächst freigelegt werden. Dies geschieht neben der Autophosphorylierung der an den DNA-Enden gebundenen DNA-PK-Komplexe, auch über Phosphorylierung von ATM. Bevor die DNA-Termini ligiert werden, erfolgt mit Hilfe der DNA-Polymerase μ oder λ eine Ergänzung der Bruchenden. Durch Konformationsänderung des DNA-PK-Komplex lagert sich Artemis-Protein (Endonuklease) und der XRCC4/DNA-Ligase IV-Komplex (XRCC4: X-ray repair cross-complementing protein 4) an und wird aktiviert. Hierbei werden durch 3'-Phosphatase-Aktivität nicht passende DNA-Enden entfernt und durch die DNA-Ligase die prozessierten Bruchenden verknüpft [30,53]. Der XRCC4-like-Faktor (XLF, auch Cernunnos oder Non-homologous end-joining factor 1 genannt) stimuliert die Aktivität der DNA-Ligase und beschleunigt diese [75]. Beim NHEJ handelt es sich im Gegensatz zur HR nicht um eine fehlerfreie Reparatur, weshalb Mikro-Deletionen mit potenziellem Verlust genetischer Informationen auftreten können. Da ein Großteil des humanen Genoms aus nicht-codierenden DNA-Sequenzen besteht, haben Mikro-Deletionen in Bezug auf das Überleben der betroffenen Zellen selten eine Relevanz [50]. Befindet sich hingegen ein nicht oder falsch reparierter DSB innerhalb eines Gens kann diese Mutation Auswirkungen auf den Stoffwechsel und das Zellüberleben haben oder zelluläre Seneszenz triggern.

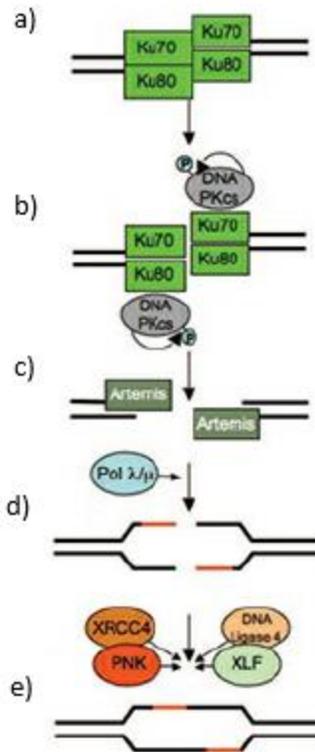


Abbildung 3: Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung: a) Anlagerung des Ku-Komplexes, b) Rekrutierung der PKcs, c) Prozessierung der DNA-Enden durch Endonuklease Artemis, d) Strangsynthese durch DNA-Polymerase, e) Strangligation (modifiziert nach Hall EJ & Giaccia AJ, Radiobiology for the Radiologist, 2016)

3.2 Seneszenz und ihre Formen

Zelluläre Seneszenz beschreibt den terminalen Proliferationstopp der Zellen, der durch eine Vielzahl von Stimuli initialisiert werden kann. Vor mehr als 50 Jahren wurde zum ersten Mal postuliert, dass kultivierte humane Fibroblasten nur begrenzt den Zellzyklus durchlaufen und anschließend in zelluläre Seneszenz übergehen. Diese Beobachtung wurde nach dem Erstbeschreiber als „Hayflick-Limit“ bezeichnet, der als eine Ursache der Seneszenz den physiologischen Alterungsprozess benannte. In der Seneszenz werden Zellen im Zellzyklus arretiert, bleiben jedoch metabolisch aktiv und können so über einen längeren Zeitraum überleben. Es wird vermutet, dass dieser Mechanismus der Unterbindung der Weitergabe von geschädigten Erbinformationen dient, um die Transformation einer physiologischen Zelle in eine entartete Krebszelle zu verhindern. Neben der Tumorsuppression scheint Seneszenz auch eine Relevanz in der embryonalen Entwicklung und der Wundheilung zu besitzen [24]. Die gegensätzliche Funktionen der Seneszenz sollten dabei nicht isoliert, sondern im Kontext der

Einleitung

jeweiligen biologischen Abläufe, als antagonistisch-pleiotrope Vorgänge betrachtet werden [29]. Es gilt senescente von ruhenden Zellen (G0-Phase) zu unterscheiden, die im Gegensatz zu seneszenten Zellen, unter gewissen Voraussetzungen wieder in den regulären Zellzyklus zurückkehren können. Die von Hayflick et al. beschriebene replikative Seneszenz stellt nur eine Form der zellulären Seneszenz dar, bei der die kritische Telomerverkürzung ursächlich für den irreversiblen Proliferationsstopp ist. Telomere sind endständige repetitive DNA-Sequenzen (5'-TTAGGG-3'-Repeats) und damit assoziierte Proteine eukaryotischer Zellen, die den Enden der Chromosomen aufsitzen und diese vor vorzeitigem Abbau schützen [9]. Im Rahmen der DNA-Replikation werden Telomere progressiv verkürzt. Ursächlich dafür ist die Endreplikationsproblematik, die die Unfähigkeit der DNA-Polymerase beschreibt, die letzte RNA-Primer-Position auf dem Folgestrang nach dem Herauslösen der RNA mit DNA aufzufüllen. Diese RNA-Primer werden von der DNA-Polymerase als Startpunkt der Replikation benötigt. Stammzellen können dieses Problem mit Hilfe einer reversen Transkriptase, der Telomerase, lösen. Aufgrund der fehlenden Telomerase-Aktivität in den meisten humanen Zellen, führt jede Zellteilung unweigerlich zu einem Verlust von etwa 50 - 200 Nukleotiden. Erreicht die Zelle nach etwa 30 - 50 Zellteilungen das Hayflick-Limit, wird die kritische Verkürzung der Telomere und das Fehlen von Telomer-maskierenden Proteinen (engl.: telomere capping) von zellulären Sensoren wie ein DNA-Schaden detektiert und die entsprechende DNA-Schadensantwort initiiert [31,60]. Neben der replikativen Seneszenz stellt die prämatüre Seneszenz eine weitere wichtige Form der zellulären Seneszenz dar. Bei dieser Form ist die Akkumulation von DNA-Schäden die treibende Kraft, die durch eine Vielzahl möglicher Stimuli ausgelöst werden kann. Ursächlich können beispielhaft Onkogene, der Verlust von Tumorsuppressorgenen, oxidativer Stress oder ionisierende Strahlung sein. Wie bei allen DNA-Schäden wird die DDR initiiert und der Schaden abhängig vom Ausmaß, wie oben beschrieben, repariert. Übersteigt der gesetzte Schaden die Kapazitäten der Reparaturmechanismen, kann zelluläre Seneszenz initiiert werden. Unabhängig vom jeweiligen Auslöser folgen auf DNA-Schäden in Form von DSBs die Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors 53 (p53). Durch p53 werden Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (engl.: Cyclin-dependent kinase inhibitor; CDKI) wie p15, p16, p21 und p27 transkribiert, die dann über die Bindung an CDK-Cyclin-Komplexen (Komplex aus Cyclin und Cyclin-abhängigen Kinasen) zur Arretierung des Zellzyklus und so zum Proliferationsstopp führen [83].

Neben dem Proliferationsstopp zeichnen sich senescente Zellen durch globale epigenetische Veränderungen aus, die ihren Phänotyp und ihre Funktion beeinflussen. Zu den phänotypischen Modulationen gehören vergrößerte und abgeflachte Zellmorphologie. Funktionell finden sich

Einleitung

Chromatiumlagerungen, DNA-Segmenten mit seneszenzverstärkenden Chromatinveränderungen, die Bildung des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyp (SASP), sowie eine gesteigerte lysosomale Aktivität. Abhängig vom seneszenzauslösenden Initiator und dem Zelltyp ist die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, die sich als SASP zusammenfassen lassen, ein gemeinsames Merkmal seneszenten Zellen [91]. Der SASP dient der Vermittlung hochkomplexer Interaktionen zwischen seneszenten Zellen untereinander und ihrer Umgebung. Durch diese Interaktionen, können verstärkte Immunreaktionen hervorgerufen werden, die die Gewebemöostase beeinflussen und so zur Beeinträchtigung der Organfunktion führen [23,49].

Aufgrund des demographischen Wandels, dem steigenden Anteil älterer Menschen in der Bevölkerung und den damit verbundenen steigenden Inzidenzen altersbedingter Erkrankungen, ist die Erforschung und das Verständnis von Seneszenz in diesem Kontext von relevantem klinischem Interesse. Es konnte gezeigt werden, dass seneszente Zellen neben ihren positiven Eigenschaften wie der Tumorsuppression, der embryonalen Entwicklung und der Wundheilung, auch eine beträchtliche Signifikanz in der Entstehung von altersbedingten Erkrankungen wie Atherosklerose, Alzheimer, Osteoporose sowie prä-malignen Läsionen in Lunge, Pankreas, Prostata und lymphatischem Gewebe zukommt [10,14,16,17,19,61]. Darüber hinaus kann es nach radiotherapeutischer Bestrahlung als mögliche Nebenwirkung zur Akkumulation seneszenten Zellen in der Haut kommen, die sich durch Hautfibrose und Ulzerationen äußert [94]. Damit könnte die Entwicklung und Etablierung von senolytischen Therapien, neben der Behandlung von altersbedingten Erkrankungen, eine Erweiterung des onkologischen Therapiespektrums bedeuten.

Zur Detektion seneszenten Zellen bediente man sich bislang etablierten Biomarkern, wie der seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase (SA- β -Gal), der Expression der cyclin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitors p16^{INK4a} oder dem inversen Verhältnis von zellzyklus-assoziiertem Ki67-Antikörpern zu seneszenten Zellen. Weder die einzelnen Marker noch ihre Kombination konnten seneszente Zellen zufriedenstellend in den verschiedenen Stadien und Geweben nachweisen. Mit der kürzlich beschriebenen Histonvariante H2A.J steht erstmals ein potentieller molekularer Marker der zellulären Seneszenz zur Verfügung [20].

3.3 Aufbau der Erbinformation

3.3.1 Chromatin, Chromosomen, Histone und Histonvarianten

Bereits 1874 wurden von Friedrich Miescher „basische Proteine“ beschrieben, denen Albrecht Knossel später den Namen Histone gab. Er bereitete damit das Fundament für Forschungsarbeiten, die maßgeblich zum heutigen Verständnis auf dem Gebiet der Histone und ihren komplexen Funktionen beitrugen [70].

Die Erbinformation von Eukaryonten wird in Form der DNA mit etwa 3,2 Milliarden Basenpaare (engl. basepairs, bp) innerhalb des Zellkerns gespeichert. Aneinander gereiht ergäbe sich ein DNA-Strang von ca. 2 m Länge. In Anbetracht der Menge an DNA und dem begrenzt zur Verfügung stehenden Raum im Zellkern (Durchmesser je nach Zelltyp 5 bis 16 μm), bedarf es einem hohen Grad an Kondensation. Diese Kondensation wird u.a. durch die Assoziation der DNA mit Histonen und der Bildung von Nukleosomen erreicht [34].

Bereits durch Anordnung der DNA in B-Form (rechtsgängige antiparallele Doppelhelix) wird ein gewisser Grad an Kondensation erreicht, der durch zusätzliche Superspiralisierung (Supercoil DNA) erhöht wird [34,63]. Die nächste Stufe der Verdichtung wird durch die Bindung der DNA an Histone erreicht (siehe Abbildung 4 - 5). Bei Histonen handelt es sich um eine heterogene Gruppe teilweise hochkonservierter basenreicher Proteine, von denen anfänglich angenommen wurde, sie seien selbst Teil des genetischen Materials. Heute ist bekannt, dass die Histone nicht nur als reines „Verpackungsmaterial der DNA“ dienen, sondern hoch komplexe Funktionen im Bereich der Genregulation erfüllen [44,70]. Die Unterteilung der Histone erfolgt in 5 Hauptgruppen bestehend aus: H1, H2A, H2B, H3, H4. Durch Heterodimerisierung erfolgt zwischen einem H3-H4-Tetramer (bestehend aus zwei H3-H4-Dimeren), flankiert von jeweils zwei H2A-H2B-Dimeren die Bildung eines Histonoktamers (Core particle) [4,52]. Auffällig ist hier die hohe strukturelle Ähnlichkeit der Histone H2A, H2B, H3 und H4. Sie weisen an ihren C-terminalen Enden jeweils α -helikale Strukturen auf (gebildet durch etwa 70 Aminosäuren), von denen jeweils 3 eine Domäne (Histon fold) bilden und mit dem Phosphodiester-Rückgrat der DNA interagieren können. N-terminal bilden etwa 20 - 40 Aminosäuren die sog. „Schwanz“-Domänen (Histon tails), die aus dem Histonoktamer herausragen und u.a. eine wichtige Rolle bei der Änderung der Nukleosomenstruktur im Rahmen von Replikation und Transkription spielen. Sie sind zugänglich für eine Reihe posttranslationalen Modifikationen wie z.B.: Acetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung, die die Eigenschaften von Histonen verändern können [34,36]. Je nach Art und Ort der Modifikationen kann die

Einleitung

Zugänglichkeit von bestimmten DNA-Abschnitten für z.B. Chromatin-modifizierende Interaktoren erleichtert oder erschwert und so die Transkription reguliert werden [90].



Abbildung 4; Histon-Oktamer mit „Schwanz-Domänen“ dargestellt als gestrichelte Linien, „Lollipops“ repräsentieren mögliche Acetylierungs-Lokalisationen (nach Luger, Mäder, R.K. Richmond, Sargent, T. J. Richmond, Crystal structure of the nucleosomecore particle at 2.8 Å resolution, 1997)

Die DNA wickelt sich mit etwa 1,65 – 1,8 Windungen auf einer Länge von 146 Basenpaaren in Form einer flachen linksgängigen Superhelix um das Histonoktamer und bildet hierdurch ein Nucleosom [44]. Zwischen den einzelnen Nucleosomen befindet sich Linker-DNA, die mit dem Histon H1 assoziiert ist. Das Histon H1 nimmt nicht direkt an der Bildung des Oktamers teil, stabilisiert aber den Verbund aus Nucleosom und DNA. So ergibt sich eine perlenschnurartige Aufreihung der Nucleosomen (Perlenschnur-Struktur, engl.: beads-on-string), die sich unter physiologischen Bedingungen zu einer metastabilen 30-nm-Faser zusammenlagert. Hierdurch entstehen Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Schwanzdomänen und negativ

Einleitung

geladenen Abschnitten der H2A-H2B-Dimeren. Die 30-nm-Fasern lagern sich zu etwa 20.000 bp langen Chromatinschleifen zusammen, die durch H1-Histone und nicht Histon-Proteine (Typ-II-Topoisomerasen, SMC-Proteine) stabilisiert werden. Durch weitere Kondensierung werden während der Zellteilung Metaphase Chromosomen gebildet [34,44,52].

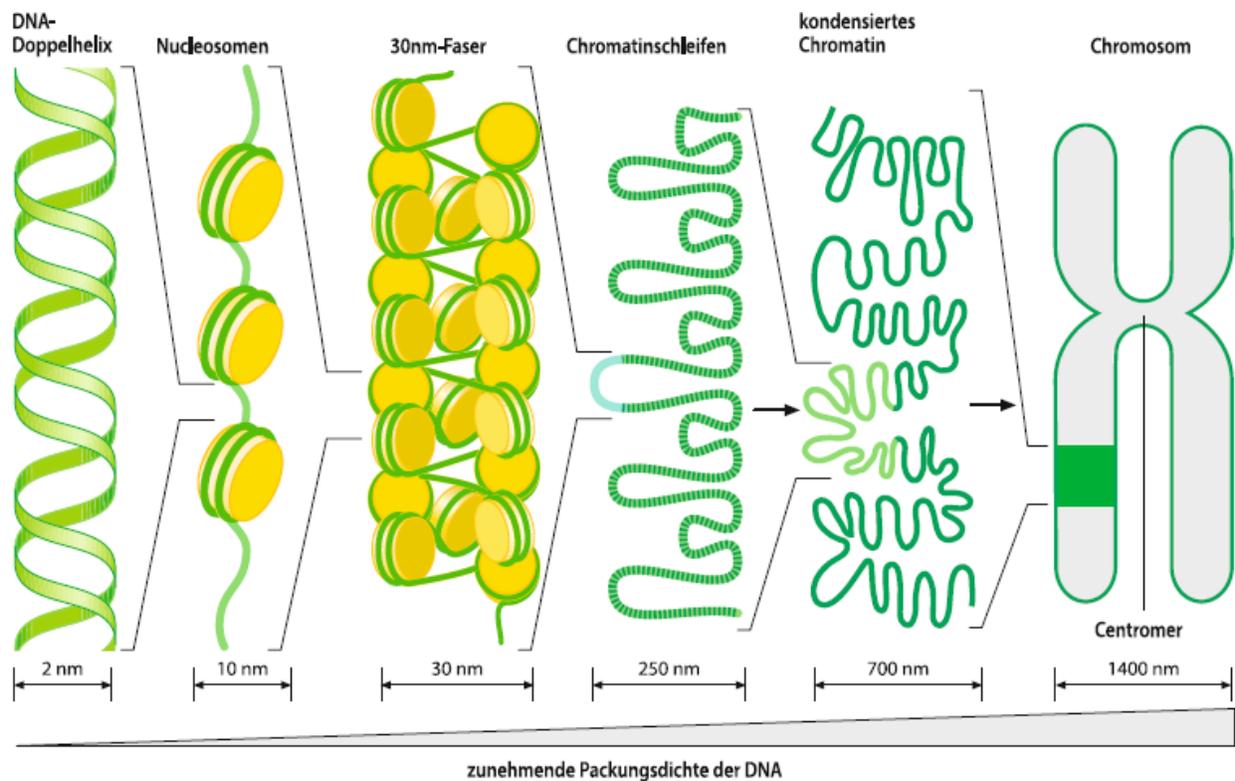


Abbildung 5: Von links nach rechts aufsteigende Kondensationsstufen der DNA (nach Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9. Auflage, 2014)

Neben den oben bereits beschriebenen kanonischen Histonen existieren nicht-allelische Histonvarianten, die sich teilweise in der Primärsequenz auf Nukleotidebene und im Expressionszeitpunkt signifikant von den 5 Hauptsubtypen unterscheiden. Während kanonische Histone innerhalb der S-Phase des Zellzyklus exprimiert werden, werden die Histonvarianten unabhängig von der DNA-Replikation gebildet. Zudem enthalten die Gene der Histonvarianten im Gegensatz zu den kanonischen Histonen Introns und ihre transkribierte mRNA ist teilweise polyadenyliert. In einigen differenzierten Zellen werden kanonische Histone sogar zeitweise von den Histonvarianten als vorherrschende Histone abgelöst, was ihre Relevanz bei dynamischen

Einleitung

Prozessen des Chromatins unterstreicht. Neben den großen Unterschieden kann die Aminosäuresequenz zwischen kanonischen Histonen und ihren Varianten nahezu identisch sein, in anderen Fällen wiederum stark variieren [40,65].

Von den globulären Histon-Varianten zeigt H2A mit 8 nicht-kanonischen Subtypen die größte Varianz. Zu den bisher bekannten zählen: H2A.X, H2A.Z, macro-H2A, short-H2A, H2A.W, H2A.M, H2A.1 und H2A.J [58]. Die Varianten unterscheiden sich untereinander einerseits in ihrer Lokalisation innerhalb des Genoms, andererseits in ihrer Aminosäuresequenz und Länge der C-terminalen Domänen. Auch ihre Funktionen sind sehr heterogen. H2A.Z z.B. dient neben der Stabilisierung der genomischen Integrität u.a. der Aktivierung und Repression der Transkription [71]. H2A.X dagegen ist mit der Reparatur von DSB assoziiert [78].

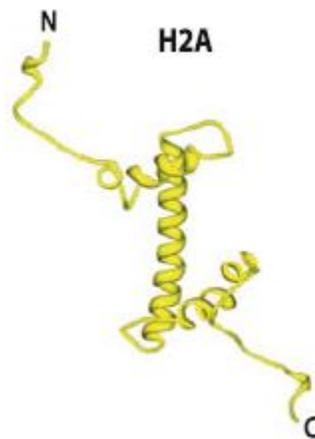


Abbildung 6: Kanonisches Kernhiston H2A (nach Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9. Auflage, 2014)

3.3.2 H2A.J

Im Fokus dieser Arbeit steht die säugetierspezifische Histonvariante H2A.J die vom H2AFJ-Gen (Chromosom 12) codiert wird. Sie unterscheidet sich von Hauptsubtyp Histon H2A (H2A-Typ 1 B/E) durch den Austausch von 7 Aminosäuren und einer Deletion innerhalb der C-terminalen Domäne [86]. Neben einer N-terminalen Alanin-11-Valin-Substitution, findet man in der Nähe des C-Terminus ein SQK-Motiv, das am Serin-123 phosphoryliert werden kann. Funktionell spielt der C-Terminus eine wichtige Rolle in der Förderung von inflammatorischen Prozessen innerhalb seneszenten Zellen [20]. Der C-Terminus von H2A.J interagiert deutlich weniger mit H1, als der des kanonischen H2A. Die geringere Affinität kann zu geringerer Chromatin-Assoziierung von Histon H1 führen. Eine Abnahme der Assoziation von H1 und dem Chromatin kann wiederum

Einleitung

über die verminderte Inhibierung zur einer transkriptionellen Aktivierung von Interferon-stimulierenden-Genen und proinflammatorischen Genen führen [54].

Arbeiten der Arbeitsgruppe Contrepois zeigen, dass die H2A.J-Histonvariante auch in proliferierenden humanen Fibroblasten in geringen Mengen vorhanden ist, sich jedoch im Chromatin von Fibroblasten in Seneszenz mit anhaltenden DNA-Schäden über einen Zeitraum akkumuliert. Der Zustand der Seneszenz ist mit einer tiefgreifenden Reorganisation des Chromatins und der Hochregulierung von Genen proinflammatorischer Zytokine, Chemokine, Metallo-Proteasen und Wachstumsfaktoren (SASP) und der Unterdrückung proliferationsfördernder Gene assoziiert [20].

In Publikationen der Arbeitsgruppe C.E. Rube wurde beschrieben, dass sich H2A.J altersabhängig in humaner Epidermis anreichert. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen der Anzahl H2A.J-positiver Keratinozyten und dem Alter der Probanden nachgewiesen werden. Daneben fiel eine schichtspezifische Verteilung H2A.J-positiver Zellen innerhalb der Epidermis auf, die vom Stratum germinativum hin zum Stratum granulosum zunimmt und damit weitestgehend dem physiologischen Differenzierungsprozess epidermaler Keratinozyten entspricht, die auf diesem Weg progredient an Proliferationspotential einbüßen [79].

Weitere Versuche der Arbeitsgruppe beleuchteten den Zusammenhang von IR-induzierten DNA-Doppelstrangbrüchen, der daraus resultierenden DNA-Schadensreaktion (DDR) und der konsekutiven Induktion prämaturer Seneszenz. Die fulminante Chromatinstrukturierung mit Bildung von seneszenzassoziierten Heterochromatinfoci (SAHF) scheint dabei einen wesentlichen epigenetischen Kontrollmechanismus des seneszenzassoziierten sekretorischen Phänotyps darzustellen. Im Verlauf der Seneszenzprogression kommt es dabei zur Ansiedlung von H2A.J in „DNA-Segmenten mit Chromatinveränderungen, die die Seneszenz verstärken“ (engl.: „DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence“, DNA-SCARS) [37,77]. Dabei zeigt sich, dass die H2A.J-Expression sowohl auf der transkriptionellen als auch auf der posttranskriptionellen Ebene reguliert werden kann. Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass H2A.J möglicherweise als Seneszenz-Marker und / oder Differenzierungsmarker in verschiedenen Geweben fungieren könnte. Ob dieser Zusammenhang auch durch IR-induzierte prämaturre Seneszenz in infantiler präputialer Epidermis gilt, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

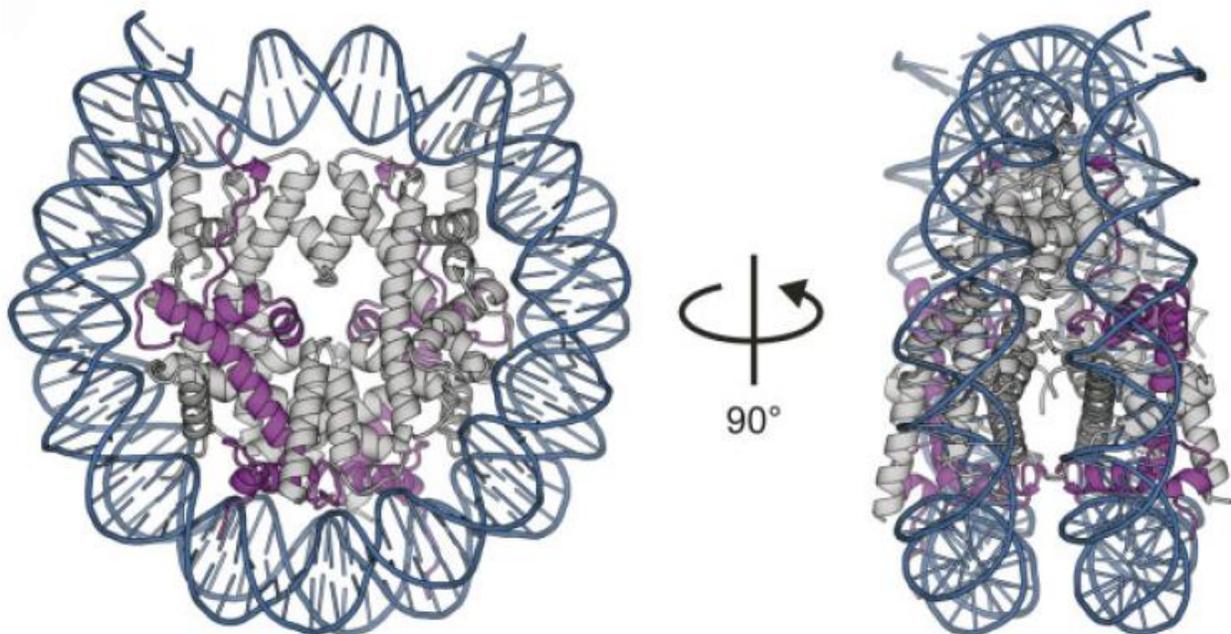


Abbildung 7: Nukleosom, H2A.J-Molekül ist lila gefärbt (nach Tanaka et al., Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J, The Journal of Biochemistry, 2020)

3.3.3 Proliferationsmarker Ki67

Um die weiter oben beschriebenen biochemischen Auswirkungen ionisierender Strahlung auf vitales Gewebe mit etwaigem konsekutivem Zellzyklusarrest und Proliferationsstopp zu detektieren, bedarf es einem Marker, der ausschließlich in proliferierenden Zellen nachweisbar ist. Ki67 richtet sich gegen ein Epitop des nukleären Ki67-Proteins (Ki67p) [33], das nur in Zellkernen proliferierender Zellen vorkommt. Ki67p wird lediglich in proliferationsaktiven Zellzyklusphasen (G1-, S- und G2-Phase und Mitose) exprimiert, wohingegen es bei postmitotischen, ruhenden Zellen oder seneszenten nicht mehr nachweisbar ist [27,51]. Allerdings ist die Funktion von Ki67p noch nicht vollständig verstanden. Ungeachtet dessen hat sich mit Ki67 ein unverzichtbarer Proliferationsmarker für histopathologische Fragestellungen etabliert, der neben vielen anderen Geweben auch für Proliferationsmarkierung in humaner Epidermis genutzt werden kann [27,32].

3.4 Aufbau der Haut

Die humane Haut ist ein vielfältiges Organ, welches neben Bindegewebe und verhornenden Zellen [59] auch zahlreiche Immunzellen und Nerven enthält [3]. Ebenso vielfältig sind ihre Aufgaben, zu denen unter anderem der Schutz der darunterliegenden Gewebe vor äußeren Einflüssen und die Transduktion der Qualität und Intensität äußerer Reize zählt, wie z.B. Druck und Temperatur.

Die menschliche Haut besteht aus 3 Schichten: Epidermis, Dermis und Subkutis. Die jeweilige Ausprägung in Dicke, Elastizität, Farbe und oberflächlicher Struktur kann je nach Lokalisation, Geschlecht und funktionellem Anspruch variieren [3].

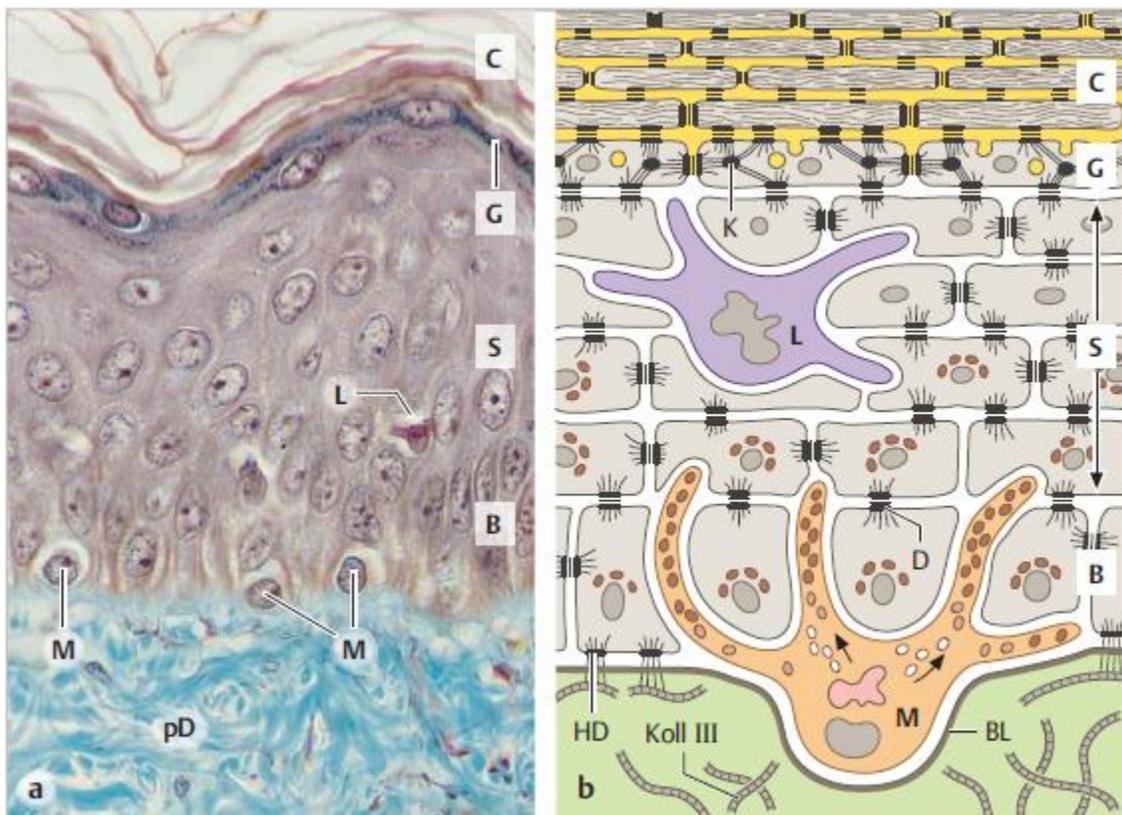


Abbildung 8: Schichten der Epidermis; a) humane Wangenhaut, b) Vereinfachtes Schema, (B) Stratum basale, (S) Str. spinosum, (G) Str. granulosum, (C) Str. corneum, (L) Langerhans-Zelle, (M) Melanozyt, (pD) papilläre Dermis, (K) Keratohyalingranulum, (BL) Basallamina, (D) Desmosom, (HD) Hemidesmosom, (Koll III) Fibrillen aus Kollagen Typ III (nach Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, 6.Auflage, 2019)

Einleitung

Die Subkutis (Unterhaut) besteht im Wesentlichen aus losem Bindegewebe, Adipozyten und Makrophagen. Sie dient unter anderem der Thermogenese (Isolierung) und der Speicherung von Energie in Form von Körperfett. Daneben erfüllt die Subkutis durch die polyedrische Anordnung der Fibroblasten auch eine mechanische Pufferfunktion [101].

Die Dermis (Lederhaut) misst je nach Lokalisation 2 mm - 4 mm. Sie besteht größtenteils aus Kollagen, elastischen Fasern (Elastin) und extrazellulärer Matrix (Proteoglykane, Glykosaminoglykane), die durch Fibroblasten synthetisiert werden. Durch die hohe Anzahl an kollagenen Fasern (überwiegend Typ-I /Typ-III) erhält die Dermis eine ausgeprägte mechanische Stabilität [101]. Sie ist stark vaskularisiert und enthält neben Hautanhangsgebilden (Haarwurzeln, Talg- und Schweißdrüsen), Immunzellen (Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen [62]) auch zahlreiche verschiedene Nervenzellen (u.a. Mechanorezeptoren). Die Dermis fungiert einerseits als feste mechanische Verbindung zwischen Epidermis und Subkutis, andererseits kommt ihr eine Schlüsselrolle in der Versorgung der gefäßlosen Epidermis zu [3,101].

Die humane Epidermis stellt die äußerste mechanische Barriere zwischen Körper und Umwelt dar. Sie misst je nach Lokalisation zwischen 0,04 mm - 15 mm und besteht aus vier bis fünf Schichten [3,101] (siehe Abbildung 8). Es handelt sich hierbei um ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel ektodermalen Ursprungs, das zu 90% aus Keratinozyten besteht, die mit der Basallamina verbunden sind [106]. Die verschiedenen Schichten der Epidermis ergeben sich aus den unterschiedlichen Differenzierungsstadien, die die Keratinozyten auf dem Weg vom Stratum basale über das Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum (nur in der Leistenhaut) hin zum Stratum corneum durchlaufen [62]. Um die strukturelle Integrität der Epidermis zu gewährleisten, müssen sich die Keratinozyten stetig erneuern. Entscheidend dafür ist das einschichtige Stratum basale, das kubische bis hochprismatische mitotisch-aktive Stammzellen enthält, die sowohl untereinander als auch mit der darunter liegenden Basalmembran durch Hemidesmosomen (Funktion ähnlich der Desmosomen, siehe unten) verbunden sind [103]. Die epidermale Homeostase setzt das Vorhandensein von ausreichend epidermalen Stammzellen voraus, welche sich selbst regenerieren und Tochterzellen generieren können. Diese Tochterzellen durchlaufen eine terminale Differenzierung und verlieren dadurch die Fähigkeit der Regenerierung. Stammzellen besitzen die besondere Fähigkeit sich, je nach Typ Stammzelle (embryonale = pluripotent, postembryonale = multipotent) und zygotener Beeinflussung, in bestimmte Gewebetypen zu entwickeln [105]. Aus diesen großkernigen Stammzellen bilden sich stetig neue Keratinozyten die vom Stratum basale innerhalb von 15 - 30 Tagen bis zum Stratum corneum wandern und dabei eine fortschreitende Differenzierung erfahren. Neben Keratinozyten finden man im Stratum basale vor allem melaninbildende

Einleitung

dendritische Zellen. Diese Melanozyten tragen durch physiologische Melaninproduktion maßgeblich zum Schutz vor DNA-Schäden UV-exponierter Keratinozyten bei, in dem Keratinozyten das Melanin durch Phagozytose aufnehmen. Melanin entsteht bei der Oxidation der Aminosäure Tyrosin als Polymerisationsprodukt und wirkt als Absorber energiereicher Strahlung verschiedener Wellenlängen [41,76]. Die vermehrte Proliferation von Melanozyten, sowie die erhöhte Produktion von Melanin ist maßgeblich für Hautfarbe und physiologische Hautbräunung. Um den Pigmentationsgrad der Haut semi-quantitativ einzuordnen, werden die modifizierten Hauttypen nach Fitzpatrick (Fitzpatrick skin type, FST) genutzt, die eine Einordnung anhand des Bräunungsgrades nicht-sonnenexponierter Haut und dem Bräunungsverhalten in sonnenexponierter Haut in 6 Klassen (I – VI; I = hellhäutig, VI = dunkelhäutig) zulassen. Obwohl diese Einordnung unter Beachtung der eingeschränkten Aussagekraft subjektiver Angaben betrachtet werden muss, ist sie nach wie vor ein gängiges Instrument zur orientierenden Einordnung [64,66].

Das Stratum spinosum bildet mit etwa 8 - 10 Zellschichten [103], die dickste Schicht der Epidermis. In ihr findet man polyedrische Keratinozyten. Die interzellulären Brücken, auch als Desmosomen bezeichnet, dienen unter anderem der Verankerung intermediärer Filamente untereinander. Das Stratum spinosum ist weniger basophil als das Stratum basale, weist aber eine ähnlich hohe mitotische Aktivität wie dieses auf [11]. Daher werden beide auch zusammenfassend als Stratum germinativum bezeichnet. Im Stratum spinosum kommt es durch Zunahme der Keratinproduktion zu einer Keratinisierung, die im Verlauf zum Verlust von Kernstrukturen führt und letztlich mit der Hautschuppung endet [1]. Diese Keratinisierung trägt wesentlich zur strukturellen Integrität der humaner Epidermis bei [22]. Neben Keratinozyten findet man im Stratum spinosum ebenfalls Langerhanszellen. Hierbei handelt sich um antigenpräsentierende dendritische Zellen, die sich von Monozyten ableiten und morphologisch sowie funktionell Makrophagen ähneln. Wie Makrophagen sind auch Langerhanszellen ein Teil des angeborenen Immunsystems. Sie phagozytieren und verarbeiten Pathogene, die sie an ihrer Oberfläche T-Zellen präsentieren, um so eine entsprechende Immunantwort auszulösen [28].

Das Stratum granulosum besteht aus 1 - 5 Zellreihen abgeflachter rautenförmiger Zellen, die sich in der präfinalen Phase ihrer Zelldifferenzierung befinden. Neben dem Zellkern findet man vermehrt Keratohyalin-Granula und membrangebundene Lamellenkörper (Lamellengranulat). Diese Granula können durch Exozytose in den extrazellulären Raum entlassen werden und tragen, durch Bildung einer undurchlässigen Membran, wesentlich zur mechanischen Barrierefunktion der Epidermis bei.

Einleitung

Das Stratum corneum bildet die oberste Schicht der Epidermis. Sie besteht aus etwa 15 - 20 Lagen flacher avitaler Keratinozyten (Hornzellen). Diese Korneozyten enthalten neben quervernetzten Keratin-Fibrillen und amorphen Proteinen, keinerlei Zellorganellen mehr. Die Zellen sind über Desmosomen miteinander verbunden und in eine amorphe extrazelluläre Matrix eingebettet und tragen so zur Barrierefunktion bei. Die avitalen Hornzellen werden in regelmäßigen Abständen abgestoßen (Hautschuppung) [3,103].

3.4.1 Männliche Vorhaut

Kaum ein Bereich des menschlichen Körpers hat gesellschaftlich und kulturell so viel Aufmerksamkeit erfahren wie die männliche Vorhaut. In einigen Kulturen wird sie aus rituellen Gründen entfernt [99], weshalb das Präputium zu einer der meistoperierten anatomischen Strukturen des menschlichen Körpers gehört. Die männliche Vorhaut ist ein integraler Bestandteil der äußeren männlichen Fortpflanzungsorgane. Sie besteht aus einem Innen- und Außenblatt, die zugleich den mukokutanen Übergang von Epidermis in wenig verhornendes Schleimhautepithel darstellen. Es besteht eine strukturelle Ähnlichkeit zu anderen Grenzflächen wie z.B. Augenlider oder Lippen. Innen- und Außenblatt sind gegeneinander verschiebbar. Im zusammengefalteten Zustand (also übereinander liegend) ergibt sich von außen nach innen folgender Querschnitt: Epidermis, Dermis, Dartos-Muskelschicht, Lamina propria und Mukosa.

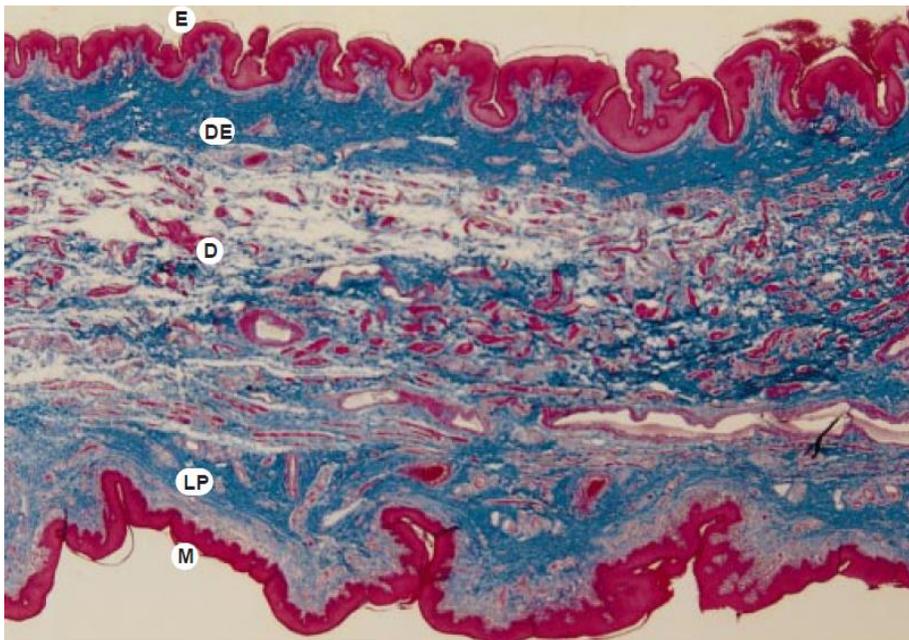


Abbildung 9: Männliche Vorhaut in Elastin-trichromer Färbung; (M) Mukosa, (LP) Lamina propria, (D) Dartos-Muskelschicht, (DE) Dermis, (E) Epidermis (nach C.J. Cold and J.R. Taylor „The prepuce“, 1999)

Einleitung

Die Mukosa ähnelt histologisch der Mundschleimhaut und präsentiert sich als mehrreihiges, wenig verhornendes Plattenepithel. In ihr finden sich, im Gegensatz zum Epithel des Außenblatts, keine Melanozyten, was zur mikroskopischen Abgrenzung genutzt werden kann. Die Mukosa ist bei jungen Patienten oft noch mit der Glans penis verschmolzen (präputiale Adhäsion) und muss vor der Zirkumzision mit einer stumpfen Sonde getrennt werden [18].

Die Lamina propria besteht aus Bindegewebe und weist zahlreiche Blutgefäße und Nervenzellen (beispielsweise Meissner Tastkörperchen) auf. In Aufbau und Funktion ähnelt sie der Dermis des Außenblatts und dient der Versorgung der darüberliegenden Mukosa. Im Gegensatz zur Dermis findet man in ihr weder Haarfollikel noch Talg- oder Schweißdrüsen. Zudem enthält sie weniger kollagene Zonen und weniger elastische Fasern als die Dermis [18,87].

Die Dartos-Muskelschicht besteht aus Dartos-Muskeln, die in elastisches Bindegewebe eingebettet sind. Diese kontrahieren sich temperaturabhängig. Sie dienen unter anderem der Anpassung von Vorhautlänge an den jeweiligen Erregungszustand (unerregt = Haut kontrahiert, erregt = Haut erschlafft). Im Alter nimmt das Verhältnis von Muskelfasern zu elastischen Fasern ab, daher wirkt die Vorhaut junger Patienten makroskopisch oft faltiger als die älterer [18].

Dermis und Epidermis entsprechen größtenteils histologisch dem bereits beschriebenen Aufbau normaler Haut (siehe Abbildung 9). Immunologisch scheint es Unterschiede bezüglich der Quantität von immunologisch aktiven Langerhanszellen zu geben. Ein Erklärungsansatz für die hohe Dichte an Langerhanszellen im Präputium scheint die dauerhafte Aktivierung durch bakterielle Pathogene der periurethralen Hautflora zu sein. Zudem findet man eine stark ausgeprägte Vaskularisation, die den Immunzellen eine schnelle Immigration und adäquate Immunantwort erst ermöglicht [26].

3.5 Fragestellung

Der Nachweis seneszenten Zellen ist erforderlich, um therapeutische Ansätze zur Behandlung von onkologischen und altersbedingten Erkrankungen zu entwickeln und zu optimieren. Um das Potential dieser Therapien in Zukunft vollumfänglich nutzen zu können ist zudem ein umfassendes Verständnis der elementaren Abläufe innerhalb der seneszenten Zellen unabdingbar. In Ermangelung eines zuverlässigen universellen Markers zur Identifikation seneszenten Zellen ist die Etablierung verschiedener Seneszenzmarker, wie z.B. einem Marker für strahleninduzierte Seneszenz, von großem klinischem Interesse. In vorangegangenen Arbeiten wurde bereits untersucht, ob eine Korrelation zwischen der Expression der Histonvariante H2A.J und zellulärer Seneszenz in muriner Epidermis besteht. Ebenfalls wurde H2A.J in humaner abdomineller Epidermis im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses erwachsener Probanden (18 - 90 Jahre) und nach Bestrahlung epidermaler Hautschichten (>30 Jahre) analysiert. Um seneszenztypische, intrazelluläre Vorgänge nach Strahlenexposition bei pädiatrischen Patienten zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit 19 präputiale Epidermisproben von männlichen Probanden ohne bekannte Vorerkrankungen im Alter von 1 - 10 Jahren während elektiver Eingriffe entnommen und anschließend mit einer definierten Strahlendosis exponiert.

Das Ziel dieser Arbeit war die schichtspezifische Analyse der Hautproben auf eine Korrelation zwischen der Anzahl nachweisbarer H2A.J-positiver Zellen nach erfolgter Strahlenexposition zum Nachweis strahleninduzierter Seneszenz innerhalb der akquirierten präputialen Epidermisproben. Darüber hinaus wurde der zelluläre Proliferationsstatus in Abhängig von der applizierten Strahlendosis in den verschiedenen epidermalen Hautschichten anhand der Anzahl Ki67-positiver Zellen untersucht.

4 Material und Methodik

Die folgenden Kapitel stellen eine Übersicht der verwendeten Chemikalien, Geräte, Materialien und der durchgeführten Methoden dar.

4.1 Geräte und Material

4.1.1 Geräte

Die folgende Tabelle dient als Überblick über die verwendeten Geräte und sonstige Materialien.

Tabelle 1: Verwendete Geräte und Materialien

Gerät	Hersteller
15 ml / 50 ml Reaktionsgefäß 2270261	Greiner bio-one, Frickenhausen
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Schnittmatte 0668.1	Carl Roth, Karlsruhe
Kanülen, Microblades 2	Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes
Chirurgische Schere	MSG Praxisbedarf, Wuppertal
Multi-Well-Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen
ThinCert™ Zellkultureinsätze für Multiwell Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Brutschrank Galaxy 170S	Eppendorf AG, Hamburg
Einbettkassetten, geschlitzt, E70070-GR	Science Service, München
Gewebeinfiltrationsautomat HistoCore PEARL, Leica Biosystems	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Ausblockwanne	Tissue- Tek®, Sales & Service GmbH, Dormagen
Mikrotom	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Histobond, Objektträger Superior Marienfeld 631-947	VWR, Part of Avantor, Radnor

Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wärmeofen mit fociierter Umluft, FD 115	Binder, Tuttlingen
Magnetrührer Bibby Stuart SB161	Bibby Sterilin Ltd., Staffordshire
Fluoreszenz-Mikroskop Nikon Eclipse E600	Nikon, Düsseldorf
Laborwaage BL 210S ISO 9001	Sartorius, Göttingen
pH-Meter	WTW MultiCare, Weilheim

4.2 Chemikalien und deren Zusammensetzung

Die folgende Tabelle dient als Überblick über die verwendeten Chemikalien und Antikörper.

4.2.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien und Antikörper

Produkt	Hersteller
Ki67-Antikörper (mouse-anti-human) M7240	Dako AG, Wiesentheid
H2A.J-Antikörper (rabbit-anti-human)	Zur Verfügung gestellt von Carl Mann, Paris
H2A.J-Antikörper (rabbit-anti-human)	Active Motif, Carlsbad
Immunoblock T144.1	Carl Roth, Karlsruhe
Dako®REAL Retrieval Solution (10x), S1699	Agilent technologies Deutschland GmbH, Waldbronn
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Sigma Aldrich Co, Steinheim
Gewebeeinbettmedium Paraffin, 56° - 58°C, 17932a	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde

Material und Methodik

Paraformaldehyd (PFA) - Lösung (4%ig)	Electron Microscopy Sciences, Hatfield
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Apotheke des Uniklinikums des Saarlandes, Homburg
Goat Anti-Rabbit IgG Alexa Flour 568, A11036	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Goat Anti-mouse IgG Alexa Fluor 488, A32723	Thermo Fisher Scientific, Waltham
RPMI 1640 Kulturmedium	Biochrom AG, Berlin
DAPI Eindeckmedium P36931	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Xylol (C ₈ H ₁₀) Pharm. Helv. 4, Isomerengemisch	Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart

4.2.2 Angesetzte Lösungen

Tabelle 3: Angesetzte Lösungen

Lösung	Herstellung
Citratpuffer	40 mM Zitronensäure (C ₆ H ₈ O ₇) 150 mM, Natriumchlorid (NaCl) 2 mM Magnesiumchloridhexahydrat (MgCl ₂ * 6 H ₂ O) Ad 100 ml mit Aqua dest.
Immunoblock	Carl Roth T144.1 1:10 Verdünnung in Aqua dest.
primärer Ki67 Antikörper	Dako M7240 1:500 Verdünnung in Immunoblock
sekundär Ki67 Antikörper	Goat Anti-mouse Alexa Fluor 488 1:1000 Verdünnung in PBS
primärer H2A.J Antikörper	Rabbit Anti-human 1:200 Verdünnung in Immunoblock
sekundärer H2A.J Antikörper	Goat Anti-rabbit AlexaFluor 568 1:1000 Verdünnung in PBS
PFA - Lösung	4 % PFA Verdünnung in Aqua dest.

4.3 Patientenkollektiv

Bei dem Patientenkollektiv handelt es sich um 19 männliche Patienten in der Altersgruppe 1 - 10 Jahren ohne relevante Vorerkrankungen.

Die erfassten Patientendaten umfassen persönliche Informationen (Name, Alter, Geschlecht) sowie krankheitsbezogene Daten (Hauttyp, Vorerkrankungen, OP-Indikation, Allergien). Zur Anonymisierung der Patientendaten wurde ein dreistelliger Buchstabencode erstellt, der sich jeweils aus dem ersten und letzten Buchstaben des Nachnamens, sowie dem letzten Buchstaben des Vornamens zusammensetzt.

Die Operationsindikation war in allen Fällen eine Phimose (Vorhautverengung) bzw. deren Prophylaxe. Dementsprechend handelt es sich bei den Hautproben um die überschüssige Vorhaut, die bei einer routinemäßigen elektiven Zirkumzision anfällt.

Die Versuche wurden unter möglichst konformen und konstanten Bedingungen durchgeführt.

4.4 Patientencharakteristika

Bei den 19 Probanden handelt es sich um männliche Teilnehmer im Alter von 1 - 10 Jahren. Der durchschnittliche Hauttyp entspricht dem Hauttyp III (2,95) modifiziert nach Fitzpatrick.

Tabelle 4: Probandendaten

	Patient	Alter in Jahren	Hauttyp nach Fitzpatrick	Operation
1.	SHH	7	I	Zirkumzision
2.	YGI	3	III	Zirkumzision
3.	AAA	2	VI	Zirkumzision
4.	YZN	8	III	Zirkumzision
5.	AHA	3	VI	Zirkumzision
6.	BCS	3	IV	Zirkumzision
7.	ZKN	7	I	Zirkumzision
8.	HEB	2	IV	Zirkumzision
9.	FRN	9	I	Zirkumzision

10.	KAY	2	V	Zirkumzision
11.	ONE	7	II	Zirkumzision
12.	RNR	8	I	Zirkumzision
13.	KNN	1	II	Zirkumzision
14.	FEN	8	I	Zirkumzision
15.	AAI	2	IV	Zirkumzision
16.	AAM	2	IV	Zirkumzision
17.	BHN	6	II	Zirkumzision
18.	OLK	9	II	Zirkumzision
19.	HRL	3	II	Zirkumzision

4.4.1 Ausschlusskriterien

Zu den Ausschlusskriterien der Studie zählten neben chronischen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen, besonders Hauterkrankungen, wie z.B. Lichen sclerosus atrophicus. Zudem führten Entzündungszeichen, Narben, Effloreszenzen oder sonstige Degenerationen im Entnahmegebiet zum Ausschluss der Probe. Verwendet wurde nur das äußere Blatt der Vorhaut.

4.5 Methodik

4.5.1 Hautprobenentnahme und Präparation

Die Präparate wurden nach Aufklärung und Einwilligung der Erziehungsberechtigten (Kenn-Nr. Ethikkommission: 226/16) während Zirkumzisionen in den OP-Sälen des Winterberg-Klinikums in den Fachbereichen für Urologie sowie Kinderchirurgie in Saarbrücken entnommen. Hierbei wurde die gesamte Vorhaut akquiriert. Die gewonnene Probe wurde sofort in ein steriles Reaktionsgefäß überführt, welches mit einem auf 37 Grad Celsius (°C) vortemperierten RPMI Kultivierungsmedium gefüllt war. Im Anschluss wurden die Hautproben in einem verschlossenen Styroporbehälter zusammen mit mehreren Wärmeakku-Einheiten schnellstmöglich in das Labor der Strahlentherapie des Uniklinikums Homburg transportiert. (Ausnahme: 3 Proben wurden direkt im OP in Paraformaldehyd (PFA) fixiert)

Material und Methodik

Die Präparation des Gewebes erfolgte im Labor. Die Hautproben wurden unter sterilen Bedingungen (Holten Safe, Sicherheitswerkbank Klasse 2) mittels Kanülen (Microblades®) auf eine Adhäsionsmatte aufgespannt und in ca. 0,5 x 0,5 cm² große Stücke geschnitten. Zur weiteren Kultivierung wurden die Proben mit der Dermis-Seite nach unten auf ein Insert (ThinCert™) gelegt, welche in eine mit je 2 ml Nährmedium pro Well befüllte 6-Well-Platte (Multi-Well-Platte) eingesetzt wurde (siehe Abbildung 10). Die semipermeable PET (Polyethylenterephthalat) Membran der Inserts hat eine Porengröße von 1 µm. Diese dient der möglichst physiologischen Ernährung der Hautproben während der Kultivierung. Nach der Aufbereitung wurden die Proben im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ für maximal 24 Stunden inkubiert.

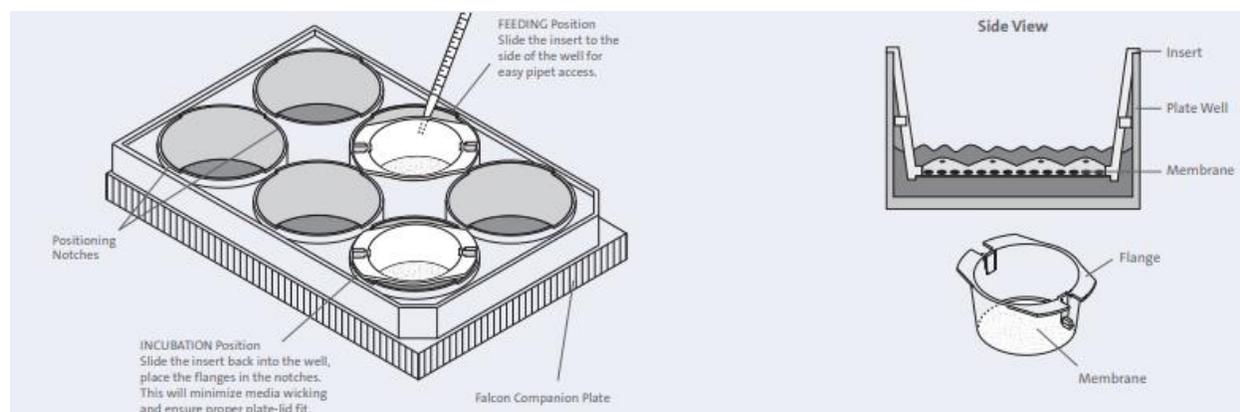


Abbildung 10: Multi-Well-Platte und Inserts (modifiziert nach Falcon® Cell Culture Inserts and Companion Plates, www.cultek.com)

4.5.2 Bestrahlungsplanung und Bestrahlung

Die Bestrahlung der Hautproben erfolgte an einem Linearbeschleuniger (Hersteller: Siemens; Modell: Artist 1, Artist 2 oder Oncor) mit 6 MV Photonen, einem Gantrywinkel von 180 Grad und einer Feldgröße von 30 cm x 30 cm. Zunächst wurde ein Planungs-CT (siehe Abbildung 11) von einer 6 Well-Platte, gefüllt mit jeweils 2 ml pro Well, angefertigt. Unter die 6 Well-Platte wurden zwei je 1 cm dicke Plexiglasplatten positioniert, in denen der Dosisaufbaueffekt stattfand, um an den Hautproben eine homogene Dosisverteilung zu gewährleisten. Die dreidimensionale Bestrahlungsplanung erfolgte mit dem Programm Pinnacle³ (Philips GmbH, Amsterdam).

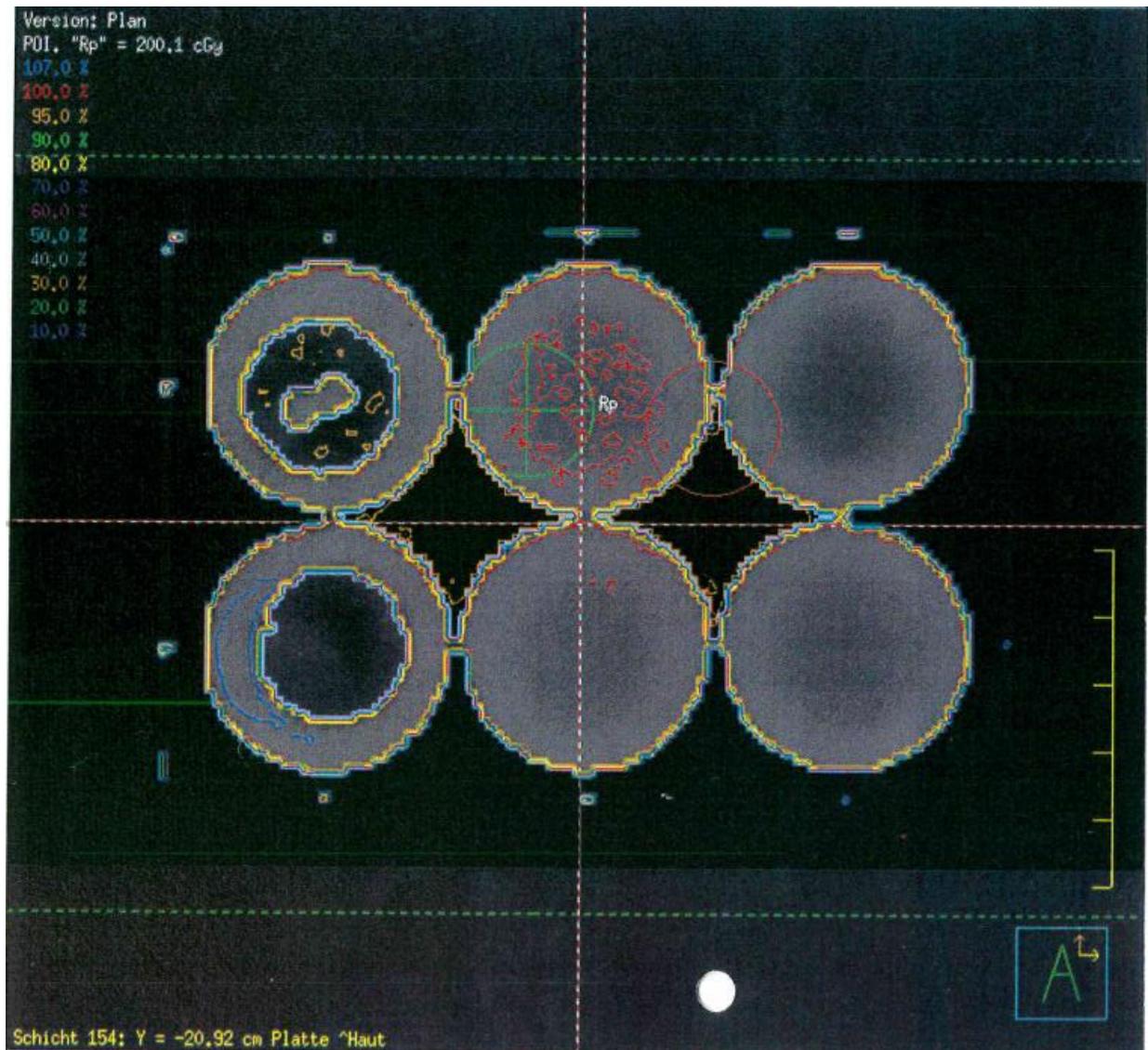


Abbildung 11: Bestrahlungsplan mit 6-Well-Platte und Insert. Auszug aus Pinnacle³ (Philips GmbH, Amsterdam).

Nach der operativen Entnahme und anschließenden Präparation (siehe oben) wurden die Epidermisproben über Nacht im Brutschrank (Galaxy 170S) unter physiologischen Bedingungen inkubiert und am Folgetag bestrahlt. Um möglichst physiologische Bedingungen zu erhalten, wurden die Proben nach der Bestrahlung bis zu ihrer Fixierung wieder im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert.

4.5.3 Fixierung, Einbettung, Ausblockung und Sektionierung

Entsprechend der Fragestellung wurden die bestrahlten Proben 24 Stunden nach Bestrahlung (bei Kontrollgruppe ohne Bestrahlung) aus dem Brutschrank genommen, dreimal je 10 Minuten in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß mit 4% Paraformaldehyd (PFA) Lösung überführt. Die Fixierung erfolgte im Dunkeln über Nacht bei Raumtemperatur (RT). Am nächsten Tag wurden die Proben in Gewebekassetten umgesetzt und bis zur weiteren Bearbeitung in PBS gelagert.

Die Einbettung erfolgte in der Neuropathologie des Uniklinikums Homburg mittels eines automatisierten Gewebereinbettautomaten. Zur schonenden Dehydrierung durchliefen die Gewebeprobe zunächst eine aufsteigende Alkoholreihe beginnend mit zweimal 50% gefolgt von jeweils einmal 70%, 80%, 90%, 95% bevor sie zweimal für 65 Minuten in absolutem Ethanol verweilen. Danach folgten zwei Xylolschritte zu 55 Minuten und einer zu 80 Minuten. Zur Vorbereitung des Ausblockens wurden die Epidermisproben eine Stunde in flüssigem Paraffin inkubiert. Die weitere Verarbeitung erfolgte mittels einer Ausblockstation. Hierfür wurden die Proben in eine mit flüssigem Paraffin gefüllte Ausblockwanne überführt, mit Hilfe einer Pinzette in eine Ausblockform gelegt und mit heißem Paraffin übergossen. Zur schonenden Auskühlung wurden die Proben auf eine 4 °C kalte Kühlplatte gestellt. Nach dem Aushärten konnten die Einbettkassetten aus den Ausblockformen gelöst und zur Weiterverarbeitung ins Labor der Strahlentherapie transportiert werden.

Zur besseren Schneidbarkeit der Proben wurden diese auf -20 °C heruntergekühlt. Die Herstellung der 4 µm dicken Gewebeschnitte erfolgte an einem Rotationsmikrotom. Diese schwammen zuerst in der Auffangwanne des Mikrotoms bevor sie mit Hilfe eines Objektträgers in ein 55 °C warmes Streckbad überführt wurden. Anschließend wurden die Hautschnitte auf einen Adhäsionsobjektträger aufgezoogen und 60 Minuten im Wärmeschrank aufgebacken, um die Anhaftung der Schnitte auf dem Objektträger zu erhöhen.

4.5.4 Immunfluoreszenzmarkierung

Der Nachweis von H2A.J- und Ki67-positiven Keratinozyten in juveniler Vorhaut erfolgte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie (IFM). Zunächst wurden die auf den Objektträgern befindlichen Hautschnitte dreimal je 10 Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschließend wurden die Hautproben zur Rehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe, beginnend mit 100%igem über 96 %, 90 %, 80 % bis zu 70%igem Alkohol für jeweils drei Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurde

der überschüssige Alkohol mittels destilliertem Wasser abgespült und die Proben in eine Küvette mit PBS überführt. Die anschließende Antigendemaskierung erfolgte in einem Citrat-Puffer (Agilent S1699, pH-Wert: 6) bei 95 °C für 60 Minuten. Nach einer Auskühlzeit von 20 Minuten zur Vermeidung starker Temperaturschwankungen erfolgte ein Blockschritt zur Reduzierung möglicher unspezifischer Bindungen. Hierfür wurden 150 µl einer Immunoblock-Lösung (Carl Roth T144.1, 1:10 in Aqua dest.) auf den Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Dies sollte die gleichmäßige Verteilung der aufgetragenen Lösung auf der Probe gewährleisten. Die Inkubation des primären Anti-Ki67 Antikörpers (Dako M7240, 1:500 Verdünnung mit Immunoblock) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Schnitte wurden erneut mit einem Deckglas abgedeckt, um ein Verdunsten der Antikörperlösung zu verhindern.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal in PBS für jeweils 10 Minuten unter Verwendung eines Magnetührers gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Die Detektion des primären Ki67-Antikörpers (AK) erfolgte mit Hilfe eines fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers (Goat Anti-mouse, Alexa Fluor 488, 1:1000 in PBS) in einer dunklen Feuchtkammer (Stain tray, Carl Roth) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Ab diesem Schritt wurde lichtgeschützt gearbeitet, um ein Abnehmen der Fluoreszenz durch Autofluoreszenz zu verhindern. Es folgten drei weitere Waschräume in PBS und anschließender Inkubation mit primärem Anti-H2A.J AK (Rabbit Anti-human, 1:200 in Immunoblock) für eine Stunde bei RT. Es schloss sich ein zusätzlicher Waschräume mit PBS an. Zur Visualisierung von H2A.J wurde ein weiterer sekundärer Fluoreszenzantikörper (Goat Anti-rabbit, AlexaFluor 568, 1:1000 in PBS) benutzt der ebenfalls eine Stunde bei RT inkubierte. Es erfolgte ein letzter Waschräume in PBS bevor die Proben in einem aushärtenden Eindeckmedium mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) luftbasenfrei eingedeckt und über Nacht zum Trocknen in den Kühlschrank gelegt wurden.

4.5.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Um den quantitativen Nachweis von H2A.J und Ki67-positiven Zellen mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskop (IFM) zu ermöglichen, bedarf es mehrerer Einzelschritte. Zuerst werden die Proben vorbereitet (siehe oben), um sie für bestimmte Antikörper (AK) zugänglich zu machen. Ein primärer AK wird appliziert und bindet an das gesuchte Antigen. Durch Zugabe eines fluorochrom-gekoppelten Zweitantikörpers findet eine spezifische Bindung an den Primärantikörper statt. Da diese fluoreszierenden Zweitantikörper nicht direkt an das gesuchte Antigen binden, spricht man von indirekter IFM. Fluorochrome sind Moleküle mit besonderen Eigenschaften. Werden sie mit Photonen bestimmter Energie bestrahlt, wird ein Teil der Energie

absorbiert. Anschließend werden Photonen mit geringerer Energie emittiert. Diese Änderung der Wellenlänge hin zum energieärmeren Rot-Spektrum nehmen wir als Fluoreszenz wahr. Dieser fluorochrom-gekoppelte sekundäre AK kann unter Anwendung der IFM sichtbar gemacht werden. Mittels Exzitation des Fluorochroms durch eine Lichtquelle mit geeigneter Wellenlänge, kommt es konsekutiv zu einer Fluoreszenz des sekundären AK. Mit Hilfe geeigneter Filter werden unerwünschte Wellen herausgefiltert und man erhält eine kontrastreiche Abbildung, die die manuell visuelle Auszählung von markierten Zellen ermöglicht. Besitzt das IFM mehrere Filter wie in dem von uns benutzten, sind auch mehrfach Färbungen unterschiedlicher fluorochrom-AK verschiedener Emissionswellenlängen möglich. [46]

Die IFM-Analyse der Proben wurde mit Hilfe eines Nikon Eclipse E600-Mikroskops (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) untersucht. Das kombinierte Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop mit integrierter Kamera (Software NIS Elements BR 3.0; Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) erlaubt sowohl die Untersuchung der Präparate durch die Binokulare als auch die Aufnahme digitaler Bilder durch die Kamera.

Um die beiden proteinspezifisch gebundenen fluoreszierenden Sekundärantikörper getrennt voneinander untersuchen zu können, ist das Mikroskop mit 3 verschiedenen Filtern unterschiedlicher Wellenlängendurchlässigkeit ausgestattet (DAPI: Extinktion (Ex.) 340–380 nm, Emission (Em.) 435–483 nm, FITC: Ex. 465–495 nm, Em. 515–555 nm, TR Ex. 540–580 nm, Em. 600–660 nm). Um Autofluoreszenz und verblassen der Fluorochrome zu verhindern, wurde in abgedunkelten Räumen unter Rotlichtraumbelichtung mikroskopiert.

4.5.6 Auswertung und Statistik

Die Auswertung erfolgte am oben genannten Fluoreszenzmikroskop. Dazu wurden jeweils mindestens 1000 mit DAPI gefärbte Zellkerne pro Präparat quantifiziert. Um einer möglichen Verzerrung entgegenzuwirken, wurden die Proben zuvor verblindet. Anschließend wurden die H2A.J-positiven und Ki67-positiven Zellen unter verblindeten Bedingungen ausgezählt und der jeweiligen Zellschicht (siehe oben) zugeordnet. Die Auszählung der H2A.J positiven Zellen fand im FITC-Kanal (grün; Fluorescein-Isothiocyanate), die der Ki67 positiven Zellen im TR-Kanal (rot; Texas-Red) statt. Die Auswertung und Darstellung erfolgte mittels Excel (Microsoft 365, Version 2113) und Graph Pad Prism Version 9 (GraphPad Software, Inc.). Um potenzielle Schwankungen so gering wie möglich zu halten, wurden einzelne Proben mehrmals ausgezählt und daraus ein Mittelwert gebildet.

Material und Methodik

Die statistische Auswertung erfolgt, aufgrund der überwiegend nicht vorhandenen Normalverteilung (nachgewiesen durch Kolmogorov-Smirnov-Test) der Werte, über den ungepaarten t-Test durch das Programm Graph Pad Prism 9. Dabei gelten Ergebnisse mit einem p-Wert $< 0,05$ ($p < 0,05$) als signifikant.

5 Ergebnisse

5.1 Quantifikation von H2A.J-positiven Keratinozyten

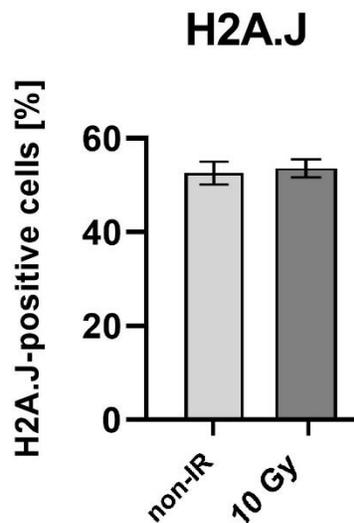
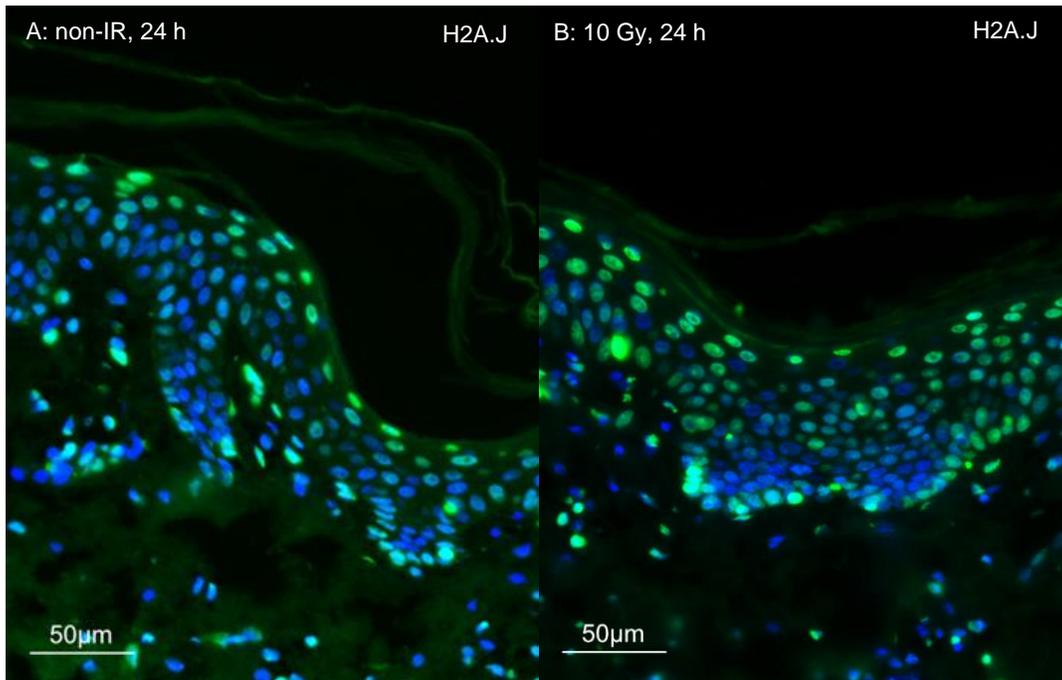


Abbildung 12: H2A.J - IFM humaner präputialer Epidermis ohne Bestrahlung (A; non-IR) und nach Bestrahlung (B; 10 Gy) nach jeweils 24 Stunden. Zu sehen sind mit DAPI (blau) gefärbte Zellkerne und H2A.J-positive Zellen (grün) in 60facher Vergrößerung (Maßstab von 50μm angegeben). Der Graph repräsentiert die Gesamtauswertung von 19 biologischen Replikaten (n = 19) und zugehöriger Standardabweichung (Standard deviation; SD) in Prozent.

Ergebnisse

Bei Betrachtung der Gesamtauswertung H2A.J-positiver Zellen im direkten Vergleich der Versuchsgruppe (10 Gy) mit der Kontrollgruppe (non-IR) 24 Stunden nach Bestrahlung liegt zwar ein geringer Unterschied vor (siehe Graph oben), dieser liegt jedoch nicht im signifikanten Bereich ($p > 0,05$). Die mit 10 Gy bestrahlten Proben (10Gy) zeigten mit $53,6 \pm 1,9\%$ zu $52,6 \pm 2,4\%$ in der nicht bestrahlten Kontrollgruppe (non-IR) keine signifikanten Unterschiede.

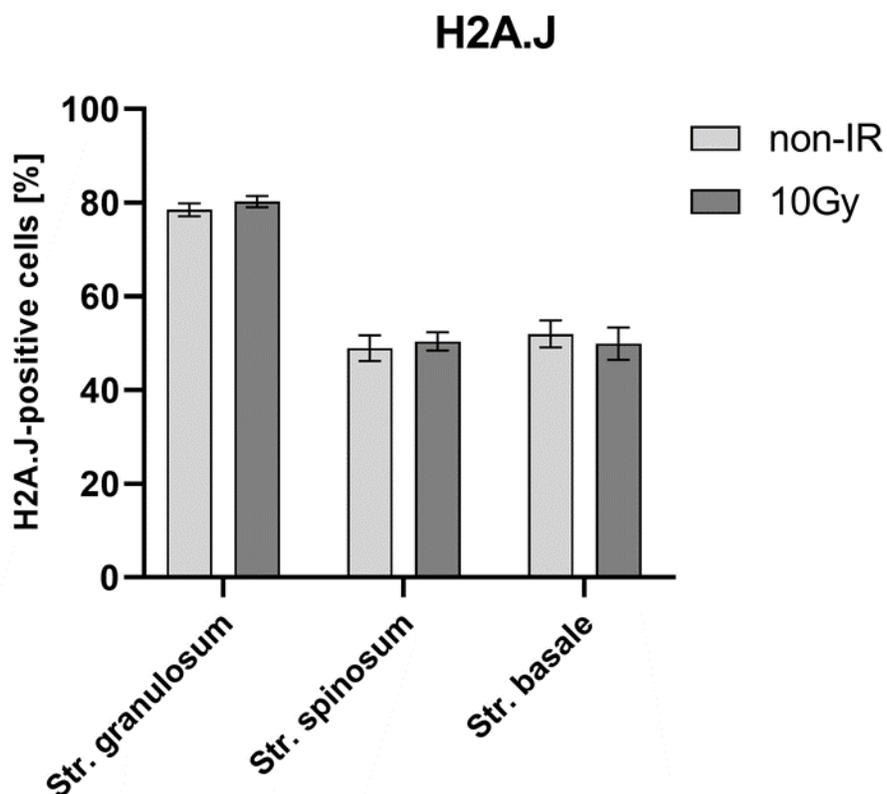


Abbildung 13: Grafische Darstellung der H2A.J-positiven Zellen ohne (non-IR) und nach Bestrahlung (10Gy) in jeweiliger Epidermisschicht nach 24 Stunden und zugehöriger SD in Prozent.

Bei Auswertung der einzelnen Schichten zeigen sich bei Untersuchung der H2A.J-positiven Zellen im direkten Vergleich der Versuchsgruppe (10 Gy) mit der Kontrollgruppe (non-IR) 24 Stunden nach Bestrahlung zwar geringe Unterschiede, diese befinden sich aber nicht im signifikanten Bereich ($p > 0,05$). Im Stratum granulosum, der äußersten Hautschicht die noch Zellkerne enthält, (non-IR: $78,5 \pm 1,4\%$; 10Gy: $80,3 \pm 1,2\%$) zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Auswertung der H2A.J-positiven Zellen. Im Stratum spinosum (non-IR: $49 \pm 2,8\%$; 10Gy: $50,4 \pm 2,0\%$) zeigen sich wie auch im Stratum basale (non-IR: $52 \pm 2,9\%$; 10Gy: $49,9 \pm 3,5\%$) ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Auswertung der H2A.J-positiven Zellen. Jedoch sind im Stratum granulosum, sowohl in der Versuchsgruppe (10 Gy) als auch in der Kontrollgruppe (non-IR), deutlich mehr H2A.J-positiv Zellen nachweisbar als im Stratum spinosum und Stratum basale (siehe Graph).

5.2 Quantifikation Ki67-positiver Keratinozyten

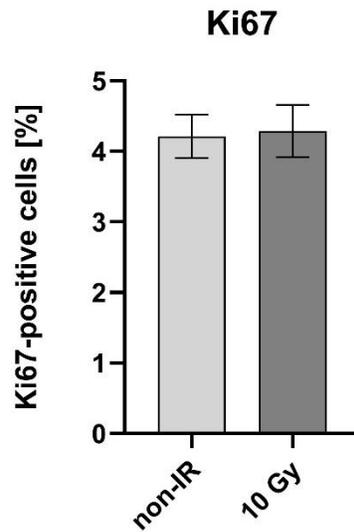
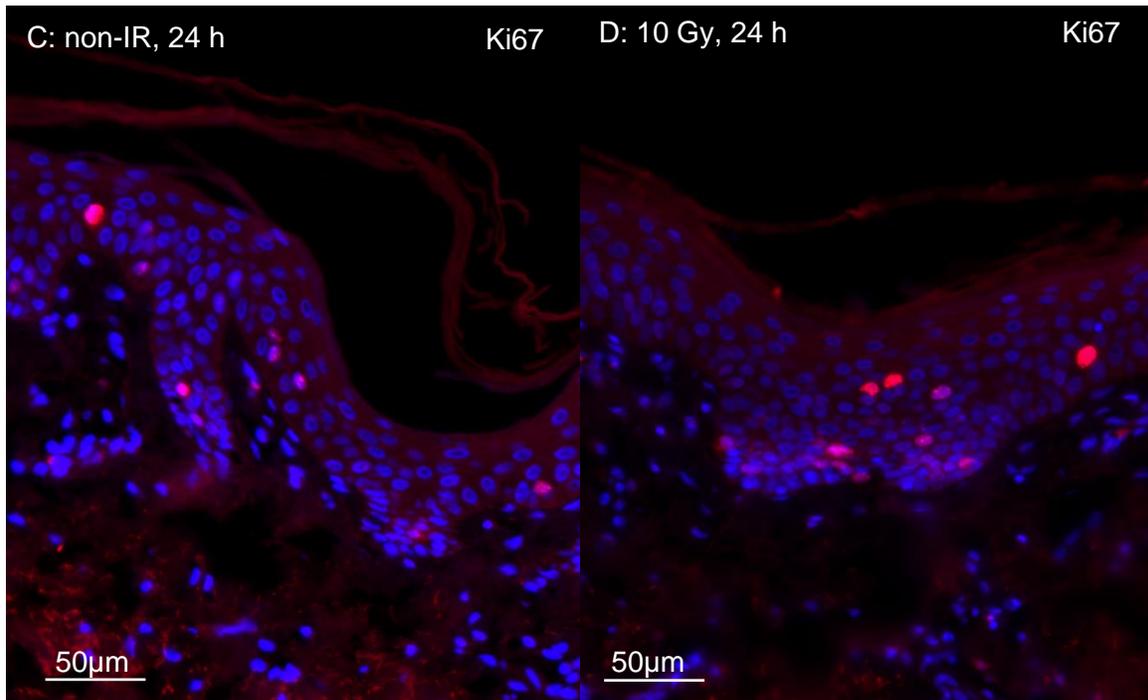


Abbildung 14: Ki67-IFM in humaner präputialer Epidermis ohne Bestrahlung (C; non-IR) und nach Bestrahlung (D; 10Gy) nach jeweils 24 Stunden. Zu sehen sind mit DAPI (blau) gefärbte Zellkerne und Ki67-positive Zellen (rot) in 60facher Vergrößerung (Maßstab von 50µm angegeben). Der Graph repräsentiert die Gesamtauswertung von 19 biologischen Replikaten (n = 19) und zugehöriger SD in Prozent.

Ergebnisse

Bei Betrachtung der Gesamtauswertung der Ki67-positiven Zellen ergibt der direkte Vergleich von Versuchs- und Kontrollgruppe nach 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$) mit $4,2 \pm 0,3\%$ Ki67 positiven Zellen ohne (non-IR) und $4,3 \pm 0,4\%$ nach Bestrahlung (10 Gy).

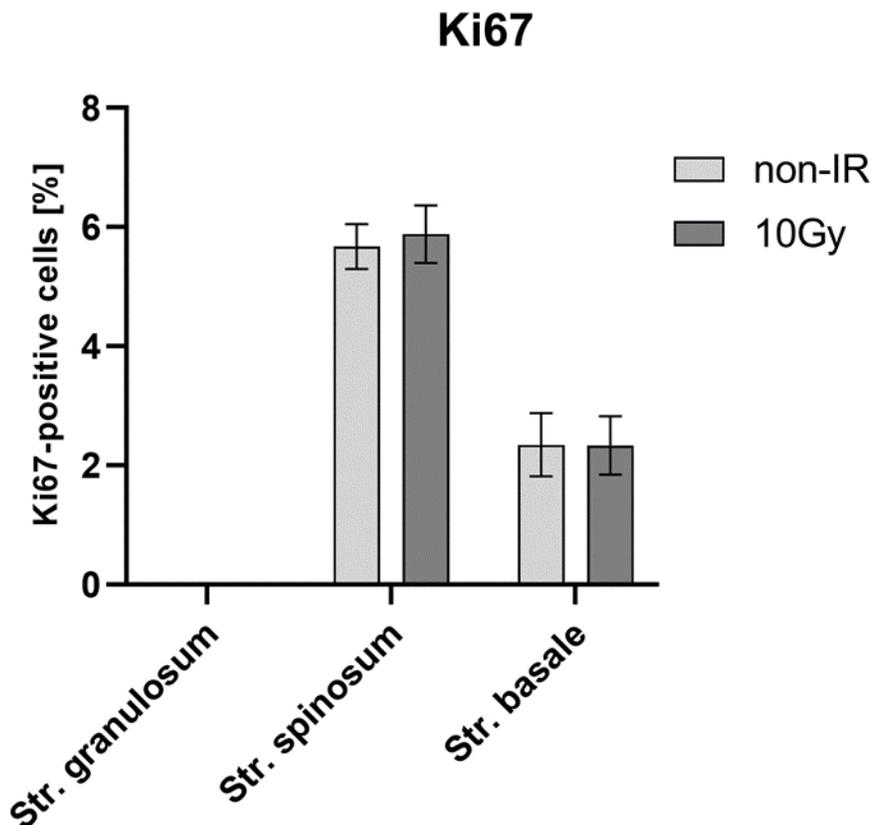


Abbildung 15: Grafische Darstellung der Ki67-positiven Zellen ohne (non-IR) und nach Bestrahlung (10Gy) in jeweiliger Epidermisschicht nach 24 Stunden und zugehöriger SD in Prozent

Bei schichtspezifischer Betrachtung der Ki67-positiven Zellen ergibt der direkte Vergleich von Bestrahlungs- und Kontrollgruppe nach 24 Stunden weder im Stratum spinosum (non-IR: $5,7 \pm 0,4\%$, 10 Gy: $5,9 \pm 0,5\%$) noch im Stratum basale (non-IR: $2,3 \pm 0,5\%$, 10 Gy: $2,3 \pm 0,5\%$) einen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Im Stratum granulosum sind keine Ki67-positiven Keratinozyten nachweisbar. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse keine direkte Korrelation von Ki67 und Bestrahlung mit 10 Gy.

5.3 Inverse Korrelation von H2A.J und Ki67

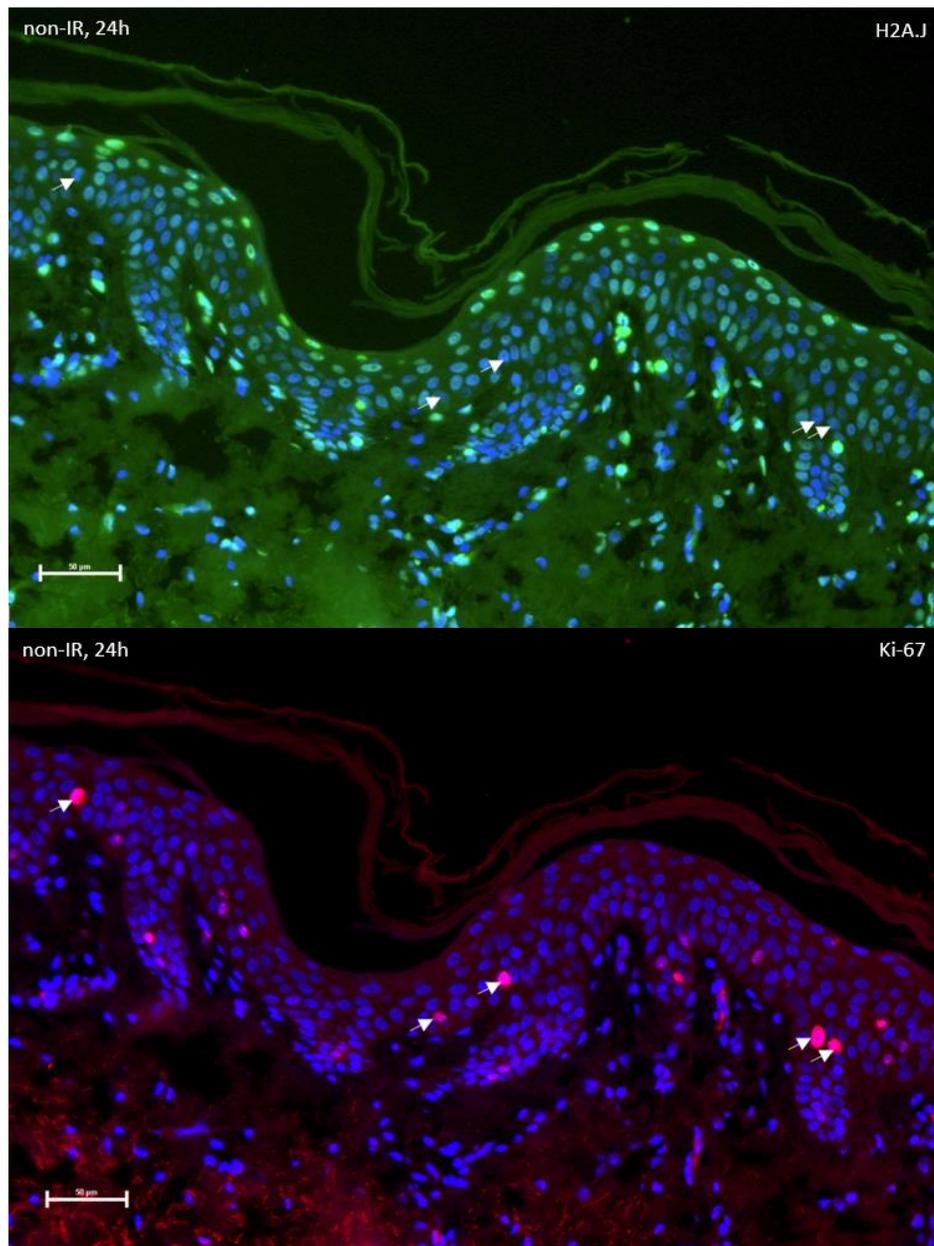


Abbildung 16: H2A.J- und Ki67-IFM in humaner präputialer Epidermis ohne Bestrahlung (non-IR). Zu sehen sind mit DAPI (blau) gefärbte Zellkerne und H2A.J-positive Zellen (grün) sowie Ki67-positive Zellen (rot) in 60facher Vergrößerung (Maßstab von 50µm angegeben). Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch H2A.J-negative aber deutlich Ki67-positive Zellen, um die inverse Korrelation zu veranschaulichen.

Ergebnisse

Bei Abgleich von Ki67-positiven Zellen mit H2A.J fällt eine inverse Korrelation zwischen den zwei Markern auf. Ki67-positive Zellen, sind nie H2A.J positiv und umgekehrt. Angesichts der Tatsache, dass Ki67 Zellkerne mit Proliferationspotential markiert, also Zellen mit noch aktivem Zellzyklus und H2A.J dagegen möglicherweise seneszente Zellen, die unter anderem durch einen Proliferationsstopp gekennzeichnet sind, stehen diese Beobachtungen nicht im Konflikt miteinander. Da vom Stratum germinativum (Stratum basale und Stratum spinosum) hin zum Stratum granulosum das Proliferationspotential und damit die Markierung durch Ki67 stetig abnimmt, im Gegensatz dazu die Markierungsdichte mit H2A.J im Stratum granulosum ihren Höhepunkt hat, könnte diese Beobachtung ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von H2A.J im Rahmen der Differenzierung von Keratinozyten sein.

6 Diskussion

6.1 Interpretation der Ergebnisse

Aufgrund der stetigen Zunahme medizinisch induzierter Anwendungen von ionisierender Strahlung in Diagnostik und Therapie wächst ebenfalls das Interesse an der Ursache und Häufigkeit potenzieller Nebenwirkungen. Bereits bei sehr niedrigen Strahlendosen von 0,1 Gy konnten im Hautmodell strahleninduzierte DSBs nachgewiesen werden [74] die bei nicht- oder fehlerhafter DNA-Reparatur einen möglichen Auslöser prämaturer Seneszenz darstellen. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen dienen der Analyse möglicher Folgen einer Bestrahlung für infantile Haut im Kontext der zellulären Seneszenz. Dafür wurde die Quantifizierung von H2A.J- und Ki67-positiven Zellen innerhalb der Epidermis genutzt, um 24 Stunden nach Bestrahlung Rückschlüsse auf das Ausmaß der zellulären Seneszenz und den Proliferationsstatus zu ziehen.

Die Anzahl H2A.J-positiver Zellen innerhalb der unterschiedlichen Epidermisschichten zeigte keine signifikanten Unterschiede zu unbestrahlten und bestrahlten Proben, die 24 Stunden nach der Bestrahlung analysiert wurden. Bei der detaillierten Betrachtung des Stratum germinativum, der Schicht mit dem größten Proliferationspotenzial der Epidermis, zeigten sich ebenfalls ausschließlich nichtsignifikante Ergebnisse. Bei der weiteren Aufteilung des Stratum germinativum in Stratum basale und Stratum spinosum wurden in der Bestrahlungs- und Kontrollgruppe ähnlich hohe Werte und Standardabweichungen für H2A.J nachgewiesen. Bei der mikroskopischen Analyse des Stratum basale wurden auffällig stark H2A.J-positive Zellen mit hoher Leuchtintensität visualisiert. Diese Zellen stellten sich morphologisch different, rundlicher und meist größer, im Vergleich zu den regulären länglich geformten Basalzellen dar. Zudem waren sie oft knapp unterhalb oder zwischen den regulären basalen Zellen angeordnet. Durch die Validierung mittels Markierung von Melan A wurden diese hochpositiven Zellen als Melanozyten identifiziert und nicht in die Auswertung mit einbezogen. Diese Beobachtungen decken sich mit Erkenntnissen vorangegangener Versuche, in denen durch den Abgleich mit dem Seneszenzmarker p16^{INK4a} das hohe seneszenzente Potenzial der Melanozyten nachgewiesen wurde [93].

Im Stratum granulosum, die am stärksten differenzierte Hautschicht mit gleichzeitig geringstem Proliferationspotenzial, wurde 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 10 Gy keine signifikanten Unterschiede zwischen Bestrahlungs- und Kontrollgruppe nachgewiesen. In dieser Hautschicht

zeigte sich die höchste Anzahl an H2A.J-positiven Keratinozyten im Vergleich zu den anderen Hautschichten, sowohl in den bestrahlten als auch in den unbestrahlten Proben, was ein Hinweis auf Zunahme zellulärer Seneszenz sein kann. Eine mögliche Begründung für die unterschiedliche zellschichtbezogene Reaktion auf die Exposition mit ionisierender Strahlung und der damit verbundenen Zunahme an H2A.J-positiven Zellen könnte die örtliche Lokalisation sein. Als äußerste noch zellkerntragende Hautschicht wird das Stratum granulosum in besonderem Maße durch exogene Noxen beeinflusst. Die ebenfalls in dieser Hautschicht enthaltenen Keratinozyten verlieren im Laufe ihrer Differenzierung die Zellkerne. Die hierbei resultierende Reorganisation des Chromatins könnte das Reparaturpotential der Zelle dahingehend verändern, dass sie vulnerabler gegenüber seneszenzinduzierender DNA-Schäden wird [57].

Ebenfalls ergab der Nachweis Ki67-positiver Zellen in den untersuchten Hautschichten 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 10 Gy keinen signifikanten Unterschied von unbestrahlter Kontrollgruppe zu bestrahlter Versuchsgruppe. Durch eine differenzierte Analyse der einzelnen Hautschichten konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Allerdings wurde bei der schichtspezifischen Betrachtung der Ki67-positiven Zellen ersichtlich, dass nicht-signifikante aber dennoch visuell deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Hautschichten bestehen. Die Anzahl der Ki67-positiven Zellen war im Stratum basale geringer als im Stratum spinosum. Im Stratum granulosum waren keine Ki67-positiven Zellen nachweisbar. Da Ki67 ausschließlich in proliferierenden Zellen vorhanden und nachweisbar war, scheint dieses Ergebnis unter Beachtung der Differenzierung der Keratinozyten wenig überraschend, da die Keratinozyten im Rahmen der Differenzierung ihre Teilungsfähigkeit verlieren.

Durch die quantitative Analyse der Tripelfärbung (DAPI, Ki67, H2A.J) wurde eine inverse Korrelation zwischen Ki67- und H2A.J-positiven Zellen festgestellt. Keine der Ki67-positiven Zellen war auch nur geringfügig positiv für H2A.J und umgekehrt. Dieses Ergebnis scheint plausibel da H2A.J nur Zellen markiert, die ihre Proliferation eingestellt haben und Ki67 im Gegensatz dazu zur Detektion von proliferierenden Zellen herangezogen wird.

6.2 Kritische Auseinandersetzung mit der Methodik

Präputium als Untersuchungsobjekt

In dieser Arbeit wurde das Präputium von Knaben als Untersuchungsgewebe gewählt, um die Wirkung ionisierender Strahlung auf möglichst junge unbelastete Epidermis (keine altersbedingte Seneszenz, keine / kaum UV-Exposition) zu untersuchen. Die bei der Zirkumzision anfallende

Diskussion

Haut erfüllt die Voraussetzungen einer guten Verfügbarkeit und der geringen Vorbelastung durch UV-Strahlung.

Die menschliche Haut stellt mit durchschnittlich 1,73 m² das größte Organ dar und ist zugleich die äußerste Barriere, die den menschlichen Körper gegenüber der Umwelt abgrenzt. Durch ihre Sonderrolle als Schnittstelle zwischen Umwelt und Organismus, ist sie ständig einer Reihe von Noxen ausgesetzt (z.B. ionisierender Strahlung durch natürliche Strahlenexposition oder UV-Strahlung). Durch die unterschiedlichen Funktionen der Haut ist gut nachvollziehbar, dass es topographische Unterschiede in der Zusammensetzung verschiedener Areale gibt. Zudem bestehen intergeschlechtliche, altersabhängige und ethnische Unterschiede [35,72].

Das Präputium scheint sich nicht nur rein makroskopisch, sondern auch funktionell von anderen Hautarealen zu unterscheiden. Hier ist im speziellen der periutheale Bereich zu nennen, der im hohen Maße gegenüber potenziell pathogenen bakteriellen Stimuli exponiert ist. Diese kontinuierliche Stimulation führt zu einer ausgeprägten immunologischen Aktivität in diesem Areal, die sich unter anderem in der großen Anzahl der Langerhanszellen, sowie CD 4⁺ / 8⁺ positiver Zellen (Makrophagen, T- Zellen, Monozyten) widerspiegelt und damit die besondere immunologische Komponente des Präputiums gegenüber anderen Hautarealen hervorhebt [26]. Neben den Immunzellen können auch die Keratinozyten selbst immunologisch aktiv werden, indem sie nach exogenen Stimuli proinflammatorischen Zytokine und chemotaktische Faktoren sezernieren können [6]. Das vielfältige immunologische Spektrum des Präputiums sollte bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden. Besonders beim Vergleich von abdominalen und präputialer Epidermis sollten diese Unterschiede berücksichtigt werden.

Akquirierung der Hautproben

Obgleich versucht wurde möglichst gleiche Bedingungen bei der Akquirierung und Prozessierung der Proben zu schaffen, gab es bei der Entnahme der Hautproben je nach Operateur Unterschiede im zeitlichen Verlauf und im verwendeten Entnahmeverfahren. Dabei erfährt das Gewebe, je nach beruflicher Erfahrung des Operateurs, unterschiedliche Dosen an ischämischem und oxidativem „Stress“ bei der Entnahme aus einer integren Umgebung. Zudem wird die Probe bis zum Abwurf in das Nährmedium nicht perfundiert. Anschließend wird die Hautprobe bei der Präparation durch das Aufspannen und Zurechtschneiden weiterem mechanischem Stress ausgesetzt, da sie dabei aus dem Inkubator und dem Nährmedium entnommen werden muss kann die Versorgung mit Nährstoffen in diesem Zeitraum nicht gewährleistet werden.

Diskussion

Zhou et al. konnten im Tiermodell zeigen, dass es durch *ex-vivo* Kultivierung zu einer ausgeprägten Zytokin-abhängigen Inflammationsreaktion kommen kann [104]. Diese Inflammationsreaktion kann die Homöostase der Zellen in dem Maße stören, dass als Folge prämaturre Seneszenz induziert wird. Dies stellt eine mögliche Erklärung für den Nachweis H2A.J positiver Zellen der präputialen Hautproben dar, die bereits vor Bestrahlung und in den unbestrahlten Kontrollen vorhanden waren. Die in dieser Arbeit angewendeten Kultivierungsmethode wurden aus vorangegangenen Experimenten mit humaner abdomineller Epidermis übernommen. Eine Kultivierung der Hautproben über mehr als 36 Stunden ist nicht gelungen, da nach diesem Zeitraum bereits histomorphologische Veränderungen der Epidermis ersichtlich wurden die als histologische Korrelat eines Gewebeuntergangs gewertet werden könnten. Die Ergebnisse vorangegangener Experimente wurden in abdominalen Hautproben erhoben, die 48 Stunden nach Bestrahlung fixiert wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass sich die Kultivierungsbedingungen und -protokolle für abdominelle Haut nicht direkt auf präputielle Epidermis übertragen lassen.

Bestrahlungsprotokoll

Zur Bestrahlung wurden etablierte, von Medizin-Physik-Experten mittels der Bestrahlungssoftware Pinnacle der Firma Philips berechnete Pläne verwendet. Die Einzeldosis (10 Gy), die im Rahmen dieser Arbeit appliziert wurde, ist fünffach höher als die üblicherweise während einer fraktionierten Radiotherapie angewendete Dosis (1,8 – 2,0 Gy pro Fraktion) und wurde auch in vorangegangenen Versuchen dieser Arbeitsgruppe mit abdominaler Epidermis benutzt. Damit sollte sichergestellt werden, dass eine strahleninduzierte Seneszenz initiiert wird. In vorangegangenen Arbeiten mit Zellkulturen wurden deutliche höhere Einzeldosen von bis zu 20 Gy genutzt.

Gewebeschnitte

Beim Anfertigen der Gewebeschnitte wurde darauf geachtet das Epithel des äußeren Blattes des Präputiums zu sektionieren, da in diesem die Analyse erfolgte. Das Epithel des inneren Blattes des Präputiums gleicht der Mukosa und kann deshalb nicht zum Vergleich mit epidermalen Proben verwendet werden. Da sich die rein mikroskopische Differenzierung von Mukosa und Epidermis zu weilen schwierig gestaltete, wurden Melanozyten, die nur im äußeren Blatt der Epidermis des Präputiums vorkommen, als Indikator genutzt [18]. Der Fixierungszeitpunkt von 24 Stunden nach der Bestrahlung wurde gewählt, um die Auswirkungen auf möglichst physiologische intakte Epidermis zu untersuchen.

Markierung und Nachweis von H2A.J

Zur Detektion seneszenten Zellen wurde ein spezifischer, primärer Antikörper gegen die Histonvariante H2A.J verwendet. Dieser wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Carl Mann zur Verfügung gestellt. Die Validierung auf Spezifität wurde im Rahmen vorangegangener Projekte in muriner und humaner Epidermis von Arbeitsgruppe C.E. Rube durchgeführt, um unspezifische Bindungen an strukturverwandte H2A-Varianten des kanonischen H2A, H2A.X und H2A.Z auszuschließen [79].

Quantifizierung

Insgesamt wurden Proben von 19 Probanden untersucht. Je Proband wurde in 1 - 2 technischen Replikaten jeweils mindestens 1000 Zellkerne in verschiedenen Gesichtsfeldern analysiert und den jeweiligen Hautschichten zugeordnet. Einzelne Proben wurden additiv von verschiedenen Personen quantifiziert, um Auswerter-spezifische Schwankungen so gering wie möglich zu halten. In Anbetracht möglicher individueller Schwankungen bei der Detektion positiver Zellen wäre die Etablierung eines automatisierten Auswertungssystems eine weitere Möglichkeit die Aussagekraft zukünftiger Arbeiten zu steigern.

6.3 H2A.J-Quantifizierung und die Vergleichbarkeit mit vorausgegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe

In einer Arbeit der Arbeitsgruppe Contrepolis wurde gezeigt, dass sich H2A.J in seneszenten Fibroblasten mit permanenten DNA-Schäden, sowie in humaner Epidermis mit fortschreitendem Alter anreichert [20]. Die dabei nachgewiesene Korrelation von persistierenden DNA-Schäden und der Anhäufung von H2A.J, gibt Hinweise darauf, dass die DDR und die damit verbundenen DNA-Schadenssignale die H2A.J-Konzentration regulieren können. Die Akkumulation von H2A.J in nachweislich seneszenten Fibroblasten und epidermalen Keratinozyten legt nahe, dass H2A.J als potenzieller Biomarker für den Zustand der Seneszenz dienen könnte. Die Untersuchung von H2A.J und seinen Eigenschaften als potenzieller Seneszenzmarker in humaner Epidermis ist von großem wissenschaftlichem Interesse, da es bis dato noch keinen vergleichbaren Marker gibt, mit dem man strahlungsinduzierte senescente Zellen in verschiedenen Geweben und Stadien identifizieren und quantifizieren kann. Daneben gibt es Hinweise darauf, dass H2A.J möglicherweise als Differenzierungsmarker humaner Keratinozyten fungieren könnte.

Diskussion

In vorangegangenen Versuchen in der Arbeitsgruppe C.E. Rube wurde gezeigt, dass mit zunehmendem chronologischem Alter und nach Exposition gegenüber DNA-schädigender Strahlung H2A.J-positive Zellen in humaner abdomineller Epidermis akkumulieren. Dabei konnte eine positive Korrelation sowohl zwischen Probandenalter und Zunahme H2A.J positiver Zellen, als auch dem Auftreten dauerhafter DNA-Schädigung in Form von DSBs und der Akkumulation H2A.J-positiver Keratinozyten nachgewiesen werden [20,79].

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der Arbeitsgruppe C.E. Rube bezüglich der Epidermis wird ersichtlich, dass der prozentuale Anteil H2A.J-positiver Zellen der unbestrahlten Hautproben in der Altersklasse 1 – 10 Jahren (53%) über den in Vorarbeiten erhobenen Werten (Altersklasse 18 – 30 Jahren \approx 20%) liegen. Auch die schichtspezifische Anhäufung von H2A.J weicht von den Ergebnissen vorangegangener Arbeiten ab. In dieser Arbeit wurde der höchste prozentuale Anteil an H2A.J-positiven Keratinozyten im Stratum granulosum nachgewiesen, wohingegen er in vorangegangenen Versuchen im Stratum spinosum nachweisbar war. Die Ergebnisse nach Bestrahlung sind ebenfalls divergent zu den zuvor erhobenen Ergebnissen für humane abdominelle Epidermis. Unterschiede innerhalb der Versuche gab es bei den verschiedenen Auswertzeitpunkten. In den Versuchen dieser Arbeit wurden die Proben 24 Stunden nach Bestrahlung fixiert und analysiert, in vorangegangenen Arbeiten nach 48 - 72 Stunden. Zur Validierung der Ergebnisse wäre ein Abgleich mit bereits etablierten *ex-vivo* Biomarkern wie β -GAL oder p16^{INK4a} denkbar. Eine Doppelmarkierung humaner Epidermis mit Antikörpern gegen H2A.J und p16^{INK4a} konnte bis dato noch nicht etabliert werden. Selbst wenn verschiedene seneszente Zelltypen gemeinsame Biomarker besitzen, können verschiedene Subpopulationen der Haut je nach Zelltyp, Lokalisation und Gewebekontext aufgrund unterschiedlicher molekularer Pfade spezifische seneszente Phänotypen entwickeln. Folglich wäre die Verwendung mehrerer etablierter Marker erforderlich, um seneszente Zustände adäquat zu identifizieren und zu beschreiben [79]. Die Ergebnisse dieser Arbeit weichen größtenteils von dem Konsens der zuvor erhobenen Ergebnisse ab, da möglicherweise die vorher erlangten Erkenntnisse nicht direkt und uneingeschränkt auf das junge Probandenklientel und präputiale Epidermis übertragbar sind.

Die H2A-Familie stellt mit 19 Mitgliedern die größte und funktionell vielfältigste Klasse der Histone dar [42,55]. Bei 11 dieser Mitglieder handelt es sich um kanonische Varianten, die sich untereinander in nur wenigen Aminosäuren unterscheiden. Die übrigen 8 Subtypen (H2A.X, H2A.Z, macro-H2A, short-H2A, H2A.W, H2A.M, H2A.1, H2A.J) sind in ihrer Aminosäuresequenz und funktionellen Spezialisierung deutlich divergenter und das vor allem in den C- und N-terminalen Enden. Die Heterogenität der C-Termini scheint eine Schlüsselkomponente für die

Diskussion

funktionelle Vielfalt der einzelnen Histonsubtypen zu sein [5,58]. Dies gilt in besonderen Maße auch für die hier untersuchte Histonvariante H2A.J. Tanaka et al. zeigten, dass das C-terminale Ende der Histonvariante H2A.J die strukturellen Integrität des Nukleosoms nicht beeinflusst, sondern eher eine Anlaufstelle für verschiedene Expressionsfaktoren darstellt [86].

Der Großteil der bisher erhobenen H2A.J Daten stammt, bis auf wenigen Ausnahmen (siehe Arbeitsgruppe C.E. Rube), von Fibroblasten in Zellkultur. Im Gegensatz dazu finden sich in der Literatur nur wenig vergleichbare Untersuchungen in lebenden heterogenen Geweben wie der Epidermis. Dies mag der Tatsache geschuldet sein, dass die Detektion seneszenten Zellen im lebenden Organismus ungleich schwieriger und technisch limitiert ist. Die technische Limitation bereits bekannter Biomarker zeigt die klinische Relevanz eines effektiven und potenziell gewebeunabhängigen Seneszenzmarkers auf.

Unabhängig von der Bestrahlung nimmt die Verteilung der H2A.J-positiven Zellen ausgehend vom Stratum germinativum zum Stratum granulosum innerhalb der Epidermis zu. Diese Beobachtung könnte mitunter die auf dem Weg vom Stratum basale zum Stratum corneum stattfindenden Chromatinumlagerungen während der physiologischen Differenzierung humaner Keratinozyten widerspiegeln. Zudem besteht die Möglichkeit, dass H2A.J den terminalen Differenzierungsvorgang fördern könnte. Insgesamt scheint die erhöhte H2A.J-Expression in den differenzierten Epidermisschichten ein Hinweis für ein verringertes Proliferationspotential im Rahmen der fortgeschrittenen Differenzierung zu sein [79]. Um die Eignung von H2A.J als potentiellen Differenzierungsmarker zu prüfen bedarf es weiterer Untersuchungen und dem Abgleich mit etablierten epidermalen Differenzierungsmarkern wie z.B. Involucrin, einem löslichen Proteinvorläufer der vernetzten Hülle terminal differenzierter Keratinozyten in zukünftigen Arbeiten [25,97].

Komplementär zur Zunahme H2A.J positiver Zellen im Stratum granulosum, weist die Abwesenheit Ki67-positiver in dieser Zellschicht auf den physiologischen Proliferationsstopp im Laufe der Differenzierung hin. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben bezüglich quantitativer Expression von Ki67 in menschlicher Haut abhängig von deren Lokalisation und chronologischem Alter [69,73,92]. Besonders in Hinblick auf das junge gesunde Spenderkollektiv dieser Arbeit (n = 19, Alter 1 – 10 Jahre) gibt es kaum vergleichbare Angaben. Die exemplarischen Doppelmarkierung (siehe Abbildung 16, weiße Pfeile) mit H2A.J und Ki67 zeigt eindeutig eine inverse Korrelation. Dieses Ergebnis legt nahe, dass H2A.J nur in nicht mehr proliferierenden Zellen exprimiert wird, was im Einklang mit Ergebnissen vorangegangener Arbeiten steht [79].

6.4 Klinische Relevanz

Aufgrund der stetig steigenden Bedeutung der Radiotherapie und der hierbei angewendeten ionisierenden Strahlung im Rahmen interdisziplinärer Krankheitsbilder, steigt ebenso das Interesse an möglichen Nebenwirkungen. Obgleich diese Form der Therapie in vielen Fällen zu einer adäquaten Tumor- / Krankheitskontrolle führt, gibt es nicht zu vernachlässigende Nebenwirkungen, besonders für das unmittelbar angrenzende gesunde Gewebe, welches sich oftmals mit im Strahlenfeld befindet. Selbst durch deutliche geringere Dosen als die in dieser Arbeit verwendeten, werden DSBs induziert, die bei Überschreiten der Reparaturkapazität einen möglichen Auslöser prämaturer Seneszenz darstellen [74]. Aufgrund der erhaltenen metabolischen Aktivität und dem inflammationsfördernden SASP steigt das Entartungsrisiko unmittelbar benachbarter Zellen, wenn seneszente Zellen nicht konsequent durch immunologisch aktive Zellen aus dem Organismus entfernt werden. Darüber hinaus unterbindet die seneszente Zelle durch ihren Proliferationsstopp jegliche Weitergabe fehlerhafter DNA an die Tochterzelle und erfüllt dadurch eine wichtige Funktion im Kontext der Tumorsuppression [19,21,47,82]. Die Fähigkeit des Immunsystems seneszente Zellen chemotaktisch zu erkennen und zu entfernen, scheint mit steigendem Alter abzunehmen. Die Erforschung und Entwicklung von Prozessen mit dem Fokus der Eliminierung seneszenten Zellen aus dem Zellverbund (Senolytika) hat mit der Inhibition von Mitgliedern der BCL-2-Familie und der Anwendung von P19^{ARF}-Antikörpern in muriner Haut bereits erste Erfolge verzeichnen können [15,102].

Neben adulten Patienten bedarf es im Rahmen bestimmter onkologischer Erkrankungen auch der radiotherapeutischen Behandlung pädiatrischer Patienten mit all ihren Konsequenzen. Neuesten Arbeiten zufolge ist die Verteilung seneszenten Zellen, vermutlich aufgrund oben genannter Vorgänge, in den jeweiligen Altersgruppen unterschiedlich [79]. Aus diesem Grund ist die Erforschung seneszenten Abläufe, gerade im Hinblick auf das geringe Alter pädiatrischer Patienten und dem damit verbundenen Malignitätspotenzial im Zusammenhang mit ionisierender Strahlung und verbleibender Lebenszeit von großem Interesse [88]. Die Ergebnisse können im Kontext der Altersgruppen genutzt werden, um etwaige altersabhängige Prozesse zu beleuchten. Um die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der zellulären Seneszenz voranzutreiben und die Etablierung adäquater Senolytika zu fördern, bedarf es jedoch einem universell einsetzbaren Biomarker, der die zugrundeliegenden Zusammenhänge von Seneszenz und Tumorgenese/-suppression darstellt.

6.5 Zusammenfassende Interpretation

Zusammenfassend konnte anhand der erhobenen Ergebnisse kein Hinweis auf eine Korrelation zwischen Bestrahlung und der H2A.J-vermittelten Seneszenz in humaner präputialer Epidermis gefunden werden. Es waren keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollgruppen und den bestrahlten Versuchsgruppen (24 Stunden nach Bestrahlung) nachweisbar. Die schichtspezifische bestrahlungsunabhängige Verteilung von H2A.J gibt Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen H2A.J und der physiologischen Differenzierung der Keratinozyten. Um die erlangten Ergebnisse im Kontext der bereits gewonnenen Erkenntnisse einordnen zu können bedarf es weiterer Untersuchungen auf dem Gebiet der H2A.J-vermittelten Seneszenz und der Korrelation von H2A.J im Zusammenhang mit der Differenzierung von Keratinozyten.

7 Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen, Literatur und Abkürzungen

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Veranschaulichung des direkten und indirekten Strahleneffekts (modifiziert nach Hall EJ, Giaccia AJ, Radiobiology for the Radiologist, 2016).....	9
Abbildung 2: Homologe Rekombination (modifiziert nach Hall EJ & Giaccia AJ, Radiobiology for the Radiologist, 2016)	11
Abbildung 3: Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung (modifiziert nach Hall EJ & Giaccia AJ, Radiobiology for the Radiologist, 2016).....	13
Abbildung 4: Histon-Oktamer (nach Luger, Mäder, R.K. Richmond, Sargent, T. J. Richmond Crystal structure of the nucleosomecore particle at 2.8 A resolution, 1997)	17
Abbildung 5:Kondensationsstufen der DNA (nach Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9. Auflage, 2014)	18
Abbildung 6: Kanonisches Kernhiston H2A (nach Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 9. Auflage, 2014)	19
Abbildung 7: Nukleosom (nach Tanaka et al., Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J, The Journal of Biochemistry,2020)	21
Abbildung 8: Schichten der Epidermis (nach Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie, 6.Auflage, 2019).....	22
Abbildung 9: Männliche Vorhaut in Elastin trichrome Färbung (nach C.J. Cold and J.R. Taylor „The prepuce“)	25
Abbildung 10: Multi-Well-Platte und Inserts (modifiziert nach Falcon® Cell Culture Inserts and Companion Plates, www.cultek.com)	34

Verzeichnis

Abbildung 11: Bestrahlungsplan mit 6-Well-Platte und Insert. Auszug aus Pinnacle ³ (Philips GmbH, Amsterdam).....	35
Abbildung 12: H2A.J-IFM in humaner präputialer Epidermis.....	40
Abbildung 13: Grafische Darstellung der H2A.J-positiven Zellen in jeweiliger Epidermisschicht nach 24 Stunden.....	41
Abbildung 14: Ki67-IFM in humaner präputialer Epidermis.....	42
Abbildung 15: Grafische Darstellung der Ki67-positiven Zellen in jeweiliger Epidermisschicht nach 24 Stunden.....	43
Abbildung 16: H2A.J- und Ki67-IFM in humaner präputialer Epidermis ohne Bestrahlung (non-IR) nach jeweils 24 Stunden.....	44

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verwendete Geräte und Materialien	28
Tabelle 2: Chemikalien und Antikörper.....	29
Tabelle 3: Angesetzte Lösungen.....	31
Tabelle 4: Probandendaten	32

7.3 Literaturverzeichnis

1. Allen TD, Potten CS (1975) Desmosomal form, fate, and function in mammalian epidermis. *Journal of Ultrastructure Research* 51:94–105
2. Allisy A, Jennings WA, Kellerer AM, Müller JW, Rossi HH, Seltzer SM (1998) Fundamental Quantities and Units for Ionizing Radiation. Reports of the International Commission on Radiation Units and Measurements os-31:1–1
3. Arda O, Göksügür N, Tüzün Y (2014) Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology* 32:3–13
4. Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *PNAS* 88:10148–10152
5. Ausió J, Abbott DW (2002) The Many Tales of a Tail: Carboxyl-Terminal Tail Heterogeneity Specializes Histone H2A Variants for Defined Chromatin Function. *Biochemistry* 41:5945–5949
6. Barker JNWN, Griffiths CEM, Nickoloff BJ, Mitra RS, Dixit VM, Nickoloff BJ (1991) Keratinocytes as initiators of inflammation. *The Lancet* 337:211–214
7. Bassing CH, Alt FW (2004) The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Repair* 3:781–796
8. Baumann P, Benson FE, West SC (1996) Human Rad51 Protein Promotes ATP-Dependent Homologous Pairing and Strand Transfer Reactions In Vitro. *Cell* 87:757–766
9. Blackburn EH, Epel ES, Lin J (2015) Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science* 350:1193–1198
10. Braig M, Lee S, Loddenkemper C, Rudolph C, Peters AHFM, Schlegelberger B, Stein H, Dörken B, Jenuwein T, Schmitt CA (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* 436:660–665
11. Brody I (1960) The ultrastructure of the tonofibrils in the keratinization process of normal human epidermis. *Journal of Ultrastructure Research* 4:264–297
12. Budman J, Kim SA, Chu G (2007) Processing of DNA for Nonhomologous End-joining Is Controlled by Kinase Activity and XRCC4/Ligase IV. *J Biol Chem* 282:11950–11959
13. Burma S, Chen BPC, Chen DJ (2006) Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair* 5:1042–1048
14. Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ (2018) Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature* 562:578–582
15. Chang J, Wang Y, Shao L, Laberge R-M, Demaria M, Campisi J, Janakiraman K, Sharpless NE, Ding S, Feng W, Luo Y, Wang X, Aykin-Burns N, Krager K, Ponnappan U, Hauer-

Verzeichnis

- Jensen M, Meng A, Zhou D (2016) Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat Med* 22:78–83
16. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Paolo Pandolfi P (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436:725–730
 17. Childs BG, Baker DJ, Wijshake T, Conover CA, Campisi J, Deursen JM van (2016) Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* 354:472–477
 18. Cold CJ, Taylor JR (2002) The prepuce: THE PREPUCE. *BJU International* 83:34–44
 19. Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M (2005) Senescence in premalignant tumours. *Nature* 436:642–642
 20. Contrepois K, Coudereau C, Benayoun BA, Schuler N, Roux P-F, Bischof O, Courbeyrette R, Carvalho C, Thuret J-Y, Ma Z, Derbois C, Nevers M-C, Volland H, Redon CE, Bonner WM, Deleuze J-F, Wiel C, Bernard D, Snyder MP, Rube CE, Olaso R, Fenaille F, Mann C (2017) Histone variant H2A.J accumulates in senescent cells and promotes inflammatory gene expression. *Nat Commun* 8:
 21. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J (2010) The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5:99–118
 22. Coulombe PA (2016) Discovery of keratin function and role in genetic diseases: the year that 1991 was. *MBoC* 27:2807–2810
 23. Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D’Arca D (2016) ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016:e3565127
 24. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge R-M, Vijg J, Van Steeg H, Dollé MET, Hoeijmakers JHJ, de Bruin A, Hara E, Campisi J (2014) An Essential Role for Senescent Cells in Optimal Wound Healing through Secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell* 31:722–733
 25. Eckert RL, Yaffe MB, Crish JF, Murthy S, Rorke EA, Welter JF (1993) Involucrin--Structure and Role in Envelope Assembly. *Journal of Investigative Dermatology* 100:613–617
 26. Fahmy MAB (2020) *Histology of the Prepuce*. Springer International Publishing, Cham. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-030-37621-5_6
 27. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* 31:13–20

28. Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai X-M, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M (2006) Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nature Immunology* 7:265–273
29. Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, Gil J, Hara E, Krizhanovsky V, Jurk D, Maier AB, Narita M, Niedernhofer L, Passos JF, Robbins PD, Schmitt CA, Sedivy J, Vougas K, von Zglinicki T, Zhou D, Serrano M, Demaria M (2019) Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell* 179:813–827
30. Hall EJ, Giaccia AJ (2012) *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins
31. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 25:585–621
32. Heenen M, Thiriar S, Noël J-C, Galand P (1998) Ki-67 Immunostaining of Normal Human Epidermis: Comparison with ³H-Thymidine Labelling and PCNA Immunostaining. *Dermatology* 197:123–126
33. Heidebrecht HJ, Buck F, Haas K, Wacker HH, Parwaresch R (1996) Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Proliferation* 29:413–425
34. Heinrich PC, Mueller M, Graeve L, Herausgeber (2014) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. 9. edition. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
35. Hoffmann K, Stuücker M, Dirschka T, Goörtz S, El-Gammal S, Dirting K, Hoffmann A, Altmeyer P (1994) Twenty MHz B-scan sonography for visualization and skin thickness measurement of human skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 3:302–313
36. Iizuka M, Smith MM (2003) Functional consequences of histone modifications. *Current Opinion in Genetics & Development* 13:154–160
37. Isermann A, Mann C, Rube CE (2020) Histone Variant H2A.J Marks Persistent DNA Damage and Triggers the Secretory Phenotype in Radiation-Induced Senescence. *Int J Mol Sci* 21:
38. Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23:687–696
39. Jeggo PA (1998) Identification of Genes Involved in Repair of DNA Double-Strand Breaks in Mammalian Cells. *Radiation Research* 150:S80–S91
40. Kamakaka RT (2005) Histone variants: deviants? *Genes & Development* 19:295–316
41. Khan AQ, Travers JB, Kemp MG (2018) Roles of UVA Radiation and DNA Damage Responses in Melanoma Pathogenesis. *Environ Mol Mutagen* 59:438–460
42. Khare SP, Habib F, Sharma R, Gadewal N, Gupta S, Galande S (2012) Histone—a relational knowledgebase of human histone proteins and histone modifying enzymes. *Nucleic Acids Research* 40:D337–D342

Verzeichnis

43. Kiefer J (2013) *Biologische Strahlenwirkung: Eine Einführung in die Grundlagen von Strahlenschutz und Strahlenanwendung*. Springer-Verlag
44. Kornberg RD, Lorch Y (1999) Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome. *Cell* 98:285–294
45. Krieger H (1998) *Grundlagen zur Strahlenbiologie*. Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-663-11534-2_9
46. Kubitscheck U (2017) *Fluorescence Microscopy: From Principles to Biological Applications*. John Wiley & Sons
47. Lau L, David G (2019) Pro- and anti-tumorigenic functions of the senescence-associated secretory phenotype. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 23:1041–1051
48. Lavin MF, Kozlov S (2007) DNA damage-induced signalling in ataxia-telangiectasia and related syndromes. *Radiotherapy and Oncology* 83:231–237
49. Lee S, Schmitt CA (2019) The dynamic nature of senescence in cancer. *Nat Cell Biol* 21:94–101
50. Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4:712–720
51. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR (1991) Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. *Cytometry* 12:42–49
52. Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389:251–260
53. Mahaney BL, Meek K, Lees-Miller SP (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochemical Journal* 417:639–650
54. Mangelinck A, Coudereau C, Courbeyrette R, Ouararhni K, Hamiche A, Redon CE, Bonner WM, Van Dijk E, Derbois C, Olaso R, Deleuze J-F, Fenaille F, Ruebe CE, Thuret J-Y, Mann C (2020) The H2A.J histone variant contributes to Interferon-Stimulated Gene expression in senescence by its weak interaction with H1 and the derepression of repeated DNA sequences. *Genetics* URL: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.10.29.361204>
55. Maze I, Noh K-M, Soshnev AA, Allis CD (2014) Every amino acid matters: essential contributions of histone variants to mammalian development and disease. *Nature Reviews Genetics* 15:259–271
56. Mazón G, Mimitou EP, Symington LS (2010) SnapShot: Homologous Recombination in DNA Double-Strand Break Repair. *Cell* 142:648.e1-648.e2
57. Miyake T, Shimada M, Matsumoto Y, Okino A (2019) DNA Damage Response After Ionizing Radiation Exposure in Skin Keratinocytes Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* 105:193–205

58. Molaro A, Drinnenberg IA (2018) Studying the Evolution of Histone Variants Using Phylogeny. Springer, New York, NY. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8663-7_15
59. Montagna W (1965) THE SKIN. *Scientific American* 212:56–69
60. Muñoz-Espín D, Serrano M (2014) Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15:482–496
61. Musi N, Valentine JM, Sickora KR, Baeuerle E, Thompson CS, Shen Q, Orr ME (2018) Tau protein aggregation is associated with cellular senescence in the brain. *Aging Cell* 17:e12840
62. Nguyen AV, Soulika AM (2019) The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci* 20:
63. Noy A, Sutthibutpong T, A Harris S (2016) Protein/DNA interactions in complex DNA topologies: expect the unexpected. *Biophys Rev* 8:233–243
64. Okoji UK, Taylor SC, Lipoff JB Equity in skin typing: why it's time to replace the Fitzpatrick scale. *British Journal of Dermatology* n/a:
65. Old RW, Woodland HR (1984) Histone genes: Not so simple after all. *Cell* 38:624–626
66. Pathak MA, Jimbow K, Szabo G, Fitzpatrick TB (1976) Sunlight and Melanin Pigmentation. Springer US, Boston, MA. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2574-1_5
67. Paull TT, Lee J-H (2005) The Mre11/Rad50/Nbs1 Complex and Its Role as a DNA Double-Strand Break Sensor for ATM. *Cell Cycle* 4:737–740
68. Petrini JHJ, Stracker TH (2003) The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends in Cell Biology* 13:458–462
69. Petrovic A, Petrovic V, Milojkovic B, Nikolic I, Jovanovic D, Antovic A, Milic M (2018) Immunohistochemical distribution of Ki67 in epidermis of thick glabrous skin of human digits. *Arch Dermatol Res* 310:85–93
70. Philips DM, Herausgeber (1971) Histones and Nucleohistones. Springer US
71. Rangasamy, Greaves, Tremethick RNA interference demonstrates a novel role for H2A.Z in chromosome segregation | *Nature Structural & Molecular Biology*. URL: <https://www.nature.com/articles/nsmb786>
72. Rawlings AV (2006) Ethnic skin types: are there differences in skin structure and function?1. *International Journal of Cosmetic Science* 28:79–93
73. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, Wlaschek M (2006) p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell* 5:379–389
74. Revenco T, Lapouge G, Moers V, Brohée S, Sotiropoulou PA (2017) Low Dose Radiation Causes Skin Cancer in Mice and Has a Differential Effect on Distinct Epidermal Stem Cells. *STEM CELLS* 35:1355–1364

Verzeichnis

75. Riballo E, Woodbine L, Stiff T, Walker SA, Goodarzi AA, Jeggo PA (2009) XLF-Cernunnos promotes DNA ligase IV–XRCC4 re-adenylation following ligation. *Nucleic Acids Research* 37:482–492
76. Riley PA (1997) Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 29:1235–1239
77. Rodier F, Muñoz DP, Teachenor R, Chu V, Le O, Bhaumik D, Coppé J-P, Campeau E, Beauséjour CM, Kim S-H, Davalos AR, Campisi J (2011) DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *Journal of Cell Science* 124:68–81
78. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999) Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo. *Journal of Cell Biology* 146:905–916
79. Rübe CE, Bäumer C, Schuler N, Isermann A, Schmal Z, Glanemann M, Mann C, Scherthan H (2021) Human skin aging is associated with increased expression of the histone variant H2A.J in the epidermis. *npj Aging and Mechanisms of Disease* 7:1–11
80. Rupnik A, Lowndes NF, Grenon M (2010) MRN and the race to the break. *Chromosoma* 119:115–135
81. San Filippo J, Sung P, Klein H (2008) Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Review of Biochemistry* 77:229–257
82. Serrano M (2011) Final act of senescence. *Nature* 479:481–482
83. Sherr CJ, DePinho RA (2000) Cellular Senescence: Minireview Mitotic Clock or Culture Shock? *Cell* 102:407–410
84. Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Reviews Cancer* 3:155–168
85. Song B, Sung P (2000) Functional Interactions among Yeast Rad51 Recombinase, Rad52 Mediator, and Replication Protein A in DNA Strand Exchange*. *Journal of Biological Chemistry* 275:15895–15904
86. Tanaka H, Sato S, Koyama M, Kujirai T, Kurumizaka H (2020) Biochemical and structural analyses of the nucleosome containing human histone H2A.J. *The Journal of Biochemistry* 167:419–427
87. Taylor JR, Lockwood AP, Taylor AJ (1996) The prepuce: specialized mucosa of the penis and its loss to circumcision. *British Journal of Urology* 77:291–295
88. Timmermann B, Dieckmann K (2018) *Strahlentherapie*. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-662-43686-8_14
89. Ting NSY, Lee W-H (2004) The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever. *DNA Repair* 3:935–944

90. Tse C, Sera T, Wolffe AP, Hansen JC (1998) Disruption of Higher-Order Folding by Core Histone Acetylation Dramatically Enhances Transcription of Nucleosomal Arrays by RNA Polymerase III. *Molecular and Cellular Biology* 18:4629–4638
91. van Deursen JM (2014) The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509:439–446
92. Van Erp PEJ, De Mare S, Rijzewijk JJ, Van De Kerkhof PCM, Bauer FW (1989) A sequential double immunoenzymic staining procedure to obtain cell kinetic information in normal and hyperproliferative epidermis. *Histochem J* 21:343–347
93. Victorelli S, Lagnado A, Halim J, Moore W, Talbot D, Barrett K, Chapman J, Birch J, Ogrodnik M, Meves A, Pawlikowski JS, Jurk D, Adams PD, van Heemst D, Beekman M, Slagboom PE, Gunn DA, Passos JF (2019) Senescent human melanocytes drive skin ageing via paracrine telomere dysfunction. *The EMBO Journal* 38:e101982
94. Wang H, Wang Z, Huang Y, Zhou Y, Sheng X, Jiang Q, Wang Y, Luo P, Luo M, Shi C (2020) Senolytics (DQ) Mitigates Radiation Ulcers by Removing Senescent Cells. *Front Oncol* 9:
95. Ward JF, Blakely WF, Joner EI (1985) Mammalian Cells Are Not Killed by DNA Single-Strand Breaks Caused by Hydroxyl Radicals from Hydrogen Peroxide. *Radiation Research* 103:383–392
96. Ward JF (1995) Radiation Mutagenesis: The Initial DNA Lesions Responsible. *Radiation Research* 142:362–368
97. Watt FM (1983) Involucrin and Other Markers of Keratinocyte Terminal Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology* 81:S100–S103
98. Weber K-J, Wenz F (2013) *Strahlenbiologische Grundlagen*. Springer, Berlin, Heidelberg. URL: https://doi.org/10.1007/978-3-540-88305-0_3
99. Weiss C (1966) Motives for male circumcision among preliterate and literate peoples. *Journal of Sex Research* 2:69–88
100. Weterings E, Verkaik NS, Brüggewirth HT, Hoeijmakers JHJ, van Gent DC (2003) The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends. *Nucleic Acids Research* 31:7238–7246
101. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J-C, Wong JK (2016) The dynamic anatomy and patterning of skin. *Experimental Dermatology* 25:92–98
102. Yosef R, Pilpel N, Tokarsky-Amiel R, Biran A, Ovadya Y, Cohen S, Vadai E, Dassa L, Shahar E, Condiotti R, Ben-Porath I, Krizhanovsky V (2016) Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* 7:11190
103. Yousef H, Alhajj M, Sharma S (2020) *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
104. Zhou H-M, Slominski RM, Seymour LJ, Bell MC, Dave P, Atumonye J, Wright W, Dawes A, Griesenauer B, Paczesny S, Kaplan MH, Spandau DF, Turner MJ (2020) Ex vivo culture

Verzeichnis

of mouse skin activates an interleukin 1 alpha-dependent inflammatory response.
Experimental Dermatology 29:102–106

105. Zouboulis C (2009) Stammzellen und ihre Bedeutung in der Dermatologie. Akt Dermatol
35:120–128

106. (2014) Epidermis - Altmeyers Enzyklopädie - Fachbereich Dermatologie. URL:
<https://www.altmeyers.org/de/dermatologie/epidermis-1181>

7.4 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes H_2O
bp	Basenpaare; engl.: base pairs
cDNA	Komplementäre DNS; engl.: complementary DNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol, DNA-Fluoreszenzfarbstoff
DNA	Desoxyribonukleinsäure; engl.: Desoxyribonuclein acid
DDR	DNA-Schadensantwort; engl.: DNA damage response
DSBs	Doppelstrangbrüche; engl.: double-strand breaks
engl.	englisch
Em.	Emission
Ex.	Extinktion
FITC	Fluorescein isothiocyanate
H	Histon
H2A.J	H2A-Histonvariante
IFM	Immunfluoreszenz-Mikroskopie
IR	Ionisierende Strahlung; engl.: Ionizing radiation
kDa	kiloDalton
mM	millimolar
OP	Operation

Abkürzungsverzeichnis

p53	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor-Protein
p	Signifikanzwert
Pat. Nr.	Patientennummer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Nährmedium)
SASP	Seneszenz-assoziiertes-sekretorisches-Phänotyp
SD	Standardabweichung; engl.: standard deviation
SEM	Standardfehler; engl.: standard error of mean
SMC	Structural maintenance of chromosomes
SSBs	Einzelstrangbrüche; engl.: single-strand breaks
TR	Texas red
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
XRCC4	X-ray repair cross-complementing protein 4
ü. N.	über Nacht

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Claudia E. Rube für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation und der Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft im Zeitraum der experimentellen Promotionsarbeit.

Ich danke Dr. med. Stephan Meessen, Alexander Worm und Emel Yaman, sowie der gesamten urologischen und kinderchirurgischen Abteilung des Winterberg Klinikums für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Zoe Schmal und Dr. rer. nat. Anna Isermann für ihre konstruktive Unterstützung, besonders im Hinblick auf die statistische Auswertung und die immer ermutigenden Worte.

Ebenso danke ich Mutaz Abd Al-Razaq für die gehaltvollen Diskussionen und Ideen.

Ich möchte mich besonders bei Daniela Jung für die stetige Motivation, die Hilfe bei der technischen Umsetzung und das immer offene Ohr bedanken.

An dieser Stelle möchte ich allen Kindern und ihren Erziehungsberechtigten danken, die diese wissenschaftliche Studie durch ihre Hautspende ermöglicht haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Personen, die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren und hier nicht explizit genannt wurden.

Zudem möchte ich meiner Familie danken, die mich während meiner Ausbildung und darüber hinaus tatkräftig unterstützt.

Mein größter Dank gilt meiner Lebensgefährtin Nadine Schweitzer für ihre bedingungslose Unterstützung und ihre unerschöpfliche Geduld.

9 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht